

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

RENATA ALBUQUERQUE DE ABRANTES

**EFEITO APOPTÓTICO DO FENILPROPANOIDE BENZOATO DE (E)-4-(1-EPOXI-
7,8-PROPENIL) FENILA (CV2) EM LINHAGEM DE CÉLULA DE CÂNCER DE
MAMA HUMANO (MCF-7) E TOXICIDADE EM MODELO DE PEIXE ZEBRA**

João Pessoa, PB

2025

RENATA ALBUQUERQUE DE ABRANTES

EFEITO APOPTÓTICO DO FENILPROPANOIDE BENZOATO DE (E)-4-(1-EPOXI-7,8-PROPENIL) FENILA (CV2) EM LINHAGEM DE CÉLULA DE CÂNCER DE MAMA HUMANO (MCF-7) 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

2025

RENATA ALBUQUERQUE DE ABRANTES

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A161e Abrantes, Renata Albuquerque de.

Efeito apoptótico do fenilpropanoide benzoato de (E)-4-(1-epoxi-7,8-propenil) fenila (CV2) em linhagem de célula de câncer de mama humano (MCF-7) e toxicidade em modelo de peixe zebra / Renata Albuquerque de Abrantes. - João Pessoa, 2025.

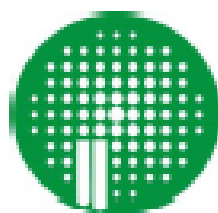
151 f. : il.

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

1. Produto natural. 2. Fenilpropanóide. 3. Citotoxicidade. 4. Estresse oxidativo. I. Sobral, Marianna Vieira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)



PgPNSB

Pós-Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 384ª (trecentésima octogésima quarta) Tese de Doutorado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos Renata Albuquerque de Abrantes, candidato(a) ao Título de "Doutor(a)" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

As nove horas (09h00) do dia trinta de janeiro do ano dois mil e vinte e cinco (30/01/2025), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <http://meet.google.com/kxg-ujyl-rsl>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Renata Albuquerque de Abrantes**, 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 Jaciana dos Santos Aguiar, Ph.D em Ciências Biológicas; Hemerson Iury Ferreira Magalhães, Ph.D em Farmacologia; Isac Almêida de Medeiros, Ph.D em Farmacologia dos Medicamentos Cardiovasculares; Davi Felipe Farias, Ph.D em Bioquímica; e Marianna Vieira Sobral, Ph.D em Farmacologia. Sendo a primeira, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Pernambuco 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) **Renata Albuquerque de Abrantes**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "BENZOATO DE (E)-4-(1-EPOXI-7,8-PROPENIL) FENILA (CV2). UM NOVO FENILPROPANOÍDE de *Croton velutinus* (EUPHORBIACEAE) INDUZ APOPTOSE E ATIVA VIAS DE SINALIZAÇÃO DEPENDENTES DE EROs, MAPKs, PKB-AKT E NF-κB EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HUMANO (MCF-7)". 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) **Renata Albuquerque de Abrantes**, 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)



Documento assinado digitalmente
MARIANNA VIEIRA SOBRAL
Data: 30/01/2025 14:14:09-0500
Verifique em: <https://validar.ig.gov.br>

Prof.ª Dr.ª Jaciana dos Santos Aguiar (Examinadora)



Documento assinado digitalmente
JACIANA DOS SANTOS AGUIAR
Data: 30/01/2025 09:03:46-02-0500
Verifique em: <https://validar.ig.gov.br>

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães (Examinador)



Documento assinado digitalmente
HEMERSON IURY FERREIRA MAGALHÃES
Data: 30/01/2025 13:11:58-0500
Verifique em: <https://validar.ig.gov.br>

Prof. Dr. Isac Almêida de Medeiros (Examinador)



Documento assinado digitalmente
ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS
Data: 30/01/2025 13:03:09-0500
Verifique em: <https://validar.ig.gov.br>

Prof. Dr. Davi Felipe Farias (Examinador)



Documento assinado digitalmente
DAVI FELIPE FARIAS
Data: 30/01/2025 12:44:07-0500
Verifique em: <https://validar.ig.gov.br>

Renata Albuquerque de Abrantes (Discente)



Documento assinado digitalmente
RENATA ALBUQUERQUE DE ABRANTES
Data: 30/01/2025 13:03:26-0500
Verifique em: <https://validar.ig.gov.br>





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

ATA Nº 2 / 2025 - PPGPN (11.01.37.17)

Nº do Protocolo: 23074.029809/2025-21

João Pessoa-PB, 28 de Março de 2025

**ERRATA DA ATA DA 384ª (TRECENTÉSIMA OCTOGÉSIMA QUARTA)
SOLEINIDADE PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DA
ALUNA RENATA ALBUQUERQUE DE ABRANTES**

No Título:

ONDE SE LÊ:

"BENZOATO DE (E)-4-(1-EPOXI-7,8-PROPENIL) FENILA (CV2), UM NOVO FENILPROPANOÍDE de *Croton velutinus* (EUPHORBIACEAE) INDUZ APOPTOSE E ATIVA VIAS DE SINALIZAÇÃO DEPENDENTES DE EROs, MAPKs, PKB-AKT E NF- κ B EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HUMANO (MCF-7)"

LEIA-SE:

"EFEITO APOPTÓTICO DO FENILPROPANOÍDE BENZOATO DE (E)-4-(1-EPOXI-7,8-PROPENIL) FENILA (CV2) EM LINHAGEM DE CÉLULA DE CÂNCER DE MAMA HUMANO (MCF-7) 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.

(Assinado digitalmente em 28/03/2025 13:48)

CAROLINE HELENA MEIRELES DE MEDEIROS MANGUEIRA
ASSISTENTE EM ADMINISTRAÇÃO
Matrícula: 1775369

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: 2, ano: 2025, documento(especie): ATA, data de emissão: 28/03/2025 e o código de verificação: a9b5e906a5

**A todas as pessoas que diariamente lutam contra o câncer
e em especial ao meu esposo, Kenneth e aos meus filhos,
Ana e Joaquim, dedico.**

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho marca o término do meu percurso acadêmico, sendo que a sua finalização não seria possível sem o apoio e incentivo de diversas pessoas.

Primeiramente, esse trabalho é para glorificar e honrar o nome de **Jesus**, que foi minha força e meu sustento em tudo. Toda minha sabedoria, fortaleza, temperança para realizá-lo é fruto do espírito santo, então sem Jesus eu nada poderia. Obrigada meu Senhor e meu Deus.

Agradeço ao meu esposo, **Kenneth**, por todo amor, orações e parceria. Seu abraço nos dias cansativos, cuidado, apoio e compreensão foram fundamentais para realização desse trabalho. Aos meus filhos, **Ana e Joaquim**, presentes (surpresa) de Deus, que vieram durante a realização desse trabalho para me fortalecer e preencher de amor e alegria, sendo combustíveis diário para que eu continuasse firme na caminhada. Foi tudo por vocês.

Aos meus Pais, **Azuil e Leonor**, pelos ensinamentos, cuidado e amor. Por não medirem esforços para a minha formação profissional e estímulo diário e sempre acreditar em mim. Mainha, minha intercessora na terra, obrigada por cada joelho no chão e orações diárias para que eu vencesse essa batalha. Amo vocês!

Ao meu irmão, **Lívio**, pelo apoio, carinho e torcida sempre. À minha prima **Jannecelly** que sempre se preocupou, torceu e rezou por mim. À família do meu esposo, em especial minha sogra **Fátima** e meu sogro **João** que me acolheram como filha e sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso.

À minha família espiritual da **Comunidade Católica Em Adoração**, por cada oração, palavras de incentivo que me sustentaram e encorajaram para continuar. Obrigada por serem face de Cristo para mim.

À minha amiga e orientadora **Marianna Sobral**, que me acolheu ainda no P2 e até hoje me ensina incansavelmente, mesmo diante de momentos tão difíceis. Obrigada por toda dedicação paciência e sempre acreditar em mim. Admiro seu jeito de formar não só profissionais, mas seu olhar humano e sua responsabilidade sobre a vida de cada aluno que lhe é confiado. Sua amizade é uma dádiva de Deus.

À toda equipe do **ONCOFAR**, (Paulo, Ramon, Moisés, Junior, Karinne, Heivila, Mariana, Isione, Geovanna, Isabela, Gabriela, Érika, Pablo) por toda ajuda, motivação e apoio durante a construção desse trabalho. Só consegui chegar até aqui porque

vocês estiveram comigo. Em especial à técnica, **Ana Paula Farias**, minha amiga, comadre e irmã, por ter sido uma mão amiga sempre que precisei, com palavras de fé, de conforto e ânimo que aqueciam meu coração. **Sâmia Duarte**, um verdadeiro anjo na terra, sempre com disponibilidade, paciência e carinho em me ajudar principalmente no citômetro, sua amizade é valiosa. **Rafael** e **Valgrícia** pela parceria nos experimentos e estar sempre dispostos a ajudar e tirar todas as dúvidas. Sem vocês eu não teria conseguido!!!

Ao professor **Dr. Juan Carlos**, pela sua disponibilidade e contribuição nesse trabalho, sempre disposto a tirar dúvidas e na torcida para dar tudo certo.

Aos professores **Dr. Lucas Abreu**, **Dr. Josean Fachine**, **Dr. Marcelo Sobral** e **Dr. Eudes Velozo** pela parceria, apoio e colaboração no fornecimento do material. Ao **Prof. Dr. Davi Felipe Farias** e sua equipe do Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco/UFPB), agradeço a parceria, gentileza e disponibilidade em ajudar a engrandecer este trabalho. Aos professores **Dra. Luciana Scotti** e **Dr. Marcus Sacotti** pela parceria com o docking. Serei eternamente grata!

À banca examinadora, que aceitou participar e engrandecer este trabalho com suas considerações e conhecimentos.

A todos os funcionários do IPeFarM, em especial, **Seu Josué e Carol** pelo carinho e sempre estarem dispostos a ajudar.

A **Universidade Federal da Paraíba**, pelo desenvolvimento pessoal e técnico científico, por muitos anos foi minha casa e tenho muito carinho por este lugar.

Ao **Cnpq**, pelo apoio financeiro.

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse sonho.

Obrigada!!!

**“É justo que muito custe o que muito
vale”**

Santa Tereza D’Ávila.

ABRANTES, R.A. **APOPTOTIC EFFECT OF THE PHENYLPROPANOID BENZOATE OF (E)-4-(1-EPOXY-7,8-PROPENYL) PHENYL (CV2) IN HUMAN BREAST CANCER CELL LINE (MCF-7) AND TOXICITY IN ZEBRAFISH MODEL.** 2025. 153 f. **Tese** (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

Apesar dos avanços consideráveis no diagnóstico e tratamento, o câncer permanece como a segunda principal causa de morte no mundo. A quimioterapia é uma das abordagens mais amplamente utilizadas no manejo da doença, contudo, apesar de sua eficácia em suprimir o crescimento tumoral, frequentemente causa efeitos colaterais significativos, o que tem motivado a busca por alternativas mais seguras e eficazes. Neste contexto destacam-se os compostos obtidos a partir de produtos naturais, entre eles os fenilpropanóides que vem sendo relatados como potenciais agentes terapêuticos para o câncer. O Benzoato de (E)-4-(1-epóxi-7,8-propenil) fenila (CV2) é um fenilpropanóide inédito, que foi isolado das raízes de *Croton velutinus* (Euphorbiaceae), e em estudo preliminar demonstrou potente efeito anti-inflamatório, tripanocida e citotoxicidade em linhagens de células tumorais humanas. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos antitumorais e toxicológicos do CV2. A citotoxicidade do CV2 foi avaliada por meio do ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em células tumorais humanas (MCF-7, MDA-MB-231, SK-MEL-28, HeLa e HCT-116) e não tumorais (MCF-10A e PBMC) humanas. Adicionalmente, a toxicidade foi investigada em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*). Os resultados mostraram que o CV2 induziu maior citotoxicidade na linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), com uma concentração inibitória média (CI_{50}) de $4,63 \pm 0,16 \mu M$. Foi analisada a citotoxicidade em PBMCs ($CI_{50} = 1,75 \pm 0,06 \mu M$), bem como, na linhagem de mama sadia humana (MCF-10A) $CI_{50} 44,09 \pm 1,00 \mu M$, mostrando seletividade nove vezes maior para a linhagem tumoral MCF-7 (IS, índice de seletividade: 9,69). A análise do ciclo celular revelou que o CV2 aumentou o percentual de células na fase sub-G1 (5 μM : $31,77 \pm 4,93\%$; 10 μM : $11,29 \pm 0,12\%$; $p < 0,05$ para ambos). Além disso, a marcação com anexina V-FITC/IP evidenciou um aumento no percentual de células em apoptose (5 μM : $50,17 \pm 2,52\%$; 10 μM : $44,50 \pm 2,37\%$; $p < 0,05$ para ambos). O CV2 (5 μM) também estimulou a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O pré-tratamento com N-acetil-L-cisteína (NAC) preveniu a citotoxicidade do CV2 (5 μM : $27,09 \pm 1,02\%$; 10 μM : $13,90 \pm 1,00\%$; $p < 0,05$ para ambos, na presença de NAC). Ensaio utilizando marcação com anticorpos específicos indicaram que o CV2 (5 μM) aumentou o percentual de células marcadas para as proteínas ERK1/2, JNK1/2, p38 MAPK, PKB/AKT e NF- κ B. Além disso, o pré-tratamento com inibidores de JNK e p38 MAPK preveniu a citotoxicidade induzida pelo CV2. No modelo de peixe-zebra, a concentração letal que matou metade dos embriões foi obtida (CL_{50} 3,07 μM) e não foram observados efeitos não letais nos embriões. Em resumo, o CV2 demonstrou efeito antitumoral *in vitro* por meio da indução de apoptose, aumento do estresse oxidativo e modulação de vias de sinalização intracelulares, incluindo MAPKs, PKB/AKT e NF- κ B. Além disso, apresentou embriotoxicidade no modelo de peixe-zebra, destacando-se como um composto antitumoral promissor para futuras investigações terapêuticas.

Palavras-chave: Produto natural; Fenilpropanóide; Citotoxicidade; Estresse oxidativo

ABSTRACT

Despite considerable advances in diagnosis and treatment, cancer remains the second leading cause of death worldwide. Chemotherapy is one of the most widely used approaches in disease management; however, despite its effectiveness in suppressing tumor growth, it often causes significant side effects, motivating the search for safer and more effective alternatives. In this context, compounds derived from natural products stand out, including phenylpropanoids, which have been reported as potential therapeutic agents for cancer. (E)-4-(1-epoxy-7,8-propenyl) phenyl benzoate (CV2) is a novel phenylpropanoid isolated from the roots of *Croton velutinus* (Euphorbiaceae). Preliminary studies have demonstrated its potent anti-inflammatory, trypanocidal, and cytotoxic effects on human tumor cell lines. This study aimed to investigate the antitumor and toxicological effects of CV2. The cytotoxicity of CV2 was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay in human tumor cells (MCF-7, MDA-MB-231, SK-MEL-28, HeLa, and HCT-116) and non-tumor human cells (MCF-10A and PBMC). Additionally, toxicity was assessed in *Danio rerio* (zebrafish) embryos. The results showed that CV2 induced greater cytotoxicity in the human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7), with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of $4.63 \pm 0.16 \mu M$. Cytotoxicity was also analyzed in PBMCs ($IC_{50} = 1.75 \pm 0.06 \mu M$) and in the non-tumor human breast cell line (MCF-10A, $IC_{50} = 44.09 \pm 1.00 \mu M$), demonstrating nine times greater selectivity for the MCF-7 tumor cell line (SI, selectivity index: 9.69). Cell cycle analysis revealed that CV2 increased the percentage of cells in the sub-G1 phase (5 μM : $31.77 \pm 4.93\%$; 10 μM : $11.29 \pm 0.12\%$; $p < 0.05$ for both). Furthermore, Annexin V-FITC/PI staining showed an increase in the percentage of apoptotic cells (5 μM : $50.17 \pm 2.52\%$; 10 μM : $44.50 \pm 2.37\%$; $p < 0.05$ for both). CV2 (5 μM) also stimulated the production of reactive oxygen species (ROS). Pretreatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC) prevented CV2 cytotoxicity (5 μM : $27.09 \pm 1.02\%$; 10 μM : $13.90 \pm 1.00\%$; $p < 0.05$ for both, in the presence of NAC). Assays using specific antibody labeling indicated that CV2 (5 μM) increased the percentage of cells labeled for ERK1/2, JNK1/2, p38 MAPK, PKB/AKT, and NF- κB proteins. Moreover, pretreatment with JNK and p38 MAPK inhibitors prevented CV2-induced cytotoxicity. In the zebrafish model, the lethal concentration that killed half of the embryos was determined ($LC_{50} = 3.07 \mu M$), and no non-lethal effects were observed in the embryos. In summary, CV2 demonstrated an *in vitro* antitumor effect by inducing apoptosis, increasing oxidative stress, and modulating intracellular signaling pathways, including MAPKs, PKB/AKT, and NF- κB . Additionally, it exhibited embryotoxicity in the zebrafish model, highlighting it as a promising antitumor compound for future therapeutic investigations.

Keywords: Natural product; Phenylpropanoid; Cytotoxicity; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características biológicas do câncer	28
Figura 2. A carcinogênese e a influência dos principais fatores de risco do câncer ..	30
Figura 3. Regulação da progressão do ciclo celular por Cdk's e Ciclinas.	37
Figura 4. Processo de morte celular por apoptose.	40
Figura 5. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose	42
Figura 6. Fatores endógenos e exógenos que causam estresse oxidativo e efeitos dos diferentes níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células sadias e tumorais.....	45
Figura 7. Vias de sinalização das Proteínas Cinase Ativadas por Mitógenos (MAPKs).	49
Figura 8. Cascata de sinalização das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK).	51
Figura 9. Cascata de sinalização das proteínas cinases c-Jun N-terminal (JNKs)....	53
Figura 10. Cascata de sinalização das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK).	57
Figura 11. Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.	61
Figura 12. Vias de sinalização intracelulares canônica (clássica) e não-canônica (alternativa) do Fator Nuclear kappa B (NF-κB).	67
Figura 13. Espécie <i>Croton velutinus</i> (Euphorbiaceae) em Morro do Chapéu – BA. ...	73
Figura 14. Estrutura química do Benzoato de (e)-4-(1-epoxi-7,8-propen) fenila (CV2).	73
Figura 15. Representação esquemática dos métodos utilizados para avaliação da toxicidade e atividade antitumoral do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen)Fenila (CV2).	83
Figura 16. Citotoxicidade do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2) em linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7 após 24, 48 e 72 h de tratamento. ...	93
Figura 17. Citotoxicidade do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila e da Doxorubicina (DXR) em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) após 72h de tratamento.	94

Figura 18. Efeito do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) e da doxorubicina (DXR, 2 μ M) na linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7 nas diferentes fases do ciclo celular após 48 horas de tratamento.95

Figura 19. Efeito do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2 5 ou 10 μ M) e da Doxorubicina (DXR, 2 μ M) em linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP) após 48 horas de tratamento.....96

Figura 20. Citotoxicidade do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) em linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC) por 72 horas.97

Figura 21. Efeito do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) e da Doxorubicina (DXR, 2 μ M) no percentual de células fluorescentes após incubação com o 2'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), em diferentes tempos de tratamento.98

Figura 22. Citotoxicidade do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2) (5 ou 10 μ M) na presença ou ausência de inibidores da JNK1/2/3 (SP600125), p38 (PD169316) e ERK1/2 (U-0126) em células da linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 72h.100

Figura 23. Percentual de células marcadas com anticorpo anti-JNK1/2 após 48 horas de tratamento com do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) ou Doxorubicina (DXR, 2 μ M).102

Figura 24. Percentual de células marcadas com anticorpo anti-p38 após 48 horas de tratamento com do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) ou Doxorubicina (DXR, 2 μ M).....103

Figura 25. Percentual de células marcadas com anticorpo anti-ERK1/2 após 48 horas de tratamento com do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2 5 ou 10 μ M) ou Doxorubicina (DXR).104

Figura 26. Percentual de células marcadas com anticorpo anti-PKB/AKT após 48 horas de tratamento com do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2 μ M).....105

Figura 27. Percentual de células marcadas com anticorpo anti-NF- κ B (p65) após 48 horas de tratamento com do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2 μ M).107

Figura 28. Taxa de sobrevivência de embriões de peixe-zebra expostos a concentrações crescentes do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2) por 96 h.108

Figura 29. Efeitos letais e não letais observados em embriões e/ou larvas de peixe-zebra expostos a diferentes concentrações do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2).....109

Figura 30. Atividade de enzimas marcadoras de estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra após 96 h de exposição a diferentes concentrações do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2).....110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas.....	81
Tabela 2. Citotoxicidade do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2) e da Doxorrubicina (DXR) em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas após 72 h de tratamento.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AChe	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
APAF1	Fator 1 ativador de protease apoptótica
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
CI₅₀	Concentração inibitória média
CL₅₀	Concentração letal mediana
CKI	Inibidor de CDK
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
FET	Toxicidade aguda em embriões de peixe zebra
DXR	Doxorrubicina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
GDP	Difosfato de guanosina
GEF	Fator de troca de nucleotídeo de guanina
Glu	Ácido glutâmico
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GST	Glutathione transferase
GTP	Trifosfato de guanosina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
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
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises

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
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
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 salino
PDK1	Proteína cinase dependente de fosfoinosítideo-1
PI3K	Fosfoinosítideo 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
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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 Aspectos gerais do câncer	27
2.2 Câncer de mama: características gerais e tratamento	32
2.3 Ciclo celular e o câncer	35
2.4 Morte celular por apoptose	39
2.5 Estresse oxidativo e o câncer	44
2.6 Vias de sinalização intracelulares das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) e o câncer	48
2.6.1 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK) e o câncer	50
2.6.2 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) e o câncer	53
2.6.3 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK) e o câncer	57
2.7 Via de sinalização intracelular da Proteína Cinase B (PKB/AKT) e o câncer	61
2.8 Via de sinalização intracelular do Fator Nuclear <i>kappa</i> B (NF- κ B) e o câncer	65
2.9 Produtos naturais e o seu potencial farmacológico	69
2.9.1 Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (Cv2): um novo fenilpropanóide obtido de <i>Croton velutinus</i> (Euphorbiaceae).....	70
3 OBJETIVOS	76
3.1 Objetivo geral	76
3.2 Objetivos específicos.....	76
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	78
4.1 Local da pesquisa.....	78
4.2 Material.....	78
4.2.1 Substâncias e Reagentes.....	78

4.2.2 Equipamentos.....	79
4.2.3 Obtenção do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2)	79
4.2.4 Linhagens celulares.....	80
4.2.5 Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas	81
4.2.6 Embriões de peixe zebra e condições experimentais.....	82
4.3 Métodos.....	83
4.3.1 Avaliação da citotoxicidade do CV2 em linhagens tumorais e não tumoral humanas e determinação do índice de seletividade (IS)	83
4.3.2 Avaliação da citotoxicidade do CV2 em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas.....	84
4.3.3 Investigação dos efeitos antitumorais do CV2.....	85
4.3.3.1 Análise da ação do CV2 na progressão do ciclo celular	85
4.3.3.2 Avaliação da morte celular por apoptose com a marcação de anexina V-FITC e iodeto de propídeo.....	85
4.3.3.3 Avaliação do efeito do CV2 sobre o estado redox celular	86
4.3.3.3.1 Ensaio do 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA)	86
4.3.3.3.2 Avaliação da citotoxicidade do CV2 na presença e na ausência de N-acetilcisteína (NAC).....	86
4.3.3.4 Avaliação do efeito do CV2 sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs).....	87
4.3.3.5 Avaliação da citotoxicidade do CV2 na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)	87
4.3.3.6 Avaliação do efeito do CV2 sobre a modulação das proteínas NF- κ B e PKB/AKT	88
4.3.4 Investigação da toxicidade aguda do CV2 em embriões e larvas de peixe-zebra	88
4.3.5 Avaliação da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra expostas ao CV2	89
4.3.6 Análise Estatística	90

5 RESULTADOS	92
5.1 Citotoxicidade em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas	92
5.2 Citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humanas	93
5.3 Efeito do CV2 sobre a progressão do ciclo celular	94
5.4 Indução de apoptose por CV2	95
5.4.1 Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo	95
5.5 Efeito do CV2 sobre o estado redox celular na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)	97
5.6 Efeito do CV2 na produção de espécies reativas de oxigênio	97
5.7 Efeito de inibidores de MAPKs na citotoxicidade do CV2	99
5.7.1 Marcação com anticorpos anti-MAPKs e análise por citometria de fluxo	100
5.8 Marcação com anticorpos anti-PKB/AKT e análise por citometria de fluxo	104
5.9 Marcação com anticorpos anti-NF- κ B (p65) e análise por citometria de fluxo	106
5.10 Embriotoxicidade do CV2 em modelo de peixe-zebra	108
5.10.1 Toxicidade aguda do CV2 em embriões de peixe-zebra	108
5.10.2 Efeitos do CV2 na atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra	109
6 DISCUSSÃO	112
7 CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS	128
ANEXO 1 - Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) para peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	146
ANEXO 2 - Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa para PBMC (1/2)	147
ANEXO 2 - Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa para PBMC (2/2)	148
ANEXO 3 – Artigos aceito para publicação 17/01/2025	149
ANEXO 4– Artigos publicados durante a vigência do doutorado	150
ANEXO 5– Artigos publicados durante a vigência do doutorado	151

ANEXO 6 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado.....	152
ANEXO 7 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado.....	153

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O termo câncer refere-se à um conjunto de doenças complexas em que as células se proliferam de forma descontrolada em relação aos tecidos saudáveis e apresentam a capacidade de disseminação para outros órgãos (Vaghari-Tabari *et al.*, 2021). A formação de uma célula maligna é um processo multifatorial, envolvendo fatores externos e internos que podem atuar em conjunto para favorecer o crescimento tumoral (Cai *et al.*, 2021; Abu-Rustum *et al.*, 2023).

Em particular, o câncer de mama representa atualmente a segunda principal causa de morte a nível mundial, sendo caracterizado pela proliferação descontrolada de células malignas no tecido epitelial mamário (Barzaman *et al.*, 2020). Em 2020, foram registrados aproximadamente 2,3 milhões de casos (11,7% do total) e uma taxa de mortalidade de 62,9% em todo o mundo. Projeções sugerem que, devido à globalização e ao consequente aumento dos fatores de risco, a incidência de câncer de mama pode aumentar entre 32% e 56% até 2040, especialmente em mulheres de 40 a 49 anos (Kashyap *et al.*, 2022).

O tratamento do câncer envolve uma abordagem multimodal, que pode incluir terapias locais, a exemplo da cirurgia, radioterapia, imunoterapia, hormonioterapia e terapia alvo, ou sistêmicas, como a quimioterapia (Tesch; Partridge, 2022). Essas estratégias são frequentemente combinadas, dependendo do subtipo, estágio e características moleculares do tumor, com o objetivo de maximizar a eficácia terapêutica e melhorar a qualidade de vida do paciente.

Atualmente, a quimioterapia é uma das abordagens mais amplamente utilizadas no tratamento do câncer de mama (Su *et al.*, 2020). Os agentes quimioterápicos incluem drogas citotóxicas, medicamentos hormonais, reguladores de resposta biológica, anticorpos monoclonais, adjuvantes e outros. Embora suprimam o crescimento do tumor, os fármacos usados na quimioterapia frequentemente causam efeitos colaterais significativos e desenvolvimento de resistência, o que tem incentivado a busca por alternativas mais seguras, eficazes e menos citotóxicas para as células não tumorais (Ashrafizadeh *et al.*, 2020).

Nesse contexto, os produtos naturais têm se destacado como uma fonte promissora para o desenvolvimento de novas terapias. Sua diversidade química, baixa toxicidade, segurança e ampla disponibilidade têm impulsionado novas

pesquisas e destacado estes compostos como uma fonte alternativa e promissora na busca de agentes antitumorais (Newman; Crag, 2020).

Entre os produtos naturais, os fenilpropanóides, metabólitos secundários derivados de plantas, têm atraído grande interesse da comunidade científica devido aos seus amplos benefícios à saúde (Hui *et al.*, 2024). Esses compostos possuem propriedades bioativas diversificadas, incluindo atividades anti-inflamatória, neuroprotetora (Zhu *et al.*, 2024), antimicrobiana, antidiabética, cardioprotetora e anticancerígena (Zhu *et al.*, 2023). Essas características tornam os fenilpropanóides potenciais agentes terapêuticos para o câncer e outras patologias, apresentando uma abordagem inovadora no tratamento e na prevenção de diversas doenças (Rodrigues *et al.*, 2024).

Nesse contexto, um novo fenilpropanóide, denominado CV2, foi isolado recentemente das raízes de *Croton velutinus* (Abreu *et al.*, 2021), uma espécie da família Euphorbiaceae abundantemente encontrada no nordeste do Brasil, comumente conhecida como "pimentinha". Em estudos preliminares, o (E)-4-(1-epoxi-7,8-propenil) fenil benzoato (CV2) demonstrou potente efeito anti-inflamatório (em células de macrófagos murinos, J774) e tripanocida (em *Tripanossoma cruzi*). Além disso, o CV2 apresentou citotoxicidade *in vitro* contra diferentes linhagens tumorais humanas, com maior efeito em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) (Abreu *et al.*, 2020). No entanto, este novo fenilpropanóide não apresenta estudos que elucidem os prováveis mecanismos de ação antitumorais induzidos.

Dessa forma, considerando que o câncer é um dos principais problemas de saúde pública mundial, aliado aos tratamentos convencionais frequentemente associados à alta toxicidade e ao desenvolvimento de resistência terapêutica, bem como a relevância dos produtos naturais, em particular dos fenilpropanóides, este estudo teve como objetivo investigar a atividade antitumoral *in vitro* e a toxicidade do composto benzoato de (E)-4-(1-epoxi-7,8-propenil) fenila (CV2). A toxicidade foi avaliada em modelos de células humanas e em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*), enquanto os efeitos antitumorais foram investigados em linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

As células controlam continuamente a produção e liberação de sinais envolvidos na proliferação, mantendo a homeostase entre os processos de morte e divisão de tecidos fisiologicamente saudáveis. Contudo, estas células podem sofrer alterações genéticas e/ou epigenéticas que levam à evasão da vigilância imunológica, modificações do metabolismo celular, bem como de processos celulares críticos, tais como a proliferação, diferenciação e morte, culminando no desenvolvimento de massas anormais de tecidos com alta capacidade proliferativa conhecidas como tumores (Cheek *et al.*, 2022; Hannahan, 2022).

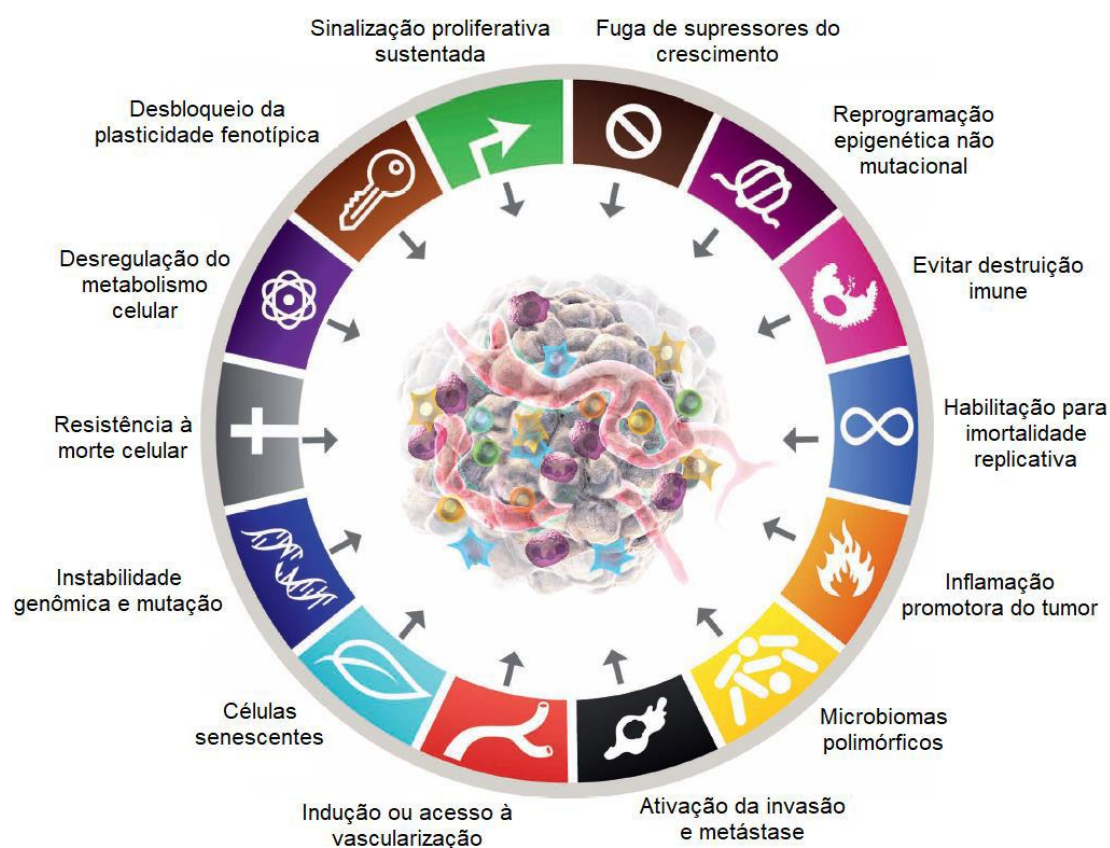
De acordo com determinadas características os tumores podem ser classificados em benigno ou maligno. A maioria dos tumores benignos frequentemente não exibem sinais clínicos distintivos, apresentando sintomas que variam conforme a localização. Tipicamente, esses tumores possuem um crescimento lento, células diferenciadas e raramente se infiltram para locais secundários (Maggio *et al.*, 2021). Em contrapartida, os tumores malignos se distinguem por seu rápido crescimento, alta atividade celular, grau elevado de atipia nuclear estromal, presença de figuras mitóticas, células tumorais multinucleadas e diferenciação heteróloga do estroma (Lissidini, *et al.*, 2022). Os tumores que apresentam estas características são capazes de migrar e invadir outros tecidos em um processo denominado metástase, sendo distinguidos como câncer (Gyamfiet *et al.*, 2022).

O termo câncer refere-se à um conjunto de doenças em que as células se proliferam de forma descontrolada em relação aos tecidos saudáveis e apresentam a capacidade de disseminação para outros órgãos (Vaghari-Tabariet *et al.*, 2021). Os diferentes tipos de cânceres são categorizados de acordo com o tecido ou órgão de origem em I) carcinomas; II) sarcomas; III) leucemias, linfomas e mielomas. Os carcinomas têm origem em tecidos epiteliais, como a pele (Basset-Seguin *et al.*, 2020), mama (Tsang, 2020) e colorretal (Bravo-Taxaet *et al.*, 2021). Os sarcomas, por outro lado, originam-se de tecidos conjuntivos, como ossos (Eaton *et al.*, 2021), músculos (Faizan e Muppidi, 2023), cartilagens e tecido adiposo (Yoshida, 2024; Grünewaldet *et al.*, 2020). As leucemias, linfomas e mielomas, se desenvolvem a partir

de células sanguíneas na medula óssea ou do sistema linfático, resultando em uma produção anormal de células brancas no sangue (Luca, 2021; Leval e Jaffe, 2020).

Embora ocorram diferenças em sua origem tecidual, as células tumorais adquirem características funcionais específicas ao progredirem para o estado neoplásico, apresentando habilidades cruciais que caracterizam os tumores malignos, sendo 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**

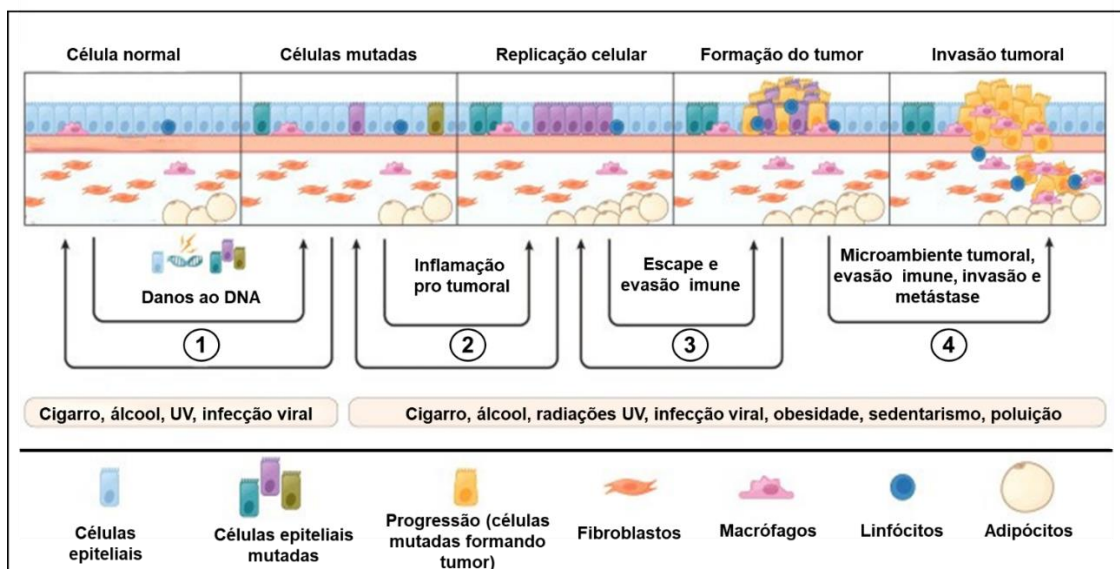


Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022.

Evidências experimentais e clínicas indicam que o processo de formação do câncer, denominado carcinogênese, depende da interação de fatores intrínsecos, que são herdados geneticamente, e de fatores extrínsecos. A exposição à carcinógenos químicos (como tabaco e álcool), agentes físicos (radiação ultravioleta, ionizante, poluição), agentes biológicos (vírus, bactérias, parasitas) (Arneth, 2019), além de outros fatores relacionados ao estilo de vida do indivíduo (obesidade, alimentação e sedentarismo) constituem exemplos de fatores externos (Cai *et al.*, 2021). O desenvolvimento da maioria dos tumores (95%) é atribuído à ação de mutações somáticas, as quais são induzidas pela exposição a fatores ambientais externos, enquanto aproximadamente 5% dos casos são decorrentes de mutações genéticas herdadas (Abu-Rustum *et al.*, 2023).

Neste contexto, a carcinogênese compreende três etapas denominadas iniciação, promoção e progressão (Figura 2). A etapa de **iniciação** acontece quando uma célula adquire uma alteração genética e/ou epigenética, geralmente em decorrência de uma mutação que danifica o DNA e é originada a partir de fatores intrínsecos e/ou extrínsecos. Essas células iniciadoras competem com as células vizinhas por espaço e recursos, podendo ser eliminadas através de processos fisiológicos naturais que visam manter a homeostase nos tecidos, como por exemplo, o reparo do DNA ou a morte celular por apoptose. Em alguns casos, as células iniciadoras podem persistir em tecidos saudáveis sem causar evidência de doença, até que recebam um estímulo e comece a proliferar. Os fatores de risco exógenos desempenham um papel crucial nesse processo, pois podem alterar o ambiente tecidual, favorecendo a expansão e progressão das células iniciadoras (Weedenet *et al.*, 2023) (Figura 2).

Figura 2. A carcinogênese e a influência dos principais fatores de risco do câncer



Etapas da carcinogênese. Ocorre quando células sadias recebem influências de fatores que causam danos ao DNA, chamado de iniciação (1), posteriormente na etapa de promoção (2) as células mutadas se dividem de forma desordenada resultando numa replicação celular para a progressão (3) do tumor. Esse tumor formado pode entrar na corrente sanguínea e se instalar em outros tecidos, promovendo metástase (4). Legenda: 1= iniciação; 2= promoção; 3= progressão; 4= metástase.

Fonte: Adaptado de [Weeden et al., 2023](#).

A **promoção** do tumor refere-se à fase em que as células iniciadas adquirem vantagens seletivas que favorecem o seu crescimento descontrolado (Hanahan; Monje, 2023). Durante essa etapa ocorrem danos genéticos adicionais e a amplificação das mutações, que resultam no acúmulo de células mutadas e modificações em diferentes moléculas/processos envolvidos na proliferação celular, entre eles: **I) fatores de crescimento**, onde as proteínas que estimulam a proliferação celular promovem a sobrevivência e multiplicação das células iniciadas (Chelakkot et al., 2023); **II) inibidores de apoptose**, no qual moléculas que suprimem a apoptose permitem que as células iniciadas persistam e se multipliquem (Morana et al., 2020); **III) angiogênese**, estímulo à formação de novos vasos sanguíneos, fornecendo nutrientes e oxigênio aos tumores em crescimento (Paredes et al., 2021); **IV) inflamação crônica**, processo inflamatório persistente no qual se cria um ambiente favorável ao crescimento celular descontrolado e à progressão do tumor (Li et al., 2020); **V) interferência à resposta imune**, promovendo supressão ou evasão às respostas imunológicas (Michaud et al., 2021).

Na fase final da carcinogênese, conhecida como **progressão** tumoral, o tumor se torna cada vez mais agressivo, adquirindo a capacidade de se proliferar de

forma descontrolada e irreversível. Isso resulta no aumento do tamanho da massa tumoral e na ativação de mecanismos como angiogênese e metástase. A angiogênese estimula a formação de novos vasos sanguíneos, fornecendo nutrientes e oxigênio ao tumor, permitindo o seu crescimento e disseminação para outros tecidos. Durante a metástase, as células cancerígenas invadem o sistema circulatório ou linfático, rompendo a matriz extracelular e migrando para novos locais. Esse processo não só facilita a disseminação do tumor, mas também o protege contra a vigilância imunológica, tornando-o resistente aos tratamentos quimioterápicos (Faubert *et al.*, 2020).

A literatura descreve que **diversas** mutações genéticas e/ou epigenéticas **influenciam o processo da** carcinogênese, **envolvendo** proto-oncogenes, genes supressores **de tumor e/ou genes de reparo do** DNA (Park *et al.*, 2020). As modificações epigenéticas mais bem descritas incluem **a** metilação do DNA, modificações **em** histonas e **os** RNAs não codificantes (Feinberg; Levchenko, 2023).

Os proto-oncogenes são genes que desempenham um **papel fundamental na regulação de moléculas envolvidas em processos de sobrevivência, transdução de sinais, crescimento, diferenciação e morte celular. Quando estes genes sofrem mutações e/ou alterações** podem se transformar em oncogenes, **os quais** promovem o crescimento celular descontrolado e contribuem para o **desenvolvimento do câncer** (Braicu *et al.*, 2019). Ras (Gimple; Wang, 2019), MYC (Dhanasekaran *et al.*, 2022) e Raf (Ullahet *et al.*, 2022) são considerados os proto-oncogenes mais frequentemente desregulados nos cânceres humanos. Estes genes estão associados à oncogênese, uma vez que facilitam a proliferação tumoral, sobrevivência celular, invasão, metástase, degradação da matriz extracelular e angiogênese (Frontzket *et al.*, 2023). Por outro lado, o retinoblastoma (Rb), p53 (Engeland, 2022) e BCRA 1/2 (Obeagu, 2024) são genes supressores tumorais, cuja função é promover a senescência celular, resposta fisiológica que resulta na parada do crescimento celular e na eliminação imediata de células danificadas e pré-malignas (Ruscetti *et al.*, 2020).

Em termos epidemiológicos, o número de novos casos de câncer tem crescido de forma contínua, neste contexto, dados mostram que no ano de 2022 ocorreram 20 milhões de novos casos de câncer no mundo, resultando em 9,7 milhões de mortes (OMS, 2024), o que evidencia a grande complexidade deste problema de saúde pública mundial. Projeções indicam que nas próximas quatro

décadas as mortes por câncer superarão as por doenças cardíacas isquêmicas, com mais de 35 milhões de novos casos previstos para 2050 em todo o mundo (Mattiuzziet *al.*, 2019; OMS, 2024). De fato, em muitos países desenvolvidos os cânceres agora superam as doenças cardiovasculares como principal causa de morte (Siegel *et al.*, 2018).

Estimativas apontam que aproximadamente uma em cada cinco pessoas desenvolverá câncer durante a sua vida (OMS, 2024). Mundialmente, os tipos de cânceres mais comuns incluem pulmão (2,5 milhões de casos e 1,8 milhão de mortes), mama (2,3 milhões de casos e 670 mil mortes) e cólon retal (1,28 milhões de casos e 900 mil mortes). No Brasil, são esperados 704 mil novos casos de câncer a cada ano durante o triênio 2023-2025. O tipo mais comum é o tumor maligno de pele não melanoma, representando 31,3% do total de casos, seguido pelo câncer de mama feminino (10,5%), próstata (10,2%), colorretal (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%).

Na última década, o câncer de mama tem se destacado como o tipo de neoplasia mais incidente entre as mulheres, com 74 mil novos casos previstos por ano até 2025 (INCA, 2023), sendo considerada uma das principais causas de mortalidade. Embora os métodos de detecção precoce e terapêuticos tenham evoluído consideravelmente, muitos pacientes com câncer de mama ainda apresentam resposta insatisfatória aos medicamentos atuais, recorrência tumoral e, em alguns casos, progressão fatal da doença (Biswas *et al.*, 2023).

2.2 Câncer de mama: características gerais e tratamento

O câncer de mama (CM) descreve uma série de doenças causadas pela proliferação descontrolada de células malignas no tecido epitelial mamário (Chamberlin *et al.*, 2023). Segundo as estimativas da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC ou *International Agency for Research of Cancer*), o câncer de mama é o tipo de câncer mais comumente diagnosticado no mundo, com aproximadamente 2,26 milhões de casos registrados e 685 mil mortes em mulheres no ano de 2020, sendo a principal causa de morte por câncer neste gênero (GLOBOCAN, 2020).

Os fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia incluem idade avançada, histórico familiar, mutações genéticas hereditárias, exposição a

hormônios, obesidade, consumo de álcool e ausência de atividade física (Kassypap *et al.*, 2022). Além destes, os fatores reprodutivos também constituem um parâmetro relevante, pois o risco de desenvolvimento do câncer de mama aumenta, por exemplo, com a idade mais jovem da menarca, idade mais avançada da menopausa, ausência de filhos e/ou de exposição à amamentação (Wilkinson; Gathani., 2021).

A carcinogênese do CM também é influenciada por alterações genéticas em proto-oncogenes e em genes supressores de tumor. Neste contexto, os genes BRCA1 (do inglês, *breast cancer 1*) e BRCA2 (do inglês, *breast cancer 2*) desempenham um papel crucial na regulação do crescimento celular e são os principais supressores de tumor mutados em cânceres de mama, sendo responsáveis por cerca de 5 a 7% de todos os casos desse tipo de neoplasia (Xie *et al.*, 2022). A perda da função proteica leva à instabilidade genética, e consequentemente ao aumento do risco de carcinogênese em portadores destas mutações (Weifeng *et al.*, 2019; Obeagu, 2024).

Os sintomas do câncer de mama podem incluir a presença de um nódulo ou espessamento no seio; mudanças na forma ou tamanho da mama; alterações na pele da mama; e a presença de secreção mamilar anormal (Diaz-Santos *et al.*, 2023). No entanto, algumas pessoas podem não apresentar sintomas a depender das características específicas do subtipo de CM (Barzaman *et al.*, 2020).

Com base em evidências moleculares e histológicas, o câncer de mama pode ser categorizado em três subgrupos principais: I) receptor de estrogênio positivo (ER+), que responde ao hormônio estrogênio; II) receptor de progesterona positivo (PR+), que responde ao hormônio progesterona; III) receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+), que responde à proteína HER2, envolvida na proliferação de células epiteliais; IV) triplo-negativo (TNBC), que não expressa os receptores ER, PR e HER2. Adicionalmente, dentro do grupo TNBC, foram identificados seis subtipos distintos: I) basal 1 (BL-1; do inglês *Basal-Like 1*); II) basal 2 (BL-2; do inglês *Basal-Like 2*); III) imunomodulador (IM); IV) mesenquimal (M); V) semelhante a células-tronco mesenquimais (MSL) e VI) receptor de andrógeno luminal (LAR, do inglês *Luminal-Androgen Receptor*). Esses subtipos diferenciados têm comportamentos histopatológicos e clínicos específicos, além de estarem associados à diferentes faixas etárias e etnias (Lehmann *et al.*, 2015; Kassypap *et al.*, 2022).

O estrogênio e a progesterona são os principais hormônios esteroides responsáveis pela proliferação no epitélio mamário, sinalizando o desenvolvimento e a diferenciação da glândula mamária. O estrogênio estimula o crescimento das células epiteliais mamárias e aumenta a expressão de receptores de progesterona, enquanto a progesterona contribui para a proliferação celular e a formação de estruturas glandulares. Juntos, esses hormônios desempenham um papel crucial no desenvolvimento mamário normal, bem como na resposta fisiológica do tecido mamário durante os ciclos menstruais, a gravidez e a lactação (Briskenet *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2022).

O câncer de mama receptor de estrogênio positivo (ER+) é o tipo mais comum de câncer de mama diagnosticado, sendo caracterizado pela presença de receptores de estrogênio nas células tumorais. A expressão do receptor de estrogênio é uma característica fisiológica das células luminais sensoriais de hormônios na glândula mamária. Após a sua ativação pelo estrogênio, o ER executa um programa de transcrição que impulsiona a proliferação e a expansão do epitélio mamário durante a puberdade (Roy *et al.*, 2022). No câncer, entretanto, estes receptores de estrogênio permitem que as células cancerígenas respondam aos estímulos hormonais do estrogênio, o que pode promover o crescimento e a progressão do tumor (Herzog; Fuqua., 2022).

Assim, o crescimento dos tumores ER+ é impulsionado pela sinalização do receptor, que ao ser ativado pelo estrogênio dimeriza-se e transloca-se para o núcleo, onde se liga diretamente a elementos específicos da resposta ao estrogênio (EREs), ou indiretamente ao DNA, através do fator de transcrição NF-KB (Fator Nuclear kappa B). Ao se ligar ao DNA, o ER auxilia na montagem de um grande complexo de coativadores que regulam a transcrição gênica, a exemplo do: SRC-3/AIB (coativador do receptor de esteróides-3); CREB (complexos de remodelação de cromatina dependentes de ATP); SWI/SNF (complexos de remodelação de cromatina dependentes de ATP) e SRA (ativador de RNA esteróide) (Saatci *et al.*, 2021).

O estrogênio produzido por mulheres jovens antes da menopausa é fornecido principalmente pelos ovários, por isso, antigamente era realizado a ooforectomia bilateral, um procedimento cirúrgico que consiste na remoção de ambos os ovários, como forma de terapia para os cânceres de mama (Stockwell., 1983). Entretanto, nos últimos anos as cirurgias para supressão da função ovariana têm sido

substituídas por terapias medicamentosas, como exemplo o uso de agonistas do hormônio liberador de hormônio luteinizante (LH-RH), que impedem a secreção do hormônio luteinizante. Após a descoberta do receptor de estrogênio (ER) e o desenvolvimento do tamoxifeno, um modulador ER seletivo, a terapia endócrina com medicamentos tornou-se o pilar do tratamento (Kubo., 2020).

De maneira geral, os tratamentos para o câncer de mama ER+ visam bloquear a ação do estrogênio ou reduzir seus níveis no corpo. Além disso, outras opções de tratamento, como a cirurgia e a radioterapia, também podem ser utilizadas associadas à quimioterapia, dependendo das características individuais do tumor e das necessidades do paciente (Li *et al.*, 2020). Como exemplos de agentes hormonioterápicos pode-se mencionar os: *a) Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio (SERMs)*, como o tamoxifeno, raloxifeno e toremifeno; *b) Inibidores da Aromatase (IAs)*, como o letrozol, anastrozol e exemestane; e *c) Degradaadores Seletivos do Receptor de Estrogênio (SERDs)*, como o fulvestrant (Reheem *et al.*, 2023).

2.3 Ciclo celular e o câncer

O ciclo celular é um sistema de controle altamente conservado entre a maioria das células eucarióticas, composto por fases bem definidas que regulam mudanças na morfologia celular e garantem a transmissão precisa da informação genética para a próxima geração. Este processo consiste em duas etapas principais: (I) a intérfase, subdividida nas fases G1, S e G2, caracterizada pelo crescimento celular e duplicação do material genético, e (II) a mitose ou fase M, período onde ocorre a divisão celular, gerando duas células filhas idênticas (Ligasová *et al.*, 2023).

O ciclo ocorre de maneira unidirecional e sincronizada, sendo rigorosamente supervisionado por pontos de verificação conhecidos como pontos de verificação ou *checkpoints* (Tokunaga *et al.*, 2022), que monitoram eventos cruciais que asseguram a progressão ordenada deste processo, como a manutenção da integridade do DNA, a duplicação completa dos cromossomos e a correta formação do fuso mitótico. Para o sucesso desse mecanismo, cada cromossomo deve ser replicado com precisão e distribuído igualmente entre as células-filhas durante cada divisão celular, evitando

erros que poderiam comprometer a viabilidade ou estabilidade genética das novas células (Dong e Li, 2022).

Estudos recentes fornecem uma caracterização mais detalhada do ciclo celular, descrevendo-o como um processo que segue duas trajetórias principais. A primeira, uma trajetória cíclica e proliferativa, percorrendo as fases G1, S, G2 e M. A segunda, uma trajetória de parada terminal, conhecida como G0, que diverge da trajetória proliferativa logo após a mitose (Stallaert *et al.*, 2022).

A **fase G1** é a etapa onde ocorre a síntese de proteínas, amplificação de organelas, incluindo ribossomos e mitocôndrias, crescimento celular, além da preparação do material genético para as etapas posteriores, envolvendo a regulação de componentes moleculares necessários para a replicação, como a ativação do C-Myc, por exemplo, um fator de transcrição que estimula a entrada das células na fase S por meio da regulação dos genes do ciclo celular necessários para a replicação e reparo do DNA (Limas e Cook, 2019; Wang, 2021).

Os danos ao DNA constituem um dos principais fatores que inibem a entrada na fase S, por isso na trajetória do ciclo celular existe um ponto de verificação no estágio G1/S que determina se as células estarão aptas ou não a continuar este processo. Caso sejam detectados erros são recrutadas proteínas que realizarão o reparo necessário no DNA para que as células possam progredir às próximas fases (Lau *et al.*, 2021). A progressão do ciclo é mediada principalmente por diversas proteínas quinases chamadas de CDKs (quinases dependentes de ciclina, do inglês: *cyclin-dependent kinases*), que interagem e são ativadas por suas subunidades reguladoras, as ciclinas (Wang, 2022) (Figura 5).

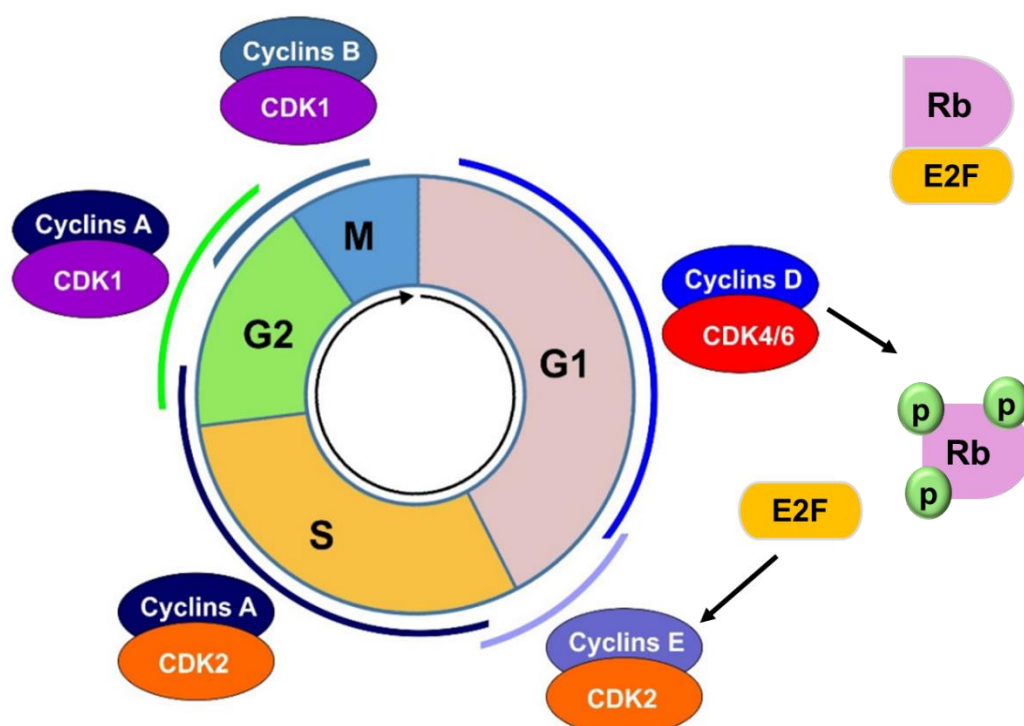
A entrada na **fase S** é regulada pela atividade da proteína do retinoblastoma (pRb), um inibidor do ciclo celular (Figura 5). A pRb, uma proteína supressora tumoral, é mantida na forma não fosforilada quando as células estão em um estado quiescente (não proliferativo), e encontra-se ligada ao fator de transcrição E2F, inativando-o e impedindo que este ative a transcrição de genes envolvidos na fase S, evitando a progressão do ciclo (Cruz-Gálvez *et al.*, 2022). Durante a fase G1, o complexo ciclina D-CDK4/6 fosforila a proteína Rb gradualmente, o que induz a dissociação de pRb, liberando o fator E2F para transcrever seus genes alvo, a exemplo das ciclinas A e E (Hume *et al.*, 2020). A formação do complexo CDK4/6 leva à ativação da CDK2, que por sua vez emparelha com as ciclinas E, permitindo a passagem das células através do ponto de verificação entre as fases G1/S, bem

como o início da fase S. Por sua vez, as ciclinas do tipo A são sintetizados no início da fase S, formando complexos com a CDK2, os quais fosforilam proteínas envolvidas na replicação do DNA e conduzem à progressão celular para a fase G2 (Hume *et al.*, 2020) (Figura 5).

Logo após a replicação do DNA as células entram para a **fase G2**, onde continuam a aumentar sua estrutura e ocorre a preparação de proteínas com funções na montagem do fuso mitótico, segregação cromossômica e citocinese (Fischer *et al.*, 2022). Além disso, nesta etapa é encontrado o segundo ponto de verificação de danos ao DNA, onde as trajetórias de parada convergem para um estado de senescência celular irreversível, impedindo que as células danificadas entrem na mitose (Stallaert *et al.*, 2022).

Caso estejam íntegras, as células podem progredir para a **fase M**, onde ocorre a divisão celular propriamente dita, em que o material genético é segregado igualmente formando duas células-filhas (Wang, 2022).

Figura 3. Reguladores da progressão do ciclo celular.



Fonte: Adaptado de Wang., 2022

Os complexos CDK4 e/ou CDK6 são formados com as ciclinas tipo D, que ativam o CDK4/6 e iniciam a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb) na fase inicial do G1. A fosforilação Rb estimula a liberação do fator de transcrição E2F, que então estimula a transcrição dos genes responsivos (ciclinas A e E) necessários para a progressão do ciclo

celular. Na fase tardia do G1, a ciclina E liga-se e ativa CDK2, o que leva à fosforilação completa de Rb e à posterior ativação da transcrição mediada por E2F. Juntos, os eventos acima conduzem a passagem da célula através do ponto de verificação entre as fases G1/S e iniciam a fase S. No início da fase S, as ciclinas do tipo A são sintetizadas e formam complexos com CDK2, que fosforilam proteínas envolvidas na replicação do DNA e conduzem a progressão celular para a fase G2. Na fase final do G2, o complexo CDK1/ciclina A é formado e ativado, o que é necessário para a transição G2/M e o início da prófase. Finalmente, os complexos CDK1/ciclina B são formados na fase M e conduzem à conclusão da mitose.

Assim, o eixo cíclico-dependente da quinase (CDK)-pRb-E2F constitui a principal maquinaria transcricional que impulsiona a progressão do ciclo celular, regulando o momento e a precisão da replicação do genoma. Esse sistema garante que o material genético seja transmitido corretamente a cada ciclo de divisão celular (Kent; Leone, 2019). Quando o controle do ciclo celular é comprometido, podem surgir doenças relacionadas ao crescimento descontrolado, como o câncer. A instabilidade genômica é uma das principais causas de alterações genéticas e da heterogeneidade em células cancerígenas, resultando de falhas nos mecanismos de reparo do DNA, na ação de inibidores dos pontos de verificação do ciclo celular e em danos no DNA (Jamasbi *et al.*, 2022).

Além disso, a desregulação da via da ciclina D-CDK4/6-pRb representa um papel central da resistência endócrina em câncer de mama. Por isso, torna-se primordial identificar alterações nos componentes da maquinaria do ciclo celular que distinguem células cancerígenas das células não tumorais. Neste contexto, um grande avanço para a terapia do câncer de mama veio com o desenvolvimento de inibidores de CDK4/6, que revolucionaram o tratamento em estágios avançados, aumentando a sobrevida quando usado em combinação com terapias hormonais (Foy *et al.*, 2023).

Várias gerações de medicamentos inibidores de CDKs foram desenvolvidas durante os últimos anos. A primeira geração de medicamentos direcionados às CDKs (flavopiridol, roscovitina, olomucina) foram de inibidores não seletivos, entretanto não se mostraram tão eficazes em ensaios clínicos. Com isso, uma segunda geração foi desenvolvida, com o intuito de atuar de forma direcionada em CDKs (dinaciciclib, AT7519, R547, SNS-032, BMS-387032, AZD5438, AG-024322), porém, durante os estudos foram relatados alta toxicidade, baixa especificidade e seletividade à família CDK (De Groot, *et al.*, 2017). Por fim, uma terceira geração de drogas CDKs dirigidas foram desenvolvidas para as CDKs4/6. Em particular, três

inibidores de CDK4/6, o palbociclib, ribociclib e abemaciclib, foram testados em ensaios clínicos e mostraram resultados promissores (De Luca *et al.*, 2018; Piezzo *et al.*, 2020). Atualmente são utilizados em pacientes para o tratamento de câncer de mama metastático (Yoon *et al.*, 2020).

Neste cenário, devido à importância do ciclo celular, o desenvolvimento de novos compostos que atuem em moléculas primordiais regulatórias deste processo representa um alvo atrativo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas antitumorais.

2.4 Morte celular por apoptose

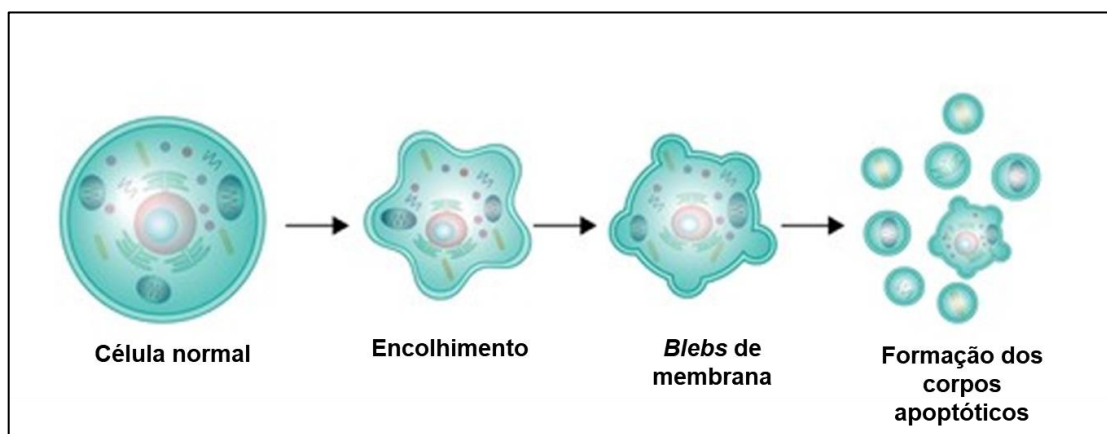
A morte celular programada é reconhecida como um importante pilar da homeostase em organismos multicelulares, com funções fisiológicas e patológicas (Newton *et al.*, 2024). A proliferação celular é regulada pela apoptose à medida que o corpo elimina células antigas, disfuncionais, infectadas ou mutantes. Muitos processos fisiológicos requerem morte celular para sua função (por exemplo, desenvolvimento embrionário e seleção imune de células B e T). Assim, a cada dia, bilhões de células morrem e são rapidamente removidas por fagócitos (Tang *et al.*, 2019).

Portanto, interromper o equilíbrio homeostático entre a proliferação celular e a morte celular resultará em disfunção do organismo, pois, a proliferação desregulada e mecanismos de morte interrompidos, contribui para doenças seja causadas por excesso de proliferação, como câncer, ou causadas por baixa proliferação e/ou mecanismos de morte desregulados causando morte celular desordenada, que leva a distúrbios degenerativos, como doenças neurodegenerativas (Obeng., 2021).

O programa de morte celular por apoptose é reconhecido com base em suas características morfológicas e bioquímicas, como liberação do citocromo c das mitocôndrias, processo que é controlado pelo equilíbrio entre proteínas proapoptóticas e antiapoptóticas da família BCL-2, além da ativação sequencial de caspases iniciadoras (como caspase-8, -9 e -10) e caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7). Esse mecanismo culmina com a degradação da membrana nuclear, condensação de cromatina, clivagem de diversas proteínas intracelulares, incluindo

PARP, redução do tamanho celular, formação de “*blebs*” de membrana, fragmentação do DNA em estruturas nucleossomas e formação de corpos apoptóticos (Newton *et al.*, 2024) (Figura 5).

Figura 4. Processo de morte celular por apoptose.



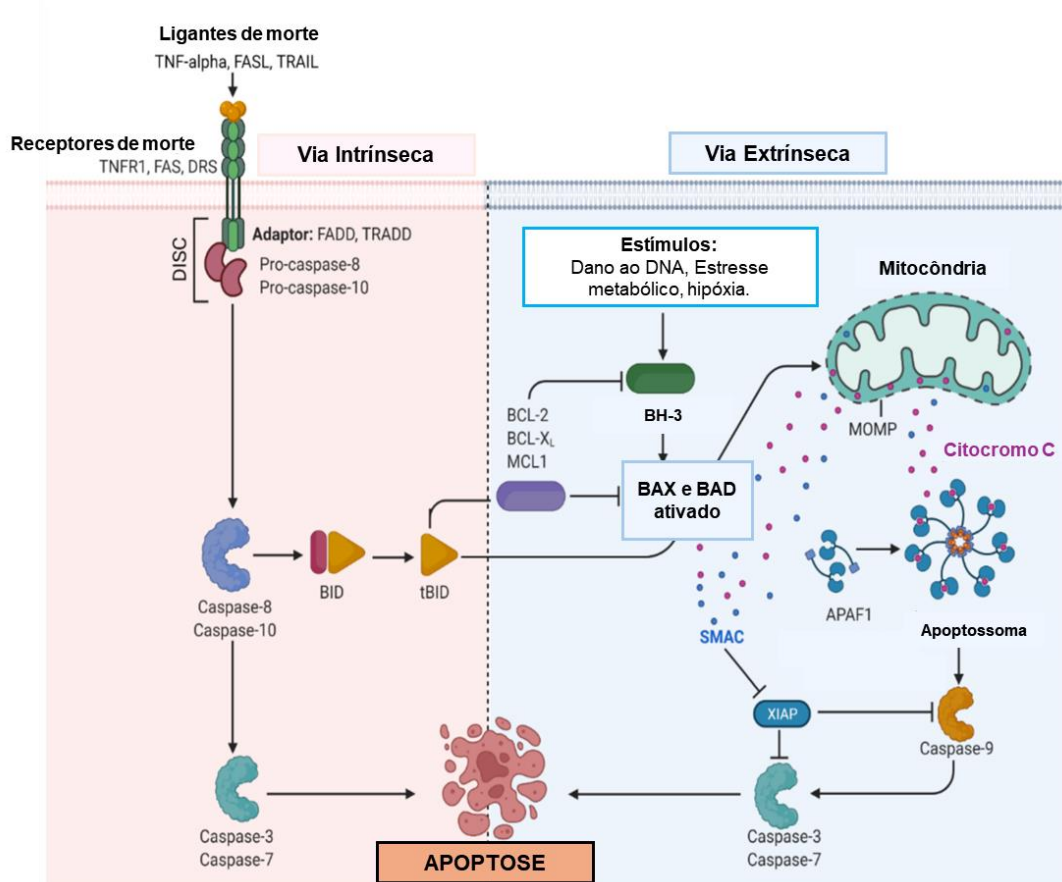
Durante o processo de apoptose, a célula passa por várias mudanças morfológicas características: inicialmente, ela sofre encolhimento e alteração em seu formato. Em seguida, ocorre a degradação da membrana nuclear, acompanhada pela condensação e fragmentação da cromatina. Esses eventos culminam na formação de protrusões na membrana plasmática, conhecidas como *blebs*, que posteriormente se desprendem, originando os corpos apoptóticos.

Fonte: Adaptado de Ketelut-Carneiro e Fitzgerald, 2022.

As vias da apoptose incluem processos celulares que podem ser ativados pelo estresse celular, danos ao DNA e/ou mecanismos de vigilância imunológica de forma intrínseca, através da permeabilização da membrana externa mitocondrial, e/ou de forma extrínseca, acionada na superfície celular pela ativação de receptores de morte (Carneiro; El-Deiry., 2020). A **via intrínseca** é ativada pela oligomerização das proteínas da família das células BCL-2, BAD e BAX. Os oligômeros BAD/BAX formam poros na membrana externa mitocondrial, levando à liberação do citocromo c no citosol. A ativação de BAD/BAX é regulada por proteínas pro-apoptóticas (tBID) ou anti-apoptóticas (família da BCL-2). O citocromo c liga-se ao Apaf-1, que recruta procaspase-9, formando o apoptossoma. No apoptossoma, a caspase-9 é ativada por clivagem auto-proteolítica, iniciando a cascata de processamento de caspases, ativando caspases efetoras 3/7 e iniciando morte celular programada (figura 6) (Ketelut-Carneiro e Fitzgerald, 2022).

A **via extrínseca** é iniciada pela ativação do receptor de morte celular, como o receptor do tipo FAS ou receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), esses receptores apresentam domínio intracelular que recruta a proteína adaptadora FADD, proteína de morte associada ao FAS, ou a proteína adaptadora TRADD, proteína da morte associada ao TNFR. Na ativação do receptor FAS pela ligação do FASL, ocorre o recrutamento da proteína adaptadora FADD, a adaptadora permite ligação da pró-caspase 8 formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Esse complexo DISC permite a ativação da caspase 8, que ativa diretamente as caspases efetoras 3/7 (Wani, *et al.*, 2023). Contudo, uma amplificação na ativação da via pode acontecer. A caspase 8, ativa a proteína da família BH3 pró-apoptótica BID em tBID (BID truncado) essa proteína ativada é capaz de levar a apoptose por via mitocondrial, ativando proteínas pro-apoptóticas como as da família BAX e BAD, como ocorre na via intrínseca. (Bertheloot *et al.*, 2021). A ativação das caspases efetoras, como as caspases 3/7, levam a clivagem de diversas proteínas causando as mudanças na estrutura celular resultando por fim na formação dos corpos apoptóticos (Bedoui, *et al.*, 2020).

Figura 5. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose



Mecanismo de ativação das vias moleculares intrínseca e extrínseca da morte celular programada. Ambas as vias dependem de sinais específicos para sua iniciação, desencadeando uma cascata de eventos moleculares. Esses eventos ativam as caspases iniciadoras, que, por sua vez, levam à ativação das caspases de execução, como a caspase-3. Na via extrínseca, moléculas como o fator de necrose tumoral (TNF) e o ligante Fas (FasL) interagem com seus receptores de morte, juntamente com a pro-caspase 8/10 formando um complexo de morte (DISC). Esse complexo por sua vez ativa caspases efectoras responsáveis pela execução da morte celular por apoptose. Entretanto caspases iniciadoras ativadas na via extrínseca, podem ativar proteínas citoplasmáticas ativadoras de proteínas pró-apoptóticas. Na via intrínseca, proteínas como BAX e BAD desempenham um papel central, promovendo a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) e liberando fatores pró-apoptóticos, como o ativador da caspase derivado da mitocôndria (SMAC) e citocromo C. O Apoptossoma é formado, caspase 9 é ativada para em seguida ativar caspases efectoras ou de execução, como caspases 3/7. Esse, processo é regulado por inibidores como o XIAP (inibidor X da apoptose), que controla a atividade das caspases, garantindo que o mecanismo de morte celular seja cuidadosamente modulado. Fonte: Adaptado de Wani *et al.*, 2023

Além disso, durante a apoptose, ocorre a externalização da fosfatidilserina, mediada por um mecanismo dependente da caspase-3/7 que ativa a proteína Xkr8. Essa proteína facilita a rápida translocação dos fosfolípidos entre as camadas da bicamada lipídica da membrana celular, promovendo a externalização da fosfatidilserina (Suzuki *et al.*, 2013). Uma vez exposta na superfície das vesículas extracelulares apoptóticas, a fosfatidilserina atua como um sinal de reconhecimento

para fagócitos, e exerce uma função imunorregulador, induzindo a expressão e secreção do fator anti-inflamatório TGF- β pelos fagócitos. Entretanto, no câncer as células possuem a capacidade de suprimir a expressão de Xkr8, evitando assim a detecção e eliminação pelos fagócitos (Segawa *et al.*, 2021).

O câncer é caracterizado por um desequilíbrio entre o ganho e a perda celular, em que a taxa de proliferação das células tumorais mutantes supera a taxa de morte celular. Como resultado, essas células perdem a capacidade de ativar proteínas proapoptóticas e caspases essenciais para as vias de morte programada. Essa resistência afeta diretamente a eficácia dos tratamentos, já que a indução da morte celular depende da ativação dessas proteases (Morana *et al.*, 2022).

No câncer de mama, mutações e alterações nas vias de apoptose são comuns e causando resistência das células tumorais à morte programada. Essas alterações podem ocorrer em genes que regulam a apoptose, como os da família BCL-2, TP53, e nas caspases, resultando em um desequilíbrio entre os sinais de sobrevivência e morte celular (Liu *et al.*, 2023). Além disso, a superexpressão de IAPs, também contribui para a resistência à apoptose. Essas proteínas bloqueiam a atividade das caspases e promovem a sobrevivência das células tumorais (Liang *et al.*, 2020).

A resistência à apoptose é uma das marcas registradas do câncer, independentemente de sua causa e tipo, e é, portanto, um dos principais alvos da terapia contra o câncer (Kumar *et al.*, 2019). Muitos fitoquímicos são relatados para induzir a apoptose de células cancerígenas, como resveratrol, epigallocatequina galato (EGCG), curcumina, withaferin A e o ácido betulina (3-O-(E)-Coumaroil betulina) (Kushwaha *et al.*, 2020). A terapia antiestrogênica com tamoxifeno tornou-se o padrão de tratamento do câncer de mama ER-positivo por décadas e até o momento, por induzir morte celular e devido aos efeitos colaterais sistêmicos mais baixos. No entanto, descobriu-se que o tamoxifeno pode induzir câncer de endométrio em mulheres na pós-menopausa durante a terapia adjuvante de longo prazo devido à presença de propriedades semelhantes ao estrogênio no endométrio (Maximov *et al.*, 2022).

Dessa forma, é notório o quanto é relevante investir em novas abordagens terapêuticas que visam reativar a apoptose ou inibir as proteínas antiapoptóticas para induzir morte em células de câncer de mama.

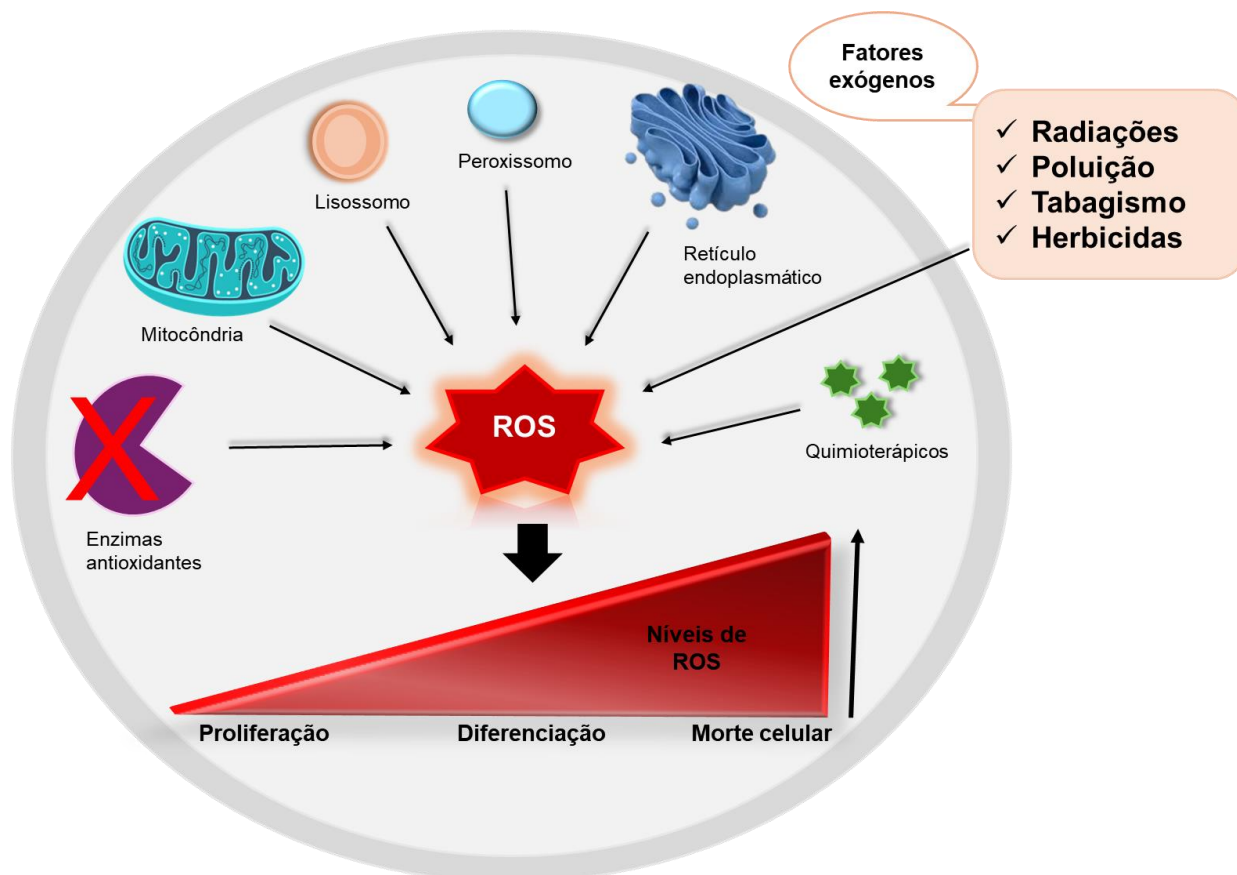
2.5 Estresse oxidativo e o câncer

Estresse oxidativo tornou-se um termo geral para descrever níveis intracelulares excessivos de espécies reativas de oxigênio (EROs), devido a um desequilíbrio entre a produção de EROs e o sistema de defesa antioxidante (Akiyama; Ivanov., 2024).

Essas espécies, são moléculas contendo oxigênio que são geradas como subprodutos durante o metabolismo celular, dentre elas: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH). O oxigênio é o radical livre mais conhecido, quando um dos seus elétrons é desemparelhado tornam-se moléculas instáveis e altamente reativas, buscando constantemente sua estabilidade (Yoshikawa; You., 2024). Com isso essas moléculas reagem facilmente se ligando ao DNA, lipídios e proteínas das células causando quebras em cadeias de DNA e mutações pontuais. Por consequência o acúmulo de danos ao DNA leva à ruptura das funções celulares, contribuindo para a carcinogênese (Dai *et al.*, 2023).

Portanto, EROs são geradas a todo momento de forma exógena ou endógena (Figura 6). Os fatores externos que mais influenciam são: poluição do ar, tabagismo, herbicidas e radiações. Processos fisiológicos, também levam à produção de uma grande quantidade de ROS, os radicais livres são constantemente gerados dentro das mitocôndrias, como também por fagócitos (Masenga *et al.*, 2023). Além disso, existem outras fontes de produção de EROs endógenas, incluindo o retículo endoplasmático, peroxissomos, citocromo P450 (Kalyane *et al.*, 2022).

Figura 6. Fatores endógenos e exógenos que causam estresse oxidativo e efeitos dos diferentes níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células saudáveis e tumorais.



Significado dos níveis de ROS no câncer. Níveis ótimos de ROS são necessários para a proliferação celular adequada. Se os níveis de ROS forem elevados acima do normal devido a algumas razões, por exemplo, a inibição de enzimas antioxidantes, aumentar a produção de EROs por mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, retículo endoplasmático (ER) e o uso de quimioterápicos aumentarão os níveis de EROs em tal medida que levará à morte celular apoptótica. EROs desempenham o papel de segundos mensageiros intracelulares em concentrações baixas, participando da comunicação celular e regulando diversas funções fisiológicas. Em níveis moderados, as EROs podem inibir a atividade antioxidante, reduzindo a capacidade celular de neutralizar esses radicais, o que contribui para a sobrevivência e progressão das células cancerígenas. Já em concentrações excessivas, as EROs induzem estresse oxidativo, causando danos significativos a componentes biológicos, como o DNA. Esse desequilíbrio pode ativar vias apoptóticas, levando à morte celular programada (apoptose).

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

Em condições fisiológicas, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é equilibrada pela ação de antioxidantes, que neutralizam essas moléculas reativas e preservam a homeostase celular (Jakubczyk *et al.*, 2020). O sistema de defesa antioxidante é composto, predominantemente, por enzimas como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GSR), peroxirredoxina (Prx) e tioredoxina (Trx). Além disso, existem os

antioxidantes não enzimáticos, composto pelas vitaminas C, E e A (Vilchis-Landeros *et al.*, 2024).

A principal função desse sistema é proteger o organismo e seus tecidos contra os danos celulares induzidos por ROS. Contudo, quando as concentrações dessas espécies reativas ultrapassam um limite crítico, os efeitos deletérios prevalecem sobre os benefícios, sobrecarregando os mecanismos antioxidantes. A incapacidade de manter a homeostase redox, seja pela superprodução de EROs ou pela perda da capacidade de eliminação de EROs, resulta no estresse oxidativo (Olufunmilayo *et al.*, 2023).

Estudos indicam que a disfunção dos mecanismos antioxidantes contribui para o início e a progressão do câncer (Reczek *et al.*, 2017; Zinczuk *et al.*, 2019). O excesso de espécies reativas de oxigênio, pode causar danos significativos a várias estruturas celulares, como lipídios, proteínas e DNA, comprometendo suas funções normais. Por essa razão, o estresse oxidativo está fortemente associado a diversas doenças humanas, incluindo o câncer (Jomova *et al.*, 2023; Ushio-Fukai *et al.*, 2021).

Além disso, o aumento das EROs pode ser impulsionado pela superexpressão de oncogenes, como Ras, myc e telomerase. Esse aumento ativa vias de transdução de sinal, cruciais para o crescimento celular, como Akt/PI3K/mTOR (Bel'skaya *et al.*, 2024) e ainda promove a ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento e à progressão do câncer (Dai *et al.*, 2023). Também interfere em vias de sinalização fundamentais, como Keap1-Nrf2, que regula tradicionalmente o estresse oxidativo e está associada a genes supressores tumorais, incluindo p53, BRCA1, BRCA2 e RB1 (Bardelčíková *et al.*, 2023).

Os níveis de EROs e antioxidantes são consideravelmente mais elevados em células cancerígenas em comparação com células normais (Figura 8). O equilíbrio preciso entre EROs e antioxidantes é essencial para a sobrevivência do tumor, uma vez que uma redução nos níveis de antioxidantes e/ou um aumento excessivo de EROs além da capacidade de tolerância, pode levar à morte celular (Kalyane *et al.*, 2022).

Os efeitos das espécies reativas de oxigênio (ROS) em células saudáveis e tumorais variam conforme sua concentração e o tipo celular. Esses efeitos são geralmente classificados em níveis baixos, moderados e altos, cada um exercendo influências distintas sobre as células (Sarmiento-Salinas *et al.*, 2021). Em **níveis baixos** atuam como sinalizadores intracelulares, regulando processos essenciais como proliferação, diferenciação e resposta imune; em **níveis moderados** promovem a progressão tumoral, estimulando migração, invasão e metástase. Além disso, favorecem a resistência ao tratamento ao ativar mecanismos antioxidantes endógenos que protegem as células cancerígenas contra terapias como quimioterapia e radioterapia. (Ray *et al.*, 2024). Em contrapartida, a oxidação de proteínas e o dano ao DNA induzido por **altos níveis** de ROS são fatores determinantes para morte celular ou apoptose (Milkovic *et al.*, 2019).

Apesar dos níveis elevados de EROs nas células tumorais em comparação às células saudáveis, essas células demonstram maior sensibilidade a aumentos adicionais de EROs intracelulares. Isso está relacionada às características metabólicas únicas dessas células e aos mecanismos que elas utilizam para sobreviver em ambientes estressantes (Wang, *et al.*, 2021). Apesar da adaptação, as células tumorais operam no limite do estresse oxidativo, pequenos aumentos adicionais nos níveis de EROs podem ultrapassar esse limiar, levando à disfunção celular e consequente morte celular. Contudo, essa vulnerabilidade pode ser explorada como uma estratégia promissora para o tratamento do câncer (Hable, *et al.*, 2022).

Drogas anticancerígenas, como irinotecano, bleomicina, mitomicina C, cisplatina e neocarzinostina, exercem sua ação terapêutica induzindo a produção de radicais livres, os quais promovem a morte das células tumorais (Iqbal *et al.*, 2024). A doxorubicina, amplamente reconhecida como uma das drogas antitumorais mais eficazes, é utilizada no tratamento de diversos tipos de tumores. Seu mecanismo de ação envolve a intercalação no DNA e a inibição da atividade enzimática da topoisomerase II. Entretanto, o uso clínico da doxorubicina é severamente limitado pela devido aos seus efeitos colaterais (Hernandes *et al.*, 2023).

Estratégias terapêuticas destinadas a atingir o estresse oxidativo têm emergido como uma área crítica de investigação, com o objetivo de limitar o tempo de resposta de vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama. O desenvolvimento de terapias direcionadas e intervenções que abordem

especificamente o impacto do estresse oxidativo no início e progressão do câncer é uma grande promessa na melhoria dos resultados dos pacientes (Liu *et al.*, 2022).

Compreender o papel das ROS no desenvolvimento do câncer é essencial para o desenvolvimento de estratégias para prevenir e tratar o câncer. Com isso, EROs e vias relacionadas ao estresse oxidativo tem sido explorado como uma abordagem potencial para a terapia do câncer.

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

A sinalização extracelular alcança alvos intracelulares através de múltiplas vias, entre essas redes de sinalização estão as MAPKs (Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos) (Guo *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2024), formadas por uma família de serina/treonina quinases que participam de vários processos celulares cruciais, como proliferação, sobrevivência, diferenciação, apoptose, angiogênese, migração e metástase (Yue; Lopez, 2020; Mandal *et al.*, 2023).

Na maioria desses processos, as MAPKs exibem um papel duplo, atuando como ativadores e/ou inibidores, dependendo do tipo celular e dos estímulos recebidos (Rovida e Tusa, 2022). A ativação ou inibição anormal dessas proteínas, ou de seus fatores de transcrição a jusante, podem resultar em crescimento descontrolado associado ao desenvolvimento e manutenção de tumores malignos (Drosten; Barbacid, 2020).

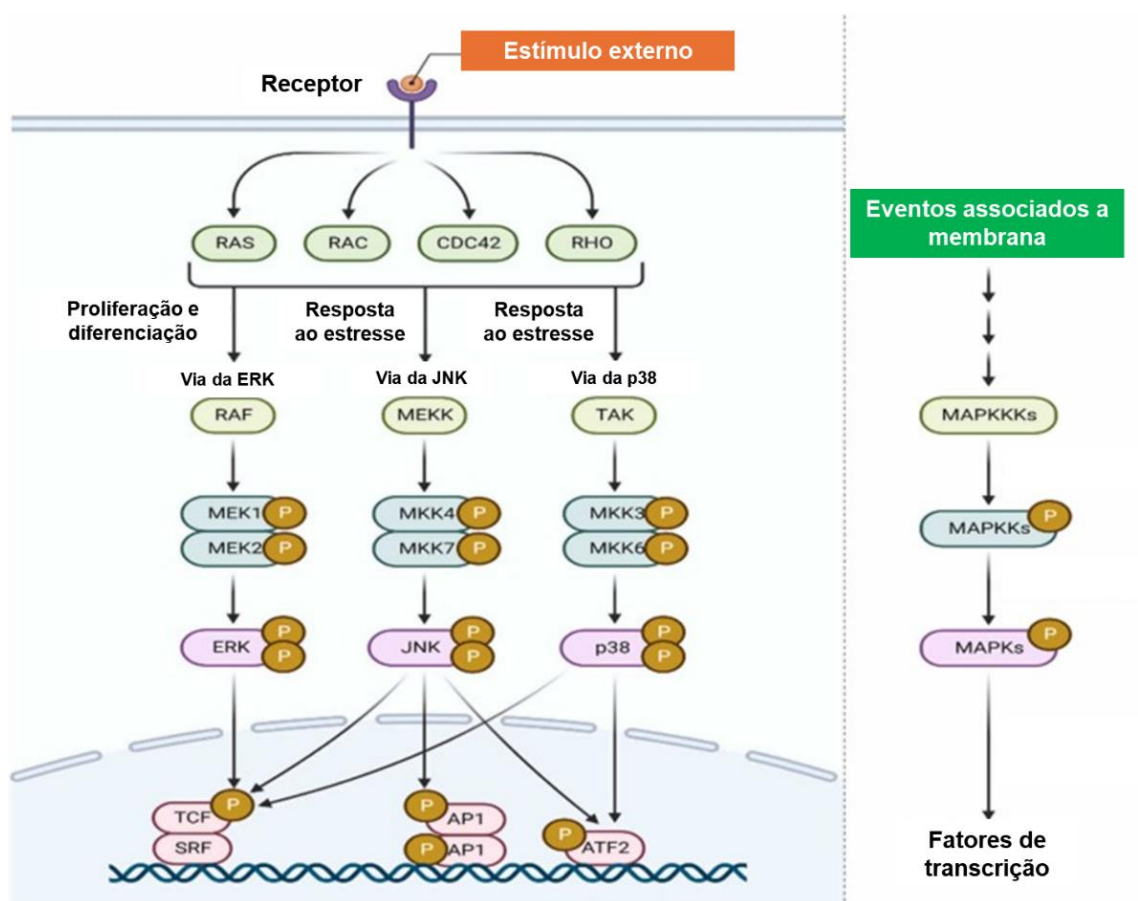
As cascatas de sinalização das MAPKs transmitem sinais através da ativação sequencial de três a cinco complexos de cinases. A ativação dessas vias pode ser iniciada por receptores tirosina cinase (RTKs) que ao serem estimulados por sinais extracelulares, ativam proteínas de ligação ao GTP, como as proteínas Ras e Rac (Shi *et al.*, 2024).

Esse processo desencadeia uma série de eventos moleculares em cascata: as MAPK cinase cinases (MAPKKKs) fosforilam e ativam as MAPK cinases (MAPKKs), que, por sua vez, fosforilam e ativam as MAPKs. As MAPKs ativadas são capazes de fosforilar diversos alvos intracelulares, incluindo fatores de transcrição, proteínas reguladoras e outros componentes críticos para processos celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose (Figura 7) (García Hernández *et al.*, 2022).

Nesse contexto, as três primeiras cinases (MAPKKKs, MAPKKs e MAPKs) formam uma unidade central fundamental para a sinalização. As duas camadas adicionais, observadas em algumas cascatas, podem variar conforme o tipo celular e os estímulos específicos, conferindo maior especificidade e controle ao processo (Saleem, 2024).

Quatro cascatas MAPK principais foram definidas com base em seus componentes: Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares 1 e 2 (ERK1/2), Cinases c-Jun N-terminal 1, 2 e 3 (JNK1, JNK2 e JNK3, respectivamente) e 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) (Pua *et al.*, 2022) (Figura 7).

Figura 7. Vias de sinalização das Proteínas Cinase Ativadas por Mitógenos (MAPKs).



As vias de transdução de sinal MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) compreendem três principais cascatas de sinalização, formadas por três tipos de quinases em seu núcleo: MAPKKK (quinase da MAPK de nível 3), MAPKK (quinase da MAPK de nível 2) e MAPK (quinase da MAPK de nível 1). Essas cascatas iniciam-se com a recepção de estímulos externos por receptores transmembranares, que ativam uma sequência de eventos intracelulares. A via MAPK é um complexo sistema de proteínas que conecta os receptores na superfície celular ao DNA no núcleo, transmitindo informações extracelulares para gerar uma ampla gama de respostas biológicas. Durante sua

ativação, ocorrem sucessivas fosforilações em cada componente da cascata, o que culmina na ativação de fatores de transcrição que regulam genes na região promotora, tanto no citoplasma quanto no núcleo. Fonte: adaptado de Saleem., 2024.

A literatura tem relatado o papel desta via como um alvo chave para o tratamento do câncer de mama (Wen *et al.*, 2019).

Produtos naturais derivados de plantas têm sido reconhecidos por sua diversidade estrutural como fármacos que atuam nas MAPKs e regulam a proliferação e morte celular no câncer (Chopra *et al.*, 2021). Compostos como a curcumina (Aggarwal *et al.*, 2003), resveratrol (Aggarwal *et al.*, 2004), [6]-gingerol (Kim *et al.*, 2004), capsaicina (Min *et al.*, 2004), galato de epigallocatequina (Khan *et al.*, 2006), genisteína (Sarkar *et al.*, 2006), flavopiridol (Takada *et al.*, 2004) e silimarina (Gazak *et al.*, 2007) são fitoquímicos já conhecidos por suas propriedades antitumorais visando as MAPKs (Deorukhkar *et al.*, 2007). Portanto, as proteínas da via MAPK são alvos terapêuticos promissores na busca por novos produtos anticâncer de fontes naturais.

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

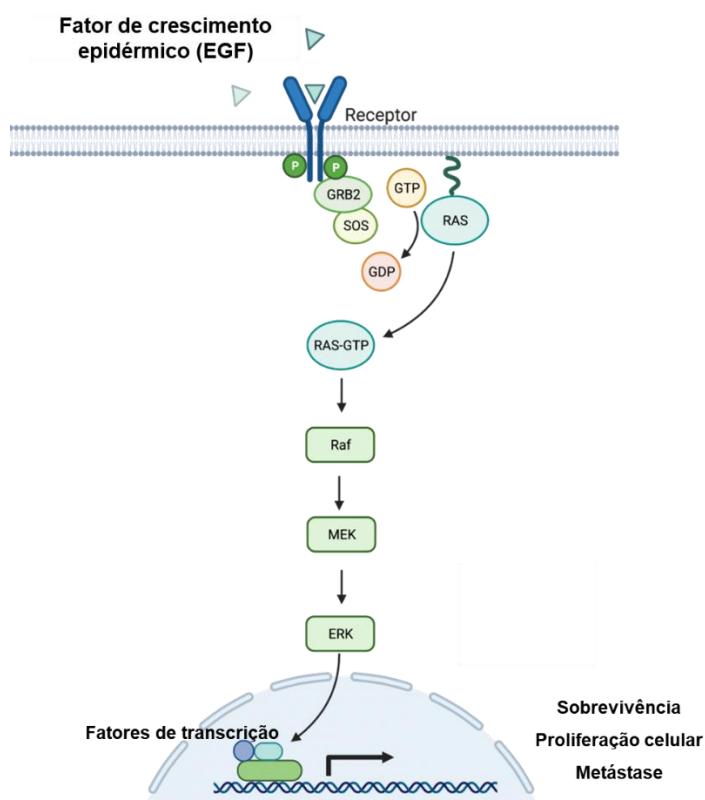
A ERK (do inglês, *Extracellular Signal-Regulated Kinase*) é uma cinase citoplasmática terminal ativada em resposta à estímulos fisiológicos, como fatores de crescimento, hormônios e estímulos pró-inflamatórios (Pua *et al.*, 2022). Quando a cascata MAPK/ERK é ativada, o ERK1/2 é fosforilado, o que induz a transcrição de sua região promotora do citoplasma ao núcleo (Hewitt; Lloyd, 2021).

As proteínas ERK incluem dois membros altamente homólogos, ERK1 e ERK2, que possuem um domínio de cinase central flanqueado por caudas curtas N- e C-terminais (Drosten; Barbacid, 2020). Estas duas isoformas têm funções redundantes, embora com padrões de expressão diferentes, agindo por meio do reconhecimento e fosforilação de vários substratos, incluindo fatores de transcrição, cinases, fosfatases e outras proteínas funcionais que podem influenciar a proliferação e sobrevivência de células cancerígenas (Yuan *et al.*, 2020).

De forma geral, a via de sinalização MAPK/ERK (Figura 8) é ativada pela transdução de sinais a partir de receptores de superfície celular, como os receptores de tirosina quinase (RTKs) e os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (Wen *et al.*, 2024). A interação de diferentes ligantes à estes receptores resulta em sua

mudança conformacional, que por sua vez ativa tirosina quinases citoplasmáticas (TKs), que fosforilam resíduos de tirosina dos receptores e promove o recrutamento de complexos adaptadores para a membrana plasmática, como por exemplo, GRB2 (do inglês, *growth-factor-receptor bound-2*), Shc (do inglês) e SOS (do inglês *Son of Sevenless*) (Paudel *et al.*, 2021). Esse processo ativa RAS, convertendo-o da forma inativa (ligada ao GDP) para a forma ativa (ligada ao GTP) (Moon; Ro, 2021). Após a ativação de RAS, a serina/treonina quinase RAF (A-RAF, B-RAF e C-RAF) é recrutada para a membrana celular e ativada. As RAFs, por sua vez, ativam diretamente as quinases MEK1 e MEK2 (proteínas de quinases extracelulares/mitógenos), que fosforilam e ativam as ERKs (ERK1 e ERK2, também conhecidas como MAPK3 e MAPK1) (Dimri; Satyanarayana, 2020).

Figura 8. Cascata de sinalização das Proteínas Cinasas Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK).



Via de sinalização clássica de Ras-Raf-MEK-ERK $1/2$. Os sinais extracelulares estimulam os receptores acoplados à proteína G (GPCRs), receptores tirosina quinase (RTKs) e as integrinas de membrana, ao sofrerem suas respectivas mudanças ativam a ERK $1/2$, através de uma série de reações em cascata. ERK $1/2$ é geralmente localizado no citoplasma. Uma vez ativado, o ERK $1/2$ cruza rapidamente a membrana nuclear, reativa os fatores de transcrição, regula a transcrição dos genes-alvo, induz a expressão ou ativação de proteínas específicas para regular o metabolismo e a função celular.

Fonte: adaptado de Melissa Hardy, 2020.

Uma vez ativadas, as ERKs fosforiladas translocam-se para o núcleo, onde ativam fatores de transcrição como c-Myc e c-FOS, c-JUN (Lavoie; Gagnon, 2020). Esses fatores de transcrição ligam-se aos sítios nas regiões promotoras de genes relacionados à progressão do ciclo celular resultando em sobrevivência e proliferação celular (Figura 8) (Moon; Ro, 2021).

A via MEK-ERK está relacionada à manutenção da homeostase celular em condições fisiológicas, atuando em diferentes processos celulares importantes, como exemplo na: I) inibição do excesso de EROs (Feng *et al.*, 2021); II) manutenção da homeostase de linfócitos durante processos inflamatórios (Simula *et al.*, 2020); III) regulação da apoptose, por exemplo por meio da ativação do fator apoptogênico BIM, que por sua vez interage com JNK1 para acionar a apoptose (Simula *et al.*, 2020); IV) promoção da sobrevivência de células saudáveis, através da inibição da ativação de proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2 (como BAX e BIM), bem como pela indução da expressão de membros anti-apoptóticos da família BCL-2 (como BCL-2, BCL-XL e MCL-1) (Yue; Lopez, 2022).

No câncer, a ativação contínua da via de sinalização ERK é capaz de regular os níveis de proteínas da família BCL-2, a exemplo das proteínas pró-apoptóticas BIM, Bax e p53, assim como ativar as proteínas anti-apoptóticas MCL-1 e BCL-2, promovendo o crescimento do tumor. A ativação de ERK1/2 também pode inibir a apoptose induzida pelos receptores de morte Fas ou TNF (via de morte extrínseca) (Guo *et al.*, 2020). De fato, ERK desempenha um papel fundamental em vários estágios da progressão do câncer, incluindo a invasão tumoral, metástase, degradação da matriz extracelular, angiogênese e migração de células tumorais. Por outro lado, evidências da literatura indicam que ERK também pode promover a morte celular ativando a via apoptótica intrínseca, facilitando a liberação do citocromo C da mitocôndria e a ativação da caspase-9 (Bahar *et al.*, 2023).

Os papéis de ERK no início e na progressão do câncer vêm sendo elucidados, e as moléculas de sinalização MEK1/ERK1 estão emergindo cada vez mais como alvos relevantes para a terapia do câncer (Tubita *et al.*, 2020; Pearson *et al.*, 2020; Erazo *et al.*, 2020). Nesse contexto, muitas moléculas têm sido regularmente aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de tumores, sendo a maioria deles direcionada à proliferação e ao metabolismo das células tumorais por meio da via RAS-RAF-MEK-ERK, envolvida na proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (Bedard *et al.*, 2020).

Mutações nos genes RAS, incluindo a mutação KRAS G12C, foram identificadas em diferentes tipos de câncer (Yuan *et al.*, 2020; Drosten *et al.*, 2020). Ostrem e colaboradores (2013) foram os primeiros a relatar um composto, denominado *composto-12*, capaz de se ligar irreversivelmente à cisteína presente na mutação KRAS G12C, impedindo a ativação da ERK. A partir desse achado inicial, diversas otimizações estruturais levaram ao desenvolvimento de inibidores mais eficazes, como o AMG510 (*Sotorasib*) (Canon *et al.*, 2019; FDA, 2021) e o MRTX849 (*Adagrasib*) (Hallin *et al.*, 2020). Ambos os compostos foram desenvolvidos como inibidores covalentes específicos KRAS G12C mutado, e já foram lançados no mercado, representando avanços significativos no tratamento de cânceres associados a essa mutação (Song *et al.*, 2023).

Entretanto, apesar de seus efeitos pró-tumorais, é relatado que ERK apresenta um papel duplo na carcinogênese, podendo suprimir vias de sobrevivência celular, a exemplo da via PI3K/AKT, promovendo assim a morte das células tumorais (Sigiura *et al.*, 2021). A intensidade da ativação do ERK no câncer controla a decisão entre proliferação, senescência e apoptose. Um estudo realizado por Kong e colaboradores (2017), observou que a atividade alta da ERK foi responsável pela morte celular em células de melanoma SK-MEL. Adicionalmente, o tratamento da linhagem de células de câncer pancreático (Panc-1) com o composto FOLFIRINOX induziu uma parada de crescimento e senescência, por induzir um aumento de ERK e p21 fosforiladas, além de induziu a apoptose pela presença de caspase clivada 3. Assim, vários mecanismos potenciais estão agindo ao estimular alta sinalização de ERK que pode interromper a progressão do tumor (Rowel *et al.*, 2023).

Portanto, dado os seus papéis duais, a cascata de sinalização ERK e suas proteínas associadas são reconhecidas como alvos terapêuticos críticos no tratamento do câncer (Ali *et al.*, 2022).

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

A proteína c-Jun N-terminal kinase (JNK), membro da família de MAPKs, também conhecida como SAPK (proteína kinase ativada por estresse), apresenta três isoformas conhecidas como JNK1 (MAPK8), JNK2 (MAPK9) e JNK3 (MAPK10) (Tam; Law, 2021). As JNK1 e JNK2 estão presentes na maioria dos tecidos,

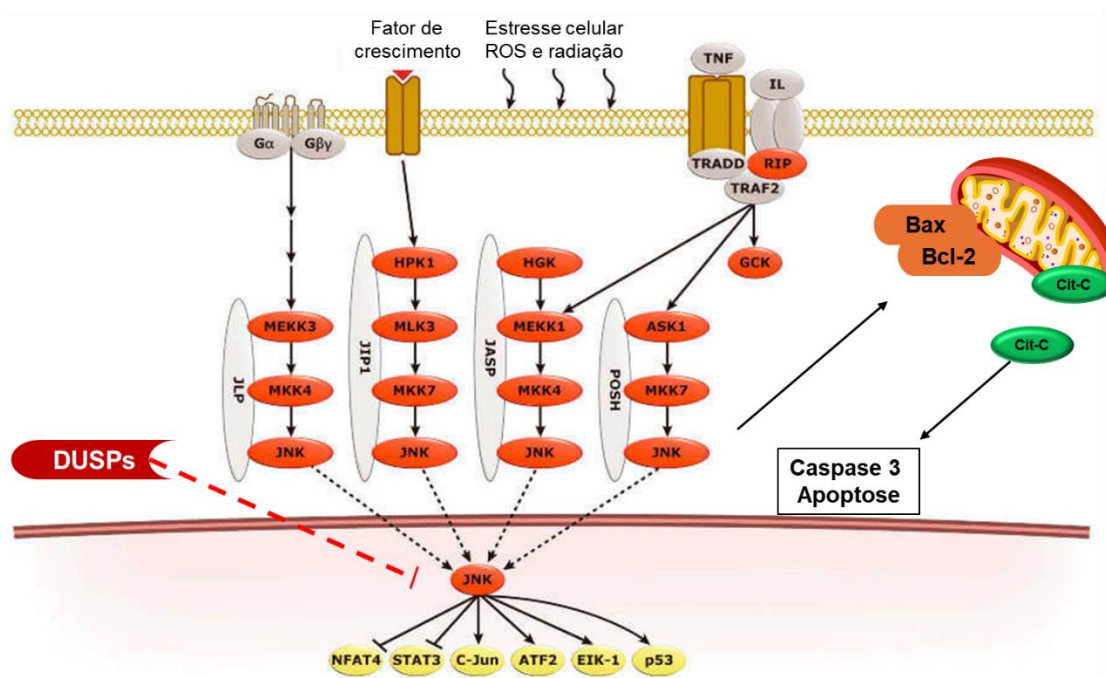
enquanto JNK3 é predominantemente expressa no cérebro, coração e testículos (Ni *et al.*, 2022).

Essas cinases são ativadas (Figura 9) principalmente pelo estresse, assim como pela exposição à fatores de crescimento, radiação UV, infecções virais, EROs e estímulos pró-inflamatórios, levando à regulação de vários processos celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação, migração, inflamação, reprogramação metabólica e apoptose (Liu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2019). Após a exposição a estes estímulos, ocorre a fosforilação das MAPKKK (como MEKK1-4, ASK1/2, TAK1, MLK2, DLK e TAO1/2), que por sua vez fosforilam as MAPKK (como MKK4 e MKK7) (Xu *et al.*, 2020). A ativação da via JNK (c-Jun N-terminal cinase) requer a fosforilação de resíduos de treonina (Thr) e tirosina (Tyr) no sítio ativo da proteína (Lee *et al.*, 2022). Com isso a fosforilação de JNK induz uma mudança conformacional, expondo o local ativado e acionando uma cascata de sinalização a jusante (Ha *et al.*, 2019). Proteínas acessórias, como JIP1-3 (proteína de interação - cinase c-Jun N -terminal), POSH (proteína adaptadora de domínio SH3) e JASP (proteína adaptadora de domínio SH3s) , desempenham um papel crucial ao organizar e facilitar a cascata de fosforilação sequencial (Hammouda *et al.*, 2020). Além disso, as quinases HPK (Cinase Progenitora Hematopoiética) e GCK (Glicocinase) regulam positivamente a ativação da via JNK por meio da fosforilação do MEKK1, uma MAPKKK imprescindível na cascata. Em contraste, a proteína DUSP (fosfatase de dupla especificidade) desativa essas vias, regulando negativamente a sinalização (Figura 9) (Castro-Torres *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2024).

Os JNKs ativados fosforilam as proteínas Jun (JunB, JunD e c-Jun), o que leva à sua dimerização com proteínas Fos (c-Fos, FosB, Fra-1/2) para formar o fator de ativação do fator de transcrição (AP-1), que ativa o programa transcricional de seus genes alvo (Gkouveris *et al.*, 2017).

JNK desempenha um papel pró-apoptótico ao ativar vias apoptóticas, como a intrínseca. Por meio da fosforilação de Bad/Bax e Bim, JNK promove a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol, enquanto inibe a atividade de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL. Na ausência dessas proteínas, a sinalização TRAF2/IAP1 é suprimida, levando à liberação de Smac/Diablo da mitocôndria, que subsequentemente ativa a caspase-8 efetora. Dessa forma, JNK exerce um efeito antitumoral ao se envolver diretamente na via apoptótica (Hammouda *et al.*, 2020).

Figura 9. Cascata de sinalização das proteínas cinases c-Jun N-terminal (JNKs).



As quinases JNK são ativadas por uma série de eventos de fosforilação em resposta a estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, estresses ambientais e drogas. Esses estímulos primeiro resultam na ativação das quinases centrais, incluindo HPK, HGK e GCK, que interagem e fosforilam MEKK1, ou causam diretamente a ativação das quinases de MAP3K proximal da membrana, como ASK1 ou MEKK3, que então fosforila e ativa MKK4 e MKK7. O MKK4 ou MKK7 ativado fosforila e ativa isoformas JNK distintas através de fosforilação dupla em tirosina e treonina dentro de um sítio de tripeptídeo conservado. Após a ativação, JNK, por um lado, fosforila vários fatores de transcrição nuclear, como c-Jun, ATF2 e SP1, causando a transcrição dos genes alvo. Por outro lado, o JNK também interage e fosforila uma série de proteínas não nucleares, incluindo membros da família BCL-2 mitocondrial (por exemplo, Bax e BCL-2) e algumas proteínas citoplasmáticas. Finalmente, essas proteínas mediam uma variedade de respostas celulares, incluindo crescimento celular, diferenciação, proliferação, sobrevivência, apoptose, inflamação, estresse metabólico e morte celular. Além disso, vários complexos de proteínas também estão envolvidos na regulação da sinalização JNK.

Fonte: adaptado de www.genetex.com

A atividade da JNK é estritamente modulada na maioria das células, portanto, a sinalização desregulada pode causar diferentes efeitos. Por exemplo, a sinalização constante de JNK contribui para a sobrevivência celular, enquanto a ativação excessiva leva à morte celular. Tem sido relatado que a superexpressão da JNK está envolvida no desenvolvimento de uma variedade de doenças, inclusive o câncer (Davies *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2024).

No câncer, essa proteína também exibe um papel dual. Com relação à sua ação pró-tumoral, JNK pode atuar inativando proteínas de morte associada a Bcl2 e/ou estimulando sinergicamente as vias Nf-kB e JAK/STAT para exercer funções de

sobrevivência e regular negativamente a autofagia e a apoptose, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento de resistência tumoral (Wu *et al.*, 2019). Além disso, JNK efetivamente desencadeia a ubiquitinação e a degradação da proteína supressora do tumor p53 (Kim *et al.*, 2002; Kciuk *et al.*, 2022).

De fato, Zhang e colaboradores (2022) detectaram que JNK/MAPK estava relacionada à tumorigênese no câncer de mama (células MCF-7), por induzir o aumento da expressão de APOC1 (apolipoproteína C1), uma proteína presente no tecido mamário correlacionada à ativação da metástase. Ainda, no estudo de Kciuk e colaboradores (2022) foi relatado que a atividade catalítica do MLK3 é essencial para a ativação de JNK, que por sua vez fosforila o resíduo Ser178 da paxillina (proteína adaptadora de transdução de sinais), resultando na proliferação de células de câncer de mama.

O envolvimento de JNK e RAS na tumorigênese também tem sido relatado. Quando o RAS oncogênico está presente a sinalização ativa de JNK associado à RAS podem promover o desenvolvimento do tumor (Igaki *et al.*, 2006). JNK demonstrou aumentar a resistência aos inibidores da via ERK, bem como aos agentes quimioterápicos e inibidores da RAF, contribuindo para a proliferação tumoral (Lee *et al.*, 2020).

A via JNK também está envolvida na migração e invasão de outros tipos de células tumorais. Chen e colaboradores (2017) mostrou que a inibição das vias JNK nas linhagens de câncer de próstata PC3 e DU145, por meio do inibidor de JNK SP600125 ou pelo JNK siRNA, impediu a migração e invasão celular induzidas pela trombospondina-2, uma proteína envolvida na angiogênese.

Em contrapartida, a literatura tem evidenciado o papel antitumoral da JNK, constituindo um alvo promissor para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas direcionadas ao tratamento antitumoral (Abdelrahman *et al.*, 2021; Castro-Torres *et al.*, 2024). Neste contexto, o uso de alguns produtos naturais para o tratamento do câncer tem ativado a morte celular por meio da indução da atividade de JNK dependente de estresse oxidativo. O composto nomeado de WZ35, um derivado da curcumina, polifenol isolado da *Curcuma longa* (Zingiberaceae), exerceu significativo efeito antitumoral em células de câncer de mama (MDA-MB-231) por aumentar os níveis de EROs e ativar a via JNK (Wang *et al.*, 2019). Outro estudo realizado por Kwak e colaboradores (2023) mostrou que o composto Licochalcone B (LCB), uma chalcona derivada das raízes da erva medicinal chinesa *Glycyrrhiza inflata*, exerce

efeitos antitumorais *in vitro* significativos em linhagens de câncer colorretal (HCT-116) resistentes ao fármaco antitumoral Oxaliplatina, por induzir apoptose mediada por EROs, visando múltiplas vias, incluindo a sinalização de JNK. Já o tratamento com o ginsenosídeo Rh4, uma saponina isolada da *Panax notoginseng* (Araliaceae), induziu estresse oxidativo, bem como morte celular por apoptose e autofagia, dependentes da ativação de JNK e p53, em células de câncer colorretal (Caco-2) (Wu *et al.*, 2018).

A indução da ativação de morte celular por autofagia foi demonstrado em células de carcinoma ovariano, por meio da modulação positiva de JNK (Dou *et al.*, 2019). Ademais, Xin e Zhang (2024) mostraram que a curcumina reduziu a viabilidade celular na linhagem SW-480 (câncer colorretal), por induzir um aumento da ativação da sinalização JNK, provocando morte celular por ferroptose.

Consequentemente, o desenvolvimento de fármacos que modulem as vias de sinalização JNK específicas representa uma estratégia antitumoral promissora que justifica a investigação desta via.

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

As p38 MAPKs são proteínas cinases que regulam diversas respostas celulares fisiológicas e patofisiológicas, consistindo em quatro isoformas: p38 α (MAPK14) e p38 β (MAPK11), expressas na maioria dos tecidos, particularmente no coração e no cérebro; p38 γ (MAPK12), expressa predominantemente no músculo esquelético; e p38 δ (MAPK13), encontrada nos pulmões, pâncreas, intestino delgado, rins e testículos (Liu *et al.*, 2021).

Em geral, p38 α e p38 β atuam juntas em vários processos fisiológicos, como exemplo na determinação do sexo, desenvolvimento cardíaco, estimulam o fuso mitótico e indução de células T imunes (Hayakawa *et al.*, 2017). Foi demonstrado que p38 γ e p38 δ desempenham funções semelhantes, além disso estimulando processos de regeneração de tecidos e respostas imunes (Escós *et al.*, 2016). A via da p38 MAPK regula a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, sendo um alvo terapêutico importante em doenças inflamatórias crônicas (Singh *et al.*, 2024).

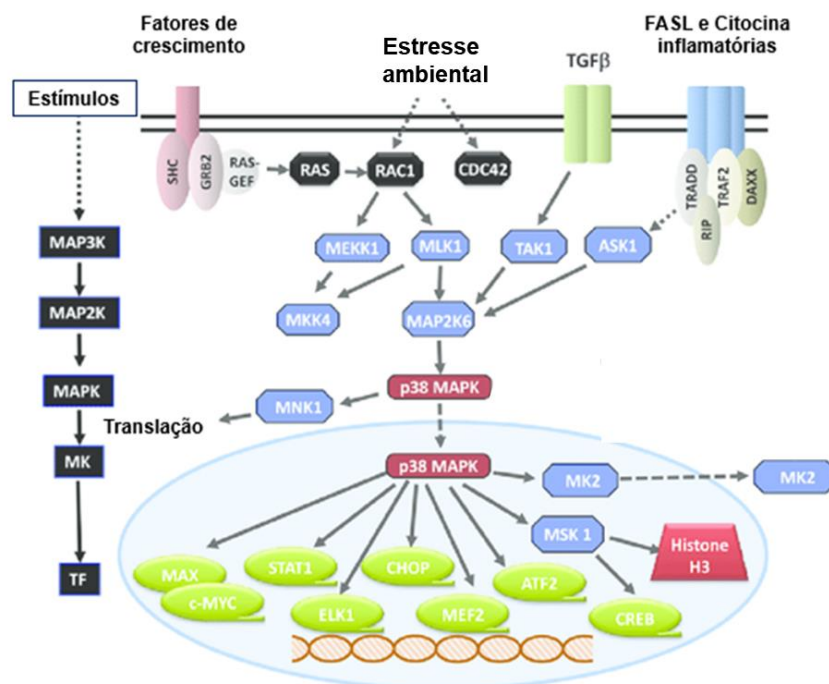
As p38 MAPKs são ativadas (Figura 10) principalmente em resposta à estímulos extracelulares relacionados ao estresse, como o estresse oxidativo e a radiação ultravioleta, fatores que causam danos ao DNA. Após a sua ativação, essas quinases translocam-se do citosol para o núcleo, onde modulam a atividade de alvos transcricionais específicos, regulando processos biológicos envolvidos na resposta inflamatória, reparo do DNA e/ou apoptose (Pua *et al.*, 2022).

Assim como em outras famílias de MAPKs, a via p38 envolve a ativação em cascata de pequenas proteínas da família RhoGTPase (*small G*), como Rac e Cdc42. Essa via pode ser ativada por diferentes mecanismos. Receptores de TGF- β (Fator de Crescimento Transformante- β), como o FASL (Ligante do receptor de morte FAS), atuam como estímulos iniciais, ativando a TAK1 (cinase 1 ativada pelo fator de crescimento transformante- β) e a ASK1 (cinase reguladora do sinal de apoptose 1), respectivamente. Esses eventos promovem a ativação de MEKK3 e MEKK4. Outro mecanismo envolve a interação com a proteína de ligação a TAK1 (TAB1), que induz rearranjos conformacionais na estrutura da p38, facilitando sua autofosforilação. Após a ativação inicial, a cascata segue com a fosforilação das MAP2Ks, como MKK3 e MKK6, que atuam diretamente sobre a p38 MAPK (García-Hernández *et al.*, 2022) (Figura 10).

A p38 MAPK não possui um sinal de localização nuclear (NLS), sendo translocada para o núcleo por meio da interação com a quinase MK2 (proteína cinase ativada por proteína cinase ativada por mitógeno 2) (Zou; Blank, 2017). Uma vez no núcleo as isoformas p38 $\alpha/\beta/\gamma$ fosforilam diversos fatores de transcrição, como CHOP, ATF2 e c-MyC, além de ativar outras proteínas quinases, como a MSK1/2. Essas quinases, por sua vez, fosforilam outros fatores de transcrição que não são ativados diretamente pela p38, como o CREB (Proteína de ligação ao monofosfato cíclico de adenosina - AMPc), ampliando a resposta celular a diferentes estímulos (Kim *et al.*, 2024).

A via p38 MAPK é regulada, entre outros mecanismos, pela ação de fosfatases. Dentre essas, destacam-se as fosfatases de dupla especificidade (DUSPs), que incluem as fosfatases específicas para MAPKs (MKPs). Essas enzimas atuam em diferentes níveis da cascata de sinalização, desfosforilando tanto as MAPKs quanto componentes a montante, como as MAP2Ks, contribuindo para o controle preciso da ativação e duração do sinal (Bang *et al.*, 2021).

Figura 10. Cascata de sinalização das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK).



Uma grande variedade de estímulos, incluindo estresses celulares, radiação UV, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento podem ativar a p38 MAPK. Estes levam ao início de uma cascata de fosforilação MAPK de três etapas (MAPKKK, MAPKK e MAPK). Em seguida as MAPKKs (TAK1; ASK1; MEKK1) fosforilam as MAPKKs (MKK3 e MKK6), que atuam diretamente sobre a p38 MAPK. Em seguida p38 é translocada para o núcleo por meio da interação com a quinase MK2. Uma vez fosforilada as isoformas p38 $\alpha/\beta/\gamma$ fosforilam diversos fatores de transcrição, como CHOP, ATF2 e c-Myc. Além disso, a p38 MAPK pode ativar outras proteínas quinases, como a MSK1/2, que fosforila outros fatores de transcrição não ativados diretamente, como o CREB.

Esta via está envolvida na carcinogênese de diferentes tipos de cânceres. Originalmente descrita como uma cinase supressora de tumor, a p38 MAPK tem um papel duplo na tumorigênese, regulando o equilíbrio entre a sobrevivência e a morte celular em resposta ao estresse (Kudaravalli *et al.*, 2022). Esta regulação depende do tipo e intensidade dos fatores estressores, do tipo celular e das interações com outras vias de sinalização, podendo levar a efeitos opostos de sobrevivência ou morte. Portanto, o papel da p38 MAPK tem sido extensivamente estudado como um potencial alvo farmacológico no tratamento do câncer (Grave *et al.*, 2022).

Tem sido evidenciado que a ativação reduzida dessa proteína pode exercer efeitos pró-tumorais, estimulando a sobrevivência celular, aumentando potencialmente a proliferação de células hematopoiéticas em alguns tipos de cânceres, desativando os pontos de verificação do ciclo celular e, conseqüentemente, inibindo a parada do ciclo celular (Lee *et al.*, 2020). Em baixas

concentrações, a p38 MAPK é responsável pela migração de células endoteliais estimuladas pelo VEGF (Fator de Crescimentos Endotelial Vascular), regulando genes a jusante e outras proteínas-alvo. De fato, as isoformas p38 α e p38 γ podem estimular determinados fatores de crescimento que favorecem a progressão do tumor (Sun *et al.*, 2023).

O papel da p38 MAPK no desenvolvimento e progressão do câncer de pulmão tem sido amplamente documentado (Dong *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021b; Liu *et al.*, 2022a). Um estudo recente avaliou a influência da ativação da p38 MAPK em células de câncer de pulmão A549. Os resultados mostraram que a p38 promove os processos de migração e invasão celular. No entanto, ao utilizar dois inibidores específicos da p38 MAPK, esses processos foram significativamente bloqueados (Hu *et al.*, 2024).

A via de sinalização p38 MAPK também tem sido associada à progressão do câncer colorretal (CRC). Loesch e colaboradores (2011) observaram que a superexpressão de p38 MAPK ativava o fator de transcrição c-Jun, que, por sua vez, recrutava a própria p38 como cofator para promover a ativação da metaloproteinase 9 da matriz extracelular (MMP-9), intensificando a capacidade de invasão celular.

Por outro lado, a via p38 MAPK exerce efeitos antitumorais ao modular (positivamente) moléculas-chaves envolvidas no controle da proliferação celular (Da-Qingen *et al.*, 2021). A hiperativação e a sinalização sustentada de p38 MAPK pode estar associada à ativação da proteína supressora tumoral p53, que por sua vez controla o ponto de verificação G1/S, sendo que a sua superexpressão resulta na regulação positiva das proteínas p21Cip1/WAF1, GADD45 e 14-3-3 σ , que induzem a interrupção da proliferação tumoral (Sarg *et al.*, 2024). Notavelmente, a p38 MAPK também exerce efeitos inibitórios sobre o fator de transcrição E2F, regulando negativamente a expressão da proteína do retinoblastoma (pRb). Esse mecanismo torna a pRb menos suscetível à inativação mediada por CDK/Ciclina, retardando a progressão do ciclo celular. Além disso, a isoforma p38 α funciona como um sensor de estresse, ativando vias apoptóticas em resposta ao excesso de EROs produzido por células com mutações em Ras (Martínez-Limón *et al.*, 2020).

Neste contexto, estudos têm demonstrado o envolvimento da ativação da via p38 MAPK com o mecanismo de ação antitumoral de diferentes compostos de origem natural e sintética (Pua *et al.*, 2022). Wang e colaboradores (2023a) mostraram que o DZ-514, um novo composto derivado de N-fenil-4-

pirimidinadiamina, demonstrou potente atividade anticancerígena *in vitro* ao ativar as vias de sinalização do eixo EROs- MKK4- p38 MAPK. Zhang e colaboradores (2019b) observaram que o efeito antitumoral do quimioterápico lobaplatina em células de adenocarcinoma pulmonar (A549) foi dependente da ativação da apoptose, mediada pela indução de estresse oxidativo e ativação da via p38 MAPK. Mecanismos de ação semelhantes também foram observados em outras pesquisas, após o tratamento com a: I) dioscina, um triterpenoide hexacíclico, em células de osteosarcoma (U2-OS e MG63) (Zheng *et al.*, 2023); II) echinatina, uma cumarina, em diferentes linhagens de carcinoma colorretal (HT116, HT29, HCT116-OxR e HT29-OxR) (Kwak *et al.*, 2023); e III) a saponina esteroideal timosaponina AIII e polissacarídeos sulfatados derivados da microalga *Synechococcus* sp., frente às linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e colorretal (Caco-2) (Zhang *et al.*, 2021a; Srimongkol *et al.*, 2023).

Portanto, estas evidências destacam o papel da p38 MAPK como um alvo terapêutico promissor para o tratamento de diferentes tipos de cânceres.

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

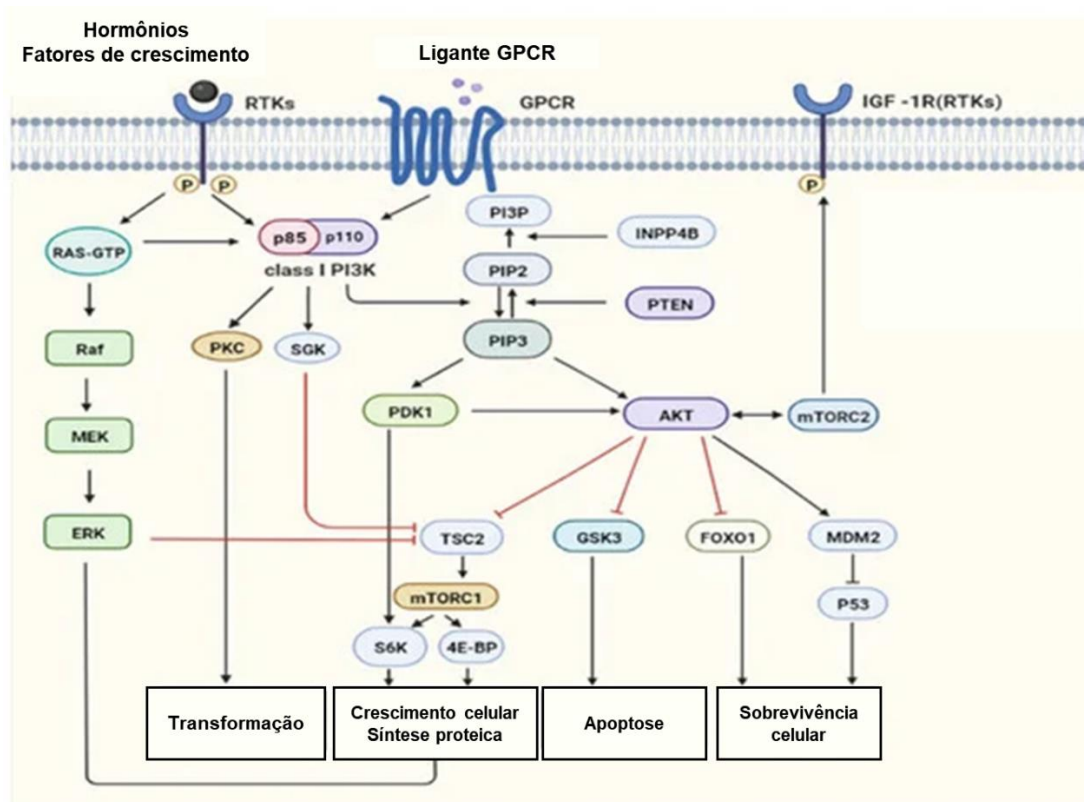
A via de sinalização PKB/AKT (Proteína Cinase B) é uma das principais vias intracelulares envolvidas no controle de processos celulares fundamentais, como crescimento, sobrevivência, proliferação, metabolismo e motilidade celular (Figueiredo *et al.*, 2024; Engin, 2024).

Akt é uma serina/treonina que contém três subtipos homólogos altamente conservados (AKT1/PKB α , AKT2/PKB β e AKT3/PKB γ), sendo os dois primeiros amplamente expressos em diferentes tipos celulares, e o último limitado aos tecidos do sistema nervoso e aos testículos (Hinz *et al.*, 2019). AKT também é conhecida como proteína quinase B (PKB), considerando a sua semelhança com PKA (Proteína Quinase A) e PKC (Proteína Quinase C) (Xing *et al.*, 2019). Essas proteínas encontram-se distribuídas em diferentes regiões celulares e exercem funções distintas: AKT1/PKB α está localizada no citoplasma e é essencial para o crescimento sistêmico normal; AKT2/PKB β localiza-se nas mitocôndrias e está envolvida no metabolismo da glicose; AKT3/PKB γ está localizada no núcleo e na membrana nuclear, e é crucial para a formação cerebral (Li *et al.*, 2023).

A ativação dessa via (Figura 14) é iniciada geralmente por estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, hormônios e citocinas, que se ligam à

receptores de tirosina quinase (RTKs) ou receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (Hua *et al.*, 2020). A ligação dos ligantes aos receptores ativa a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que converte o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), na membrana plasmática. O PIP3 associa-se a PKB/AKT, por meio do seu domínio de homologia à pleckstrina (PH), induzindo uma mudança conformacional na estrutura proteica o que permite a interação da PKB/AKT com a proteína cinase dependente de fosfoinosítideo-1 (PDK1), também recrutada à membrana plasmática (Primavera *et al.*, 2023).

Uma vez ativada, a AKT é fosforilada em resíduos específicos de aminoácidos por PDK1 e pelo mTORC2 (complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos). AKT então é translocada ao citoplasma e núcleo, onde regula uma ampla gama de alvos a jusante (Figura 14), a exemplo: controla a transcrição do mRNA; crescimento celular; síntese de proteínas (mTOR); exclusão nuclear do FOXO1, inibindo a transcrição de genes pró-apoptóticos; sobrevivência celular (GSK3 β) e degradação de p53, reduzindo a apoptose (MDM2) (figura 11) (Zhu *et al.*, 2022). A ativação da via PKB/AKT é regulada por fosfatases, como PTEN (fosfatase e homólogo de tensina), que converte PIP3 (Trisfostafo de Inositol) de volta em PIP2 (Bifosfato de inositol), e INPP4B (inositol polifosfato-4-fosfatase tipo II B), que converte PI3P em PIP2 (Zhu *et al.*, 2022).

Figura 11. Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.

As vias de sinalização Akt/PKB, podem ser ativadas pelo receptor acoplado à proteína G (GPCR) e receptores tirosina quinases (RTKs), incluindo o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2/ERBB2), receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) e insulina, que ativa fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para gerar o segundo mensageiro fosfatidilinositol-3-quinase (PIP3). PTEN (fosfatase e homólogo de tensina) desfosforila PIP3 para gerar PIP2, enquanto INPP4B (inositol polifosfato-4-fosfatase tipo II B) desfosforila PtdIns(3,4)P2 para gerar PtdIns(3)P (PI3P). Proteínas, contendo um domínio de homologia de pleckstrina (PH), são recrutadas para a citomembrana por PIP3, incluindo AKT, cinase dependente de 3-fosfoinositideo 1 (PDK1) e cinase induzida por soro e glicocorticoide (SGK). O principal alvo a jusante de PI3K é AKT. Ele é ativado por PDK1 e complexo mTOR 2 (mTORC2), e fosforila um grande número de proteínas efetoras a jusante, incluindo complexo mTOR 1 (mTORC1), proteína forkhead box O1 (FoxO1), cinase de síntese de glicogênio (GSK3) e minutor duplo murino 2 (MDM2). A fosforilação mediada por AKT de GSK3 β , FOXO1 e MDM2 controla direta ou indiretamente o crescimento e a sobrevivência celular. O mTORC1 ativado regula, em última análise, os processos celulares, como o início da transcrição do mRNA, crescimento celular, autofagia e síntese de proteínas, por meio da fosforilação de 4EBP1 e S6K1.

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

A via PI3K/Akt/mTOR tem sido amplamente estudada devido ao seu papel em algumas das funções celulares mais importantes, como proliferação, sobrevivência e crescimento. A desregulação desta via tem sido associada à diferentes patologias como o câncer, diabetes, doenças neurológicas e cardiovasculares. No câncer, mutações ou amplificações em genes da PI3K ou AKT, bem como a inativação do gene supressor de tumor PTEN (que converte PIP3 em PIP2), levam à hiperativação

da via, resultando em crescimento celular descontrolado, resistência à apoptose e aumento da capacidade invasiva e metastática (Ertay *et al.*, 2020). Assim, sua modulação é uma forma viável de aumentar as taxas de sucesso de tratamentos antitumorais (Toson *et al.*, 2022)

Nos cânceres de mama que expressam os receptores de estrogênio (ER+) e HER2 (HER2+), a mutação no gene PIK3CA, que codifica a subunidade catalítica da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), é o mecanismo mais comum de ativação anormal da via PI3K/AKT/mTOR. Estas mutações promovem a hiperativação da via PI3K/AKT/mTOR, aumentando a proliferação celular e diminuindo a sensibilidade à apoptose, características que favorecem o desenvolvimento e a progressão tumoral (Kamal *et al.*, 2024). As formas alteradas do gene PIK3CA estão associadas a diferentes subtipos moleculares do câncer de mama, representando implicações clínicas significativas, incluindo resistência à quimioterapia e um prognóstico desfavorável para os pacientes (Harbek *et al.*, 2019). Nesse contexto, estudos recentes destacam a importância de estratégias terapêuticas direcionadas, como o uso de inibidores da PI3K, AKT ou mTOR, especialmente em tumores com mutações em PIK3CA, mostrando-se capazes de modular a via PI3K/PKB/mTOR para melhorar a resposta ao tratamento e/ou o prognóstico dos pacientes (Occhiuzzi *et al.*, 2023).

Assim, diversos inibidores direcionados às proteínas PI3K, AKT ou mTOR, têm demonstrado eficácia terapêutica em diferentes tipos de cânceres. Esses compostos continuam sendo investigados em ensaios clínicos, com o objetivo de otimizar a sua aplicação e superar desafios da terapêutica, a exemplo da resistência adquirida e toxicidade (Chan *et al.*, 2019). O BKM120, um inibidor irreversível específico da PI3K, atua por meio da modificação covalente do resíduo Lys-802 na PI3K, bloqueando a sua atividade catalítica, o que por sua vez interrompe o sinal proliferativo das células tumorais (Zhong *et al.*, 2023). A rapamicina representa outro exemplo, sendo um inibidor seletivo do mTOR. Este composto regula diversas funções biológicas celulares associadas ao câncer, promovendo a inibição do crescimento tumoral e a indução da apoptose em múltiplos tipos de tumores malignos (Darling *et al.*, 2016).

Inibidores seletivos de AKT/PKB têm sido desenvolvidos para bloquear tanto a forma ativa quanto a inativa da AKT, prevenindo a sua translocação para alvos intracelulares. Esses compostos inibem a fosforilação de proteínas efetoras a

jusante, como Bad, GSK-3 e Afx, que desempenham papéis críticos na regulação do ciclo celular e apoptose (Yang *et al.*, 2021).

Em contrapartida, dados na literatura fornecem evidências de que a via PKB/AKT pode exercer efeito antitumoral super ativando essas proteínas. Sun e colaboradores (2019) observaram o envolvimento da ativação da via PI3K/AKT/mTOR ao efeito antitumoral induzido pelo tratamento com aloína ou metformina, em células de carcinoma hepatocelular (HepG2 e Bel-7402), resultando na inibição do crescimento e invasão celular, bem como na ativação da apoptose e autofagia. Outro estudo mostrou que o aumento significativo da fosforilação de AKT, induzida pelo composto M-etilferulato, um polifenol, resultou na indução da morte celular por apoptose em linhagens de células de câncer de pulmão humanas (A549) (Patil *et al.*, 2023). Além disso, o pterostilbeno (3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno; PTS), isolado do extrato de *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae), inibiu a proliferação de células cancerígenas de colo do útero humanas (HeLa) ao promover a apoptose. Esse efeito ocorreu por meio da ativação da via PI3K/AKT, o que estimulou a expressão de MICA/B, proteínas relacionadas à cadeia do complexo de histocompatibilidade. Essas proteínas, por sua vez, modulam a resposta imune antitumoral por apresentarem as células tumorais às células *natural killer* (NK) (Li *et al.*, 2024).

Diante dos dados mencionados, a investigação de novos compostos que modulem a via das proteínas PKB/AKT torna-se promissor para a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas antitumorais.

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

O NF- κ B (fator nuclear *kappa* B) é membro de uma família de fatores de transcrição compostas por cinco membros: p50 (RelA), p52 (RelB), c-REL, NF- κ B1(p105/p50) e NF- κ B2 (p100/p52)(Ren *et al.*, 2022).

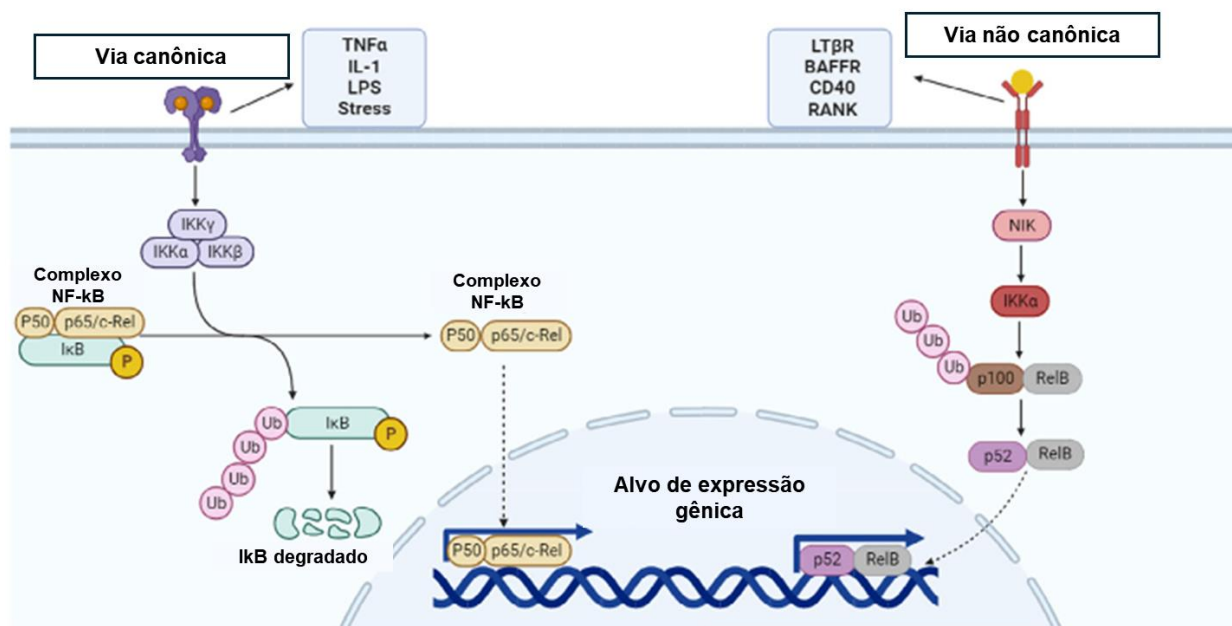
A atividade do NF- κ B é regulada espontaneamente por vários estímulos diferentes, com isso essas proteínas atuam na regulação da homeostase celular, por estarem envolvidas na expressão de genes que regulam processos fisiológicos importantes, como a inflamação, imunidade, proliferação e morte celular (Zinatizadeh *et al.*, 2020). O NF- κ B pode ser ativado por duas vias: a via canônica (clássica) e a via não canônica (alternativa). Especificamente a via canônica participa da

imunidade inata, inflamação e inibição da apoptose, enquanto a via alternativa é responsável principalmente pela maturação das células B, formação de órgãos linfoides e produção de anticorpos (Rahul *et al.*, 2022).

A via canônica (clássica) (Figura 15) é ativada por diversos fatores, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina-1 (IL-1) e o lipopolissacarídeo (LPS). Nas células em repouso, o NF- κ B encontra-se no citoplasma como um heterodímero inativo, composto pelas subunidades p50 e RelA, estando ligado a molécula inibitória I κ B α (inibidor de *kappa* B alfa) (Ostovar *et al.*, 2024). A molécula I κ B α sofre ativação através de uma cinase específica, a IKK, que ativa o I κ B α após a fosforilação de dois resíduos de serina conservados nos domínios N-terminais, levando à poliubiquitinação e posteriormente à degradação do I κ B α pelo proteossoma, permitindo que o heterodímero RelA/p50 fique livre e entre no núcleo da célula, iniciando a transcrição de genes alvos (Schlein; Thamm, 2022).

A via não canônica (alternativa) (Figura 15) é desencadeada pela ativação de receptores específicos, 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 NIK (proteína indutora de NF- κ B) (Ostovar *et al.*, 2024). O NF- κ B é um heterodímero na sua forma inativa, composto pelas subunidades RelB/p100. Em células em repouso, a NIK é constantemente degradada por ubiquitinação, porém quando estimuladas, a degradação da NIK é inibida. Assim, esta proteína fosforila e ativa a quinase indutora de NF- κ B (Ik κ), que por sua vez fosforila RelB/p100, e induz a degradação do precursor p100 no proteossoma, gerando a p52. Em seguida, após dissociar-se da subunidade RelB, a p52 é ativada formando o complexo RelB/p52, que poderá então ser translocado para o núcleo e ativar genes específicos (Koch *et al.*, 2020).

Figura 12. Vias de sinalização intracelulares canônica (clássica) e não-canônica (alternativa) do Fator Nuclear kappa B (NF- κ B).



Via de sinalização clássica ou canônica (a esquerda) e via alternativa ou não canônica (a direita). Na via canônica, o NF- κ B é um heterodímero composto das subunidades p50 e RelA. Este heterodímero é mantido na sua forma inativa no citoplasma da célula pelo I κ B α , que logo é fosforilada pela cinase I κ B específica (IKK). Com isso ocorre a poliubiquitinação e degradação proteassomal da molécula inibitória I κ B α , que em seguida dissocia-se do heterodímero p50/RelA expondo seu sítio de ligação nuclear. Dessa forma o heterodímero NF- κ B atravessa a membrana nuclear através de poros nucleares, adentrando no núcleo da célula e iniciando a transcrição de genes alvo a jusante. Na via alternativa, a cinase indutora de NF- κ B (NIK) fosforila a IKK α inibitória, que então fosforila os heterodímeros p100/NF- κ B2:RelB preexistentes. Isso desencadeia o processamento de p100/NF- κ B2 em p52. Os complexos p52/RelB ativos podem então entrar no núcleo e ativar genes alvo a jusante. RE = elemento de resposta, um sítio de ligação para o NF- κ B ativo.

Fonte: Adaptado de Ostovar et al., 2024.

No contexto do câncer, a proteína NF- κ B é um fator de transcrição que se apresenta constitutivamente ativo na maioria das linhagens celulares tumorais humanas de origem hematopoiética e sólida (Schlein; Thamm, 2022). Essa característica contribui para a progressão tumoral, uma vez que NF- κ B desempenha um papel central na indução de alterações celulares que compõem as “marcas do câncer” (do inglês, *Hallmarks of cancer*). Essas alterações incluem a evasão da apoptose, a aquisição de potencial replicativo ilimitado, reprogramação celular, a indução da angiogênese e a promoção de invasão e metástase (Rustamadi et al., 2023).

Recentemente, descobriu-se que a ativação do NF- κ B1 em resposta a danos no DNA pode ser parcialmente responsável pela quimiorresistência e progressão do

câncer de mama, e a superexpressão desse gene pode estar associada à metástase tumoral, o que torna o NF- κ B1 um marcador promissor em pacientes com câncer (Sal *et al.*, 2016). De fato, um estudo realizado por Barnes e colaboradores (2024) revelou que o NF- κ B (p65) está altamente expresso, especialmente no subtipo de câncer de mama triplo negativo, sugerindo que esta proteína pode atuar como um biomarcador relevante para a análise do estágio, progressão e prognóstico da doença. Além disso, níveis elevados de expressão de RelA nuclear em pacientes com câncer de mama promovem a ativação da via canônica do NF- κ B, frequentemente associada à superexpressão das subunidades p65 e p50. Essa superexpressão induz a transcrição de genes pró-sobrevivência para as células tumorais, como BCL-x e BCL-2 (Biswas *et al.*, 2023).

Um estudo realizado por Bakshi e colaboradores (2022) mostrou que a angiogênese, migração, invasão e metástase de células de carcinoma de cólon (HT-29 e Caco-2) foram significativamente reduzidas após a regulação negativa do VEGF mediada pela via NF- κ B. Adicionalmente, a Ritanserina, um composto sintético antagonista do receptor 5HT_{2A}, apresentou efeitos antitumorais e antiangiogênicos em modelos de xenoenxerto em camundongos. Esse efeito foi atribuído à inibição de NF- κ B como fator inflamatório, e de VEGF como fator angiogênico (Hosseinzadeh *et al.*, 2023).

Alguns quimioterápicos e drogas alvo-dirigidas podem modular a expressão de NF- κ B, influenciando diretamente na progressão tumoral. Os taxanos, por exemplo, suprimem a atividade de NF- κ B1, o que resulta na inibição da formação de metástases (Gestoso *et al.*, 2024). Em contraste, a doxorrubicina, assim como outras drogas da classe das antraciclinas, induzem dano ao DNA e paradoxalmente ativam a via NF- κ B1, o que vem sendo co-relacionado com a aquisição de resistência tumoral a esse agente, especialmente no câncer de mama (Adeyemi *et al.*, 2024).

Apesar dos efeitos pró-tumorais de NF- κ B serem bem relatados, tem sido reportado que esta via também apresenta um papel antitumoral. Kim e colaboradores (2005) relataram que a escopoletina, uma 6-metoxi-7-hidroxycumarina, induziu a apoptose em células de leucemia promielocítica aguda humana (HL-60) após a ativação do NF- κ B. Em outro estudo, a curcumina, uma molécula estruturalmente relacionada aos fenilpropanóides, induziu aumento nos níveis de NF- κ B (após 8 h de tratamento) em uma linhagem de células de câncer

hepático humana (HA22T/VGH), inibindo a proliferação do tumor (Notarbartolo *et al.*, 2005).

Além disso, alguns trabalhos tem demonstrado que fármacos antitumorais, a exemplo da doxorubicina, induzem citotoxicidade de forma dependente da ativação de NF- κ B em células tumorais das linhagens KBM-5 (leucemia mieloide crônica), Jurkat (leucemia aguda de células T) (Ashikawa *et al.*, 2004) e HT-29 (câncer de cólon) (Riganti *et al.*, 2008).

Assim, a relevância de NF- κ B na participação da carcinogênese torna essa via um alvo molecular adequado para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

2.9 Produtos naturais e o seu potencial farmacológico

Os produtos naturais são compostos químicos, também conhecidos como metabólitos, produzidos por organismos vivos presentes na natureza, incluindo plantas, animais, fungos e microrganismos (Zhang *et al.*, 2020). Esses compostos desempenham um papel crucial no avanço da farmacoterapia, especialmente no tratamento de doenças infecciosas e no câncer (Newman; Cragg, 2020).

Atualmente, a busca por novos compostos bioativos derivados de produtos naturais concentra-se predominantemente em plantas. Isso se deve ao fato de muitas espécies vegetais apresentarem propriedades medicinais amplamente reconhecidas, frequentemente associadas ao seu uso tradicional e popular, como por exemplo atividades anticancerígena, imunoestimuladora, anti-inflamatória e antioxidante, (Ekiert; Szopa, 2020).

Apesar dos avanços no estudo desses produtos naturais, o reino vegetal ainda apresenta um vasto potencial inexplorado, com uma ampla reserva de compostos bioativos que podem oferecer benefícios significativos à saúde humana (Sharifi-Rad *et al.*, 2021). Segundo Ali e colaboradores (2022), cerca de 80% da população mundial ainda depende de medicamentos derivados de plantas para tratar problemas de saúde, destacando a importância desses recursos naturais no cuidado e na terapêutica global.

Nos últimos anos, os produtos naturais têm ganhado destaque na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos antitumorais devido à sua comprovada eficácia contra o câncer e à diversidade química de seus compostos (Yin *et al.*, 2019). Esses

produtos possuem características únicas em comparação com moléculas sintéticas convencionais, oferecendo tanto vantagens quanto desafios no processo de descoberta de novos fármacos (França, 2020). Diferentemente dos compostos sintéticos, os produtos naturais tendem a apresentar maior massa molecular, maior número de átomos de carbono sp e oxigênio, menor quantidade de átomos de nitrogênio e halogênio, maior número de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, além de uma maior polaridade e rigidez molecular (Atanasov *et al.*, 2021). Essas propriedades conferem complexidade estrutural, tornando-os promissores para o desenvolvimento de terapias inovadoras.

Os produtos naturais possuem uma ampla variedade de estruturas químicas que desempenham múltiplas funções biológicas (Duarte *et al.*, 2022). No contexto dos medicamentos anticâncer, numerosos quimioterápicos que continuam a ser amplamente utilizados na prática clínica no combate ao câncer foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (Islam *et al.*, 2022). Exemplos notáveis incluem: o paclitaxel, derivado de *Taxus brevifolia* (Johnson *et al.*, 1963); os alcaloides da vinca, como vincristina e vinblastina, obtidos de *Catharanthus roseus* (Sugiura; Ariyoshi, 1992); e os derivados da camptotecina, como topotecano e irinotecano, originados de *Camptotheca acuminata* (Song *et al.*, 2021). Esses compostos ilustram a importância dos produtos naturais como fontes essenciais para a oncologia moderna.

2.9.1 Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (Cv2): um novo fenilpropanóide obtido de *Croton velutinus* (Euphorbiaceae)

Os fenilpropanóides representam um dos maiores grupos de metabólitos secundários produzidos por plantas. Esses compostos são caracterizados por um anel benzênico e uma cadeia de três carbonos, constituindo uma classe diversa de substâncias orgânicas amplamente encontradas em medicamentos naturais. Eles podem ser subdivididos em várias subclasses, apresentando um grupo fenil ligado a uma cadeia lateral de três carbonos (Silva-Nascimento *et al.*, 2022). O potencial para variação substancial em substituintes no anel benzênico, juntamente com a posição da ligação dupla propenil, resulta em uma vasta gama de compostos que exibem múltiplas atividades biológicas, incluindo ações antimicrobianas, inseticidas e anti-inflamatórias (Andrade *et al.*, 2018; Dong; Lin, 2021). Essa classe química tem sido

extensivamente estudada, com pesquisas recentes indicando potencial anticâncer significativo (Xu, 2015; Xia *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos são subdivididos em dois grupos principais: I) Ácidos hidroxibenzóicos, que possuem uma estrutura de sete átomos de carbono (C6-C1). Como exemplos o ácido p-hidroxibenzóico, ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido vanílico e ácido sirínico; II) Ácidos hidroxicinâmicos (HCiA), que apresentam uma estrutura fenilpropanóide com nove átomos de carbono (C6-C3). Como exemplos o ácido p-cumárico (p-CoA), ácido cafeico (CA), ácido ferúlico (FA) e ácido sinápico (SA) (Taofiq *et al.*, 2017).

Assim, os fenilpropanóides de origem vegetal e seus derivados têm atraído grande interesse devido à baixa toxicidade e à ampla gama de propriedades bioativas, desempenhando um papel promissor no tratamento de doenças humanas, incluindo o câncer (Neelam *et al.*, 2020).

Neste contexto, a literatura tem relatado diversos estudos que fornecem evidências do potencial antitumoral destes metabólitos. Novos triterpenoides pentacíclicos, com e sem a fração fenilpropanoide, extraídos de *Leptopuslolonum* (Euphorbiaceae), foram testados quanto à sua citotoxicidade em células cancerígenas das linhagens HepG2 (câncer de fígado), MCF-7 (câncer de mama), A549 (câncer de pulmão) e HeLa (câncer cervical). No entanto, apenas o composto 28-norlupano, um novo triterpenoide pentacíclico contendo a fração fenilpropanoide, provou ser um agente anticâncer promissor. Portanto, o potente efeito citotóxico destes compostos pode estar relacionado à fração fenilpropanoide. Neste estudo, o composto exibiu o maior efeito citotóxico em células HepG2, com um valor de CI_{50} (concentração inibitória média) de 11,87 μM , causando parada do ciclo celular na fase G1 e potencialmente induzindo apoptose através da via MAPK. Isso foi evidenciado pela regulação positiva da fosforilação de p38, ERK1/2 e JNK, proteínas envolvidas nesta via e que regulam a proliferação, morte e diferenciação celular (Qi *et al.*, 2021a; Qi *et al.*, 2021b).

O ferulato etílico, um composto da classe dos fenilpropanóides, demonstrou inibição significativa do crescimento celular, induziu parada do ciclo celular na fase G1 e reduzindo a atividade do mTOR em células de carcinoma espinocelular esofágico (ESCC). Além disso, este composto reduziu significativamente o crescimento tumoral em um modelo de xenoenxerto de ESCC derivado de paciente em camundongos (Pang *et al.*, 2022). Ainda, o tratamento com ferulato etílico

também foi capaz de reduzir a proliferação de células pulmonares A549, aumentando a produção de superóxido mitocondrial, induzindo dano ao DNA e aumento da atividade das proteínas JNK e AKT (Patil *et al.*, 2023).

Em outro estudo, o ácido salvianólico B demonstrou potente atividade antitumoral, inibindo o crescimento de células de câncer de mama MDA-MB-231, com uma CI_{50} de 0,11 μM (Lin *et al.*, 2020). O Verbascosídeo, um composto fenilpropanóide glicosilado, exibiu efeitos antitumorais em várias linhagens tumorais humanas, incluindo glioblastoma (Hei *et al.*, 2019).

A família Euphorbiaceae compreende aproximadamente 300 gêneros e mais de 5.000 espécies, exibindo uma ampla diversidade química e distribuição em várias regiões da América do Sul e Ásia tropical (Amtaghri *et al.*, 2022). Os caules, folhas, raízes e látex de várias espécies desta família são comumente usados para tratar infecções respiratórias, irritações corporais e cutâneas, distúrbios digestivos, infecções inflamatórias, dores no corpo, picadas de cobra ou escorpião, distúrbios sensoriais, doenças microbianas e o câncer (Forzato; Nitti, 2022).

Considerando a vasta diversidade de espécies pertencentes à família Euphorbiaceae, uma variedade de classes de metabólitos secundários tem sido isolada e identificada, incluindo fenilpropanóides, flavonoides, alcalóides (Duy Khang *et al.*, 2023) e diterpenos (Wang *et al.*, 2020). Além disso, dados da literatura mostram que derivados vegetais obtidos desta família (como extratos, frações e óleos essenciais), bem como substâncias isoladas, apresentam diversas atividades farmacológicas, como efeitos antimicrobianos, antioxidantes, antidiabéticos e anti-inflamatórios (Ma *et al.*, 2021). Especificamente em relação ao potencial anticâncer desta família, muitos estudos demonstraram a atividade antitumoral de metabólitos secundários, extratos e óleos essenciais desta família em modelos experimentais de tumores *in vitro* (Zhong *et al.*, 2022; Du *et al.*, 2020; Mesas *et al.*, 2022) e *in vivo* (Abrantes *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2020; Abdolmohammadi *et al.*, 2021).

Nesse contexto, *Croton velutinus* é uma espécie da família Euphorbiaceae abundantemente encontrada no nordeste do Brasil, comumente conhecida como "pimentinha". A caracterização fitoquímica de *C. velutinus* levou ao isolamento de flavonoides, sesquiterpenos, diterpenos e novos fenilpropanóides (Cezar, 2016) (Figura 13).

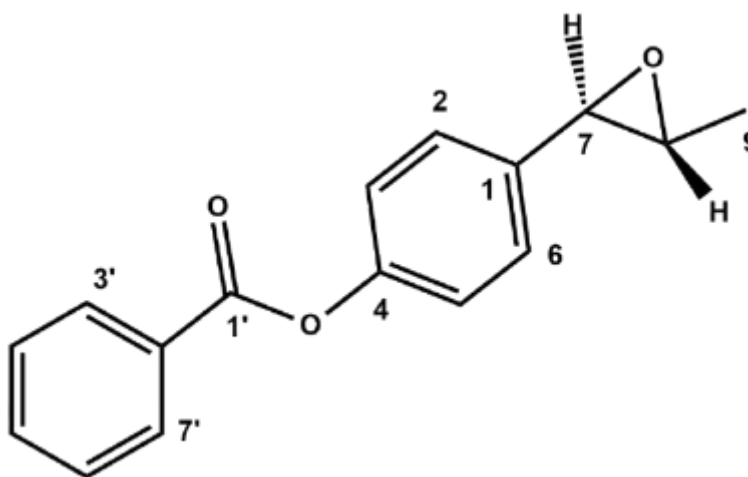
Figura 13. Espécie *Croton velutinus* (Euphorbiaceae) coletada em Morro do Chapéu – BA.



Fonte: Lucas Abreu, 2020.

Dentre os compostos isolados, destaca-se um novo fenilpropanóide obtido das raízes de *C. velutinus*, (E)-4-(1-epoxi-7,8-propenil) fenil benzoato (CV2) (Figura 17) (Abreu *et al.*, 2020).

Figura 14. Estrutura química do Benzoato de (e)-4-(1-epoxi-7,8-propen) fenila (CV2).



Após o isolamento desse composto, foram realizados ensaios para a quantificação de nitrito e da citocina IL-1 β , após estimulação inflamatória de células de macrófagos murinos (J774) com LPS e INF- γ . Foi observado que o CV2 reduziu

significativamente a produção de IL-1 β e nitrito (EC₅₀: 4,3 $\pm$ 0,61 μ M) nestas células, evidenciando o seu efeito anti-inflamatório. O efeito **tripanocida** do CV2 também foi investigada contra a forma infecciosa de *Trypanossoma cruzi* (formas tripomastigotas), mostrando que o composto de fato exerce uma potente atividade tripanocida (EC₅₀: 9,0 $\pm$ 0,59 μ M).

Além disso, o potencial antitumoral do CV2 também foi avaliado em diferentes linhagens tumorais humanas de Leucemia Promielocítica Aguda (HL-60), Carcinoma colorretal (HCT-116), Carcinoma hepatocelular (Hep-G2) e Adenocarcinoma mamário (MCF-7), por meio do ensaio colorimétrico Alamar Blue. O CV2 além de apresentar efeitos anti-inflamatórios e tripanocidas, também mostrou citotoxicidade *in vitro* contra todas as linhagens de células cancerígenas humanas testadas, em particular MCF-7, que foi mais sensível ao tratamento, o que foi evidenciado pelos valores de CI₅₀ (concentração inibitória média) obtidos para estas células: MCF-7 (CI₅₀: 6,8 $\pm$ 1,59 μ M); HL-60 (CI₅₀: 9,8 $\pm$ 2,6 μ M); HCT-116 (CI₅₀: 12,9 $\pm$ 1,8 μ M); HepG2 (CI₅₀: 16,7 $\pm$ 0,7 μ M) (Abreu *et al.*, 2020). No entanto, este novo fenilpropanóide não apresenta estudos que elucidem os prováveis mecanismos de ação antitumorais induzidos.

Diante dos resultados preliminares obtidos e considerando a relevância dos produtos naturais, em particular a potencialidade antitumoral dos fenilpropanóides, o Benzoato de (E)-4-(1-epoxi-7,8-propenil) fenila (CV2), um novo fenilpropanóide isolado das raízes de *Croton velutinus*, foi escolhido neste estudo para aprofundar a investigação da sua citotoxicidade em diferentes modelos experimentais e avaliar os seus possíveis efeitos/mecanismos antitumorais *in vitro* em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar a atividade antitumoral *in vitro* do fenilpropanóide (E)-4-(1-epoxi-7,8-propen)fenilbenzoato (CV2) e sua toxicidade em células humanas e em embriões/larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*).

3.2 Objetivos específicos

- Explorar a citotoxicidade do CV2 em diferentes linhagens de células tumorais humanas (MCF-7, MDA-MB-123, SK-MEL-28, HeLa, HCT-116), não tumoral (MCF-10A) e em Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs);
- Determinar o índice de seletividade (IS) do CV2, utilizando como modelo celular não tumoral a linhagem MCF-10A;
- Investigar o efeito do CV2 sobre a progressão do ciclo celular em células MCF-7;
- Avaliar o tipo de morte celular induzido pelo CV2 (apoptose ou necrose) em células MCF-7;
- Investigar o efeito do CV2 sobre o estado redox em células MCF-7;
- Avaliar o efeito do CV2 sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) JNK (Proteína Cinase c-Jun N-terminal), ERK (Proteína Cinase Regulada por Sinais Extracelulares) e p38 (p38 MAPK), em células MCF-7;
- Avaliar o efeito do CV2 sobre a modulação da PKB/AKT (Proteína Cinase B) e do NF- κ B (Fator Nuclear *kappa* B) em células MCF-7;
- Investigar a toxicidade aguda do CV2 em embriões e larvas de peixe-zebra;
- Determinar a atividade de enzimas relacionados ao estresse oxidativo (glutathione transferase (GST), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx)) em larvas de peixe-zebra;

Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

O Benzoato de (E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen)Fenila (CV2) foi extraído, isolado e caracterizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em colaboração com os professores Dr. Lucas Silva Abreu, Dr. Josean Fachine Tavares e Dr. Marcelo Sobral da Silva.

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do CV2 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 coordenado pela professora Dra Marianna Vieira Sobral.

A avaliação da toxicidade do CV2 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

Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); Histopaque® -1077 (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); Annexin V-FITC/PI apoptosis detection Kit (eBioscience, Thermo Fisher, Rochester, NY); solução de fosfato tamponado (PBS) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); doxorubicina (DXR) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA), penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA), N-acetilcisteína (NAC) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); cloreto de sódio (NaCl) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); cloreto de potássio (KCl) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); cloreto de cálcio (CaCl₂) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); sulfato de magnésio (Mg SO₄) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA); sulfato de sódio (Na₂ SO₄) (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, EUA);

dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica[®], Indaiatuba, SP, Brasil); Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Êxodo Científica[®], Sumaré, SP, Brasil); fitohemaglutinina (GIBCO[®], Grand Island, NY, EUA); tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (GIBCO[®], Grand Island, NY, EUA), Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO[®], Grand Island, NY, EUA); ração para peixes (Tetra[®], Melle, Alemanha); hexano (Biograde[®], Anápolis, GO, Brasil); BD Phosflow™ AlexaFluor[®] 488 mouse anti-AKT (pS473) (BD Biosciences[®], NJ, EUA); BD Phosflow™ PE mouse anti-NF-κB p65 (pS529) (BD Biosciences[®], San Jose, CA, EUA); BD Phosflow™ PerCP-Cy™5.5 mouse anti-ERK1 /2 (pT202/pY204) (BD Biosciences[®], San Jose, CA, EUA); BD Phosflow™ AlexaFluor[®] 647 mouse anti-JNK (pT183/pY185) (BD Biosciences[®], San Jose, CA, EUA); BD Phosflow™ PE-Cy™7 anti-p38 MAPK de camundongo (pT180/pY182) (BD Biosciences[®], San Jose, CA, EUA); U0126 (Sigma-Aldrich[®]; St. Louis, MO, EUA); SP600125 (Sigma-Aldrich[®]; St. Louis, MO, EUA); PD 169316 (Sigma-Aldrich[®]; St. Louis, MO, EUA), RNase (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA) e Triton-X (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA).

As drogas e soluções reagentes foram preparados 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); cabine de fluxo de ar laminar vertical Aeolus V (Telstar[®], São Paulo, Brasil); incubadora de CO₂ MCO-18ACL-PA (Panasonic[®], Osaka, Japão); leitor de multidetecção Synergy HT (BioTek[®], Vermont, EUA); autoclave vertical linha CS-A (Primatec[®], São Paulo, Brasil); estufa de secagem (DeLeo[®] equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil); citômetro de fluxo FacsCanto II (Becton Dickinson[®], New Jersey, EUA); estereomicroscópio Televal 31 (Zeiss[®], Baden-Württemberg, Alemanha); banho-69 maria Aqualine (LAUDA[®], São Paulo, Brasil), geladeira DFN49 (Eletrolux[®], Paraná, Brasil); agitador MS 3 digital (IKA[®], Baden-Württemberg, Alemanha) e câmera fotográfica OverShot A2500 (Canon[®], São Paulo, Brasil).

4.2.3 Obtenção do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2)

Exemplares de *Croton velutinus* foram coletados na cidade de Morro do Chapéu (Bahia, Brasil) (11°33'00"S, 41°09'22"W) em março de 2016 e registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com número de acesso A22E9B0. A espécie foi identificada pela Dra. Maria Lenise Guedes, com exemplar depositado no Herbário Alexandre Leal da Costa (ALCB), localizado no Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (Salvador, Bahia, Brasil), sob número 106742.

A extração e o isolamento do CV2 foram realizados conforme metodologia previamente descrita por Abreu et al. (2020). As raízes (272 g) de *Croton velutinus* foram secas em estufa a 32°C por 72h, seguidas de trituração e maceração com solventes orgânicos. O material seco e pulverizado foi macerado com hexano e metanol. O extrato hexânico (4,5 g) obtido foi submetido à cromatografia em coluna (CC) usando sílica gel como fase estacionária. Solventes hexano e acetato de etila, puros ou em misturas binárias, foram usados como fase móvel. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e submetidas à análise por ressonância magnética nuclear (RMN) (Abreu et al., 2020).

4.2.4 Linhagens celulares

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens celulares tumorais MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano), SK-MEL-28 (melanoma humano), HeLa (câncer cervical humano), HCT-116 (carcinoma colorretal humano) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil). A linhagem não tumoral mamária humana MCF-10A foi cedida pelo Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa, do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica (LAPGENIC), da Universidade Federal do Piauí (UFPI) (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas utilizadas nos ensaios de avaliação da citotoxicidade do CV2

Linhagens ^a	Tipo histológico	Origem	Meios de cultura ^b
MCF-7	Adenocarcinoma mamário	Humana	DEMEM
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamário	Humana	RPMI
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	RPMI
HeLa	Carcinoma cervical	Humana	DEMEM
SK-MEL- 28	Melanoma	Humana	DEMEM
MCF-10A	Mamário	Humana	DEMEM

^aMCF-7: adenocarcinoma mamário; MDA-MB-231: adenocarcinoma mamário; HCT-116: carcinoma colorretal; HeLa: câncer cervical; SK-MEL-28: melanoma; MCF-10A: tecido mamário não tumoral; ^bDEMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; RPMI: *Roswell Park Memorial Institute 1640*.

As células foram cultivadas nos meios *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DEMEM) (MCF-7, MDA-MB-231, SK-MEL-28, HeLa e MCF-10A) e *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI) (HCT-116) (Tabela 1), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% de penicilina-estreptomicina, e mantidas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C.

O crescimento celular foi monitorado diariamente e ao atingirem 80% de confluência foi realizado procedimento para repique celular em fluxo laminar. As células aderentes foram desprendidas da superfície do frasco de cultura celular por meio da incubação com 2 mL da solução de tripsina 0,25%-EDTA, por 4 minutos. Após este período foi adicionado meio suplementado com SBF, na mesma proporção, para neutralizar sua ação. As células foram centrifugadas a 500 × *g*, por 5 minutos, em seguida o pellet foi ressuspensionado em meio suplementado com SBF para a contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada usando o corante azul de tripan e a concentração celular foi ajustada para 1×10⁵ células/mL.

4.2.5 Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas

O efeito citotóxico do CV2 foi avaliado em células de sangue periférico (PBMCs) humanas, por meio do ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). As PBMCs incluem monócitos e linfócitos (Betsou *et al.*, 2019), podendo 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 ($400 \times g$, 20°C , por 30 min) das amostras de sangue em tubos contendo o reagente Histopaque®-1077. Posteriormente, a interface contendo as células mononucleares foi coletada e lavada com PBS ($400 \times g$, 10 min, 20°C). Antes do tratamento com CV2 ou a droga padrão doxorrubicina (DXR), as PBMCs foram ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SBF, 1% penicilina-estreptomicina e 2% fitohemaglutinina, e cultivadas em placas de 96 poços (1×10^6 células/mL) (100 μL por poço), a 37°C com 5% de CO_2 , por 24 h (Lisboa *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2023a).

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 2).

4.2.6 Embriões de peixe zebra e condições experimentais

Embriões de zebrafish (cepa selvagem AB) com aproximadamente 1 hora pós-fertilização (hpf) foram fornecidos pela Unidade de Produção de Organismos Modelo Alternativos (UniPOM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brasil. Os peixes reprodutores foram mantidos em um sistema de recirculação com monitoramento regular dos parâmetros de qualidade da água, incluindo pH, níveis de amônia e nitrito. O ambiente de manutenção foi controlado com temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 14:10 horas. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial (Color Bits Tetra, Melle, Alemanha) e espirulina liofilizada (Fazenda Tamanduá, Patos, Brasil), sendo também monitorados para detectar comportamentos anormais ou sinais de doenças.

No dia anterior ao experimento, zebrafish adultos (proporção macho:fêmea de 2:1) foram transferidos para um tanque de reprodução de 7 L equipado com uma malha no fundo e uma válvula de abertura rápida para coleta dos embriões. Os embriões foram coletados no dia do experimento e cultivados em meio embrionário E3 adaptado (5,0 mM de NaCl, 0,17 mM de KCl, 0,33 mM de CaCl e 0,33 mM de MgSO_4) contendo 0,005% de azul de metileno. Apenas desovas com taxa de fertilização $\geq 90\%$ foram incluídas no estudo. Embriões viáveis, caracterizados por padrões normais de clivagem e ausência de anormalidades morfológicas, foram

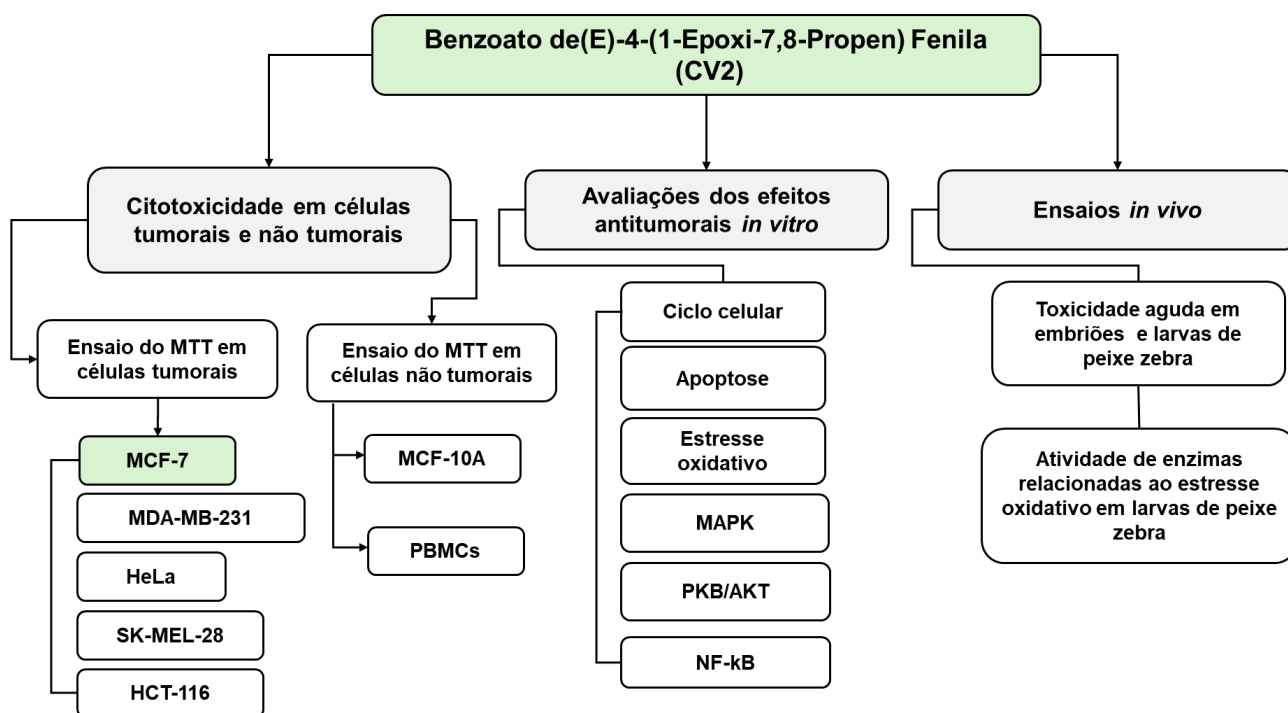
selecionados utilizando um microscópio de luz invertida (Televal 31, Zeiss, Alemanha) com aumento de 50x.

Os procedimentos experimentais envolvendo zebrafish foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB, com autorização documentada sob o protocolo nº 8881290419.

4.3 Métodos

A metodologia proposta para este estudo seguiu o esquema representativo a seguir (Figura 15).

Figura 15. Representação esquemática dos métodos utilizados para avaliação da toxicidade e atividade antitumoral do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen)Fenila (CV2).



4.3.1 Avaliação da citotoxicidade do CV2 em linhagens tumorais e não tumoral humanas e determinação do índice de seletividade (IS)

O ensaio colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983; Riss, 2016; MTT Cell Proliferation Assay, 2021) foi utilizado para a análise da citotoxicidade após o tratamento com CV2. Para isto, as células tumorais (MCF-7, HCT-116, MDA-MB-231, HeLa e SK-MEL-128) e não tumoral (MCF-10A) foram semeadas (100 µL/poço) nas concentrações de 3×10^5 células/mL (SK-MEL 28, HeLa, HCT-116) e 2×10^5 células/mL em cada poço (MCF-7, MDA-MB-231) em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C, com 5% de CO₂. Após 24h de incubação, as células foram tratadas com 100 µL do CV2 em diferentes concentrações (3, 12-200 µM) e novamente incubadas por 72h. A Doxorrubicina (2 µM) (DXR) foi usada como o fármaco padrão. Após o período de incubação com as amostras, foi removido 110 µL de meio e, em seguida o MTT (10 µL; 5mg/mL) foi adicionado a cada poço e incubado por quatro horas, a 37 °C, em estufa de CO₂. Os cristais de formazan precipitados foram dissolvidos com SDS (dodecil sulfato de sódio, 100 µL) *overnight* e em seguida as densidades ópticas foram analisadas usando um leitor de microplacas (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA), em $\lambda = 570$ nm para calcular a CI₅₀ (concentração inibitória média) (Lisboa *et al.*, 2020; Duarte *et al.*, 2022; Ferreira *et al.*, 2023a).

A partir dos valores de CI₅₀ obtidos foi calculado o índice de seletividade (IS), determinado de acordo com a fórmula abaixo:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ da linhagem celular não tumoral (MCF-10A)}}{CI_{50} \text{ da linhagem celular tumoral (MCF-7; MDA-MB-231; HCT-116; HeLa; SK-MEL-28)}}$$

4.3.2 Avaliação da citotoxicidade do CV2 em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas

Após a coleta, isolamento e cultivo das PBMCs, conforme descrito no item 4.2.5, as células foram expostas ao CV2 (1,25; 2,5; 5, 10 e 20 µM) e DXR (0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 e 5 µM) por 72h. Em seguida, as placas foram centrifugadas (500 ×g, 24°C, 5 min), o sobrenadante foi descartado (110 µL) e 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4h (37 °C, 5% de CO₂). Os cristais de formazan precipitados foram solubilizados com SDS (100 µL) e mantidos em agitação contínua *overnight* (Mosmann, 1983). Posteriormente as amostras foram analisadas em leitor de microplacas (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA,

EUA) em $\lambda = 570 \text{ nm}$, para calcular a CI_{50} (concentração que inibe 50% da viabilidade celular).

4.3.3 Investigação dos efeitos antitumorais do CV2

Os efeitos antitumorais do CV2 foram investigados em MCF-7, a linhagem mais sensível ao tratamento, utilizando-se as concentrações de 5 e 10 μM do CV2, correspondentes à CI_{50} e ao dobro da CI_{50} de 72 horas, respectivamente.

Os ensaios e metodologias propostos estão descritos a seguir.

4.3.3.1 Análise da ação do CV2 na progressão do ciclo celular

Para avaliar o efeito do CV2 na progressão do ciclo celular, as células MCF-7 foram semeadas (1×10^5 células/mL) em placas de 24 poços e incubadas com o CV2 nas concentrações de 5 e 10 μM (correspondendo à CI_{50} e ao dobro da CI_{50} obtidas no ensaio do MTT, respectivamente) ou DXR (2 μM , correspondendo à CI_{50}) por 48 h. Após esse período, as células foram coletadas, centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 min), ressuspensas em PBS, fixadas sob agitação em etanol 70% pré-resfriado, e congeladas (-20 °C) até a análise.

No momento da análise, as células foram recuperadas por centrifugação ($400 \times g$, 10 min, 4°C), permeabilizadas (25 °C, 30 min) com Triton-X 1%, lavadas com PBS e incubadas com RNase (0,1 mg/mL) e iodeto de propídeo (IP; 0,05 mg/mL) no escuro (25 °C, 30 min) (Duarte *et al.*, 2022; Andrade *et al.*, 2024). A análise foi realizada no citômetro de fluxo FacsCanto II (Becton Dickinson®, New Jersey, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Foram determinadas as porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1; S; G2/M), bem como células subdiploides (sub-G1). Os dados foram obtidos utilizando o software DIVA 6.0. Três experimentos independentes foram realizados em duplicata.

4.3.3.2 Avaliação da morte celular por apoptose com a marcação de anexina V-FITC e iodeto de propídeo

Para avaliar o efeito do CV2 na morte celular por apoptose, as células MCF-7 foram semeadas (1×10^5 células/mL) em placas de 24 poços, e após 24 horas tratadas com o CV2 (5 e 10 μ M) ou DXR (2 μ M) por 48 h. Em seguida, as células foram coletadas, centrifugadas (500x g, 20 °C, 5 min) e ressuspensas em tampão de ligação. Posteriormente, as células foram marcadas com Anexina V – FITC e incubadas à temperatura ambiente durante 10 min, no escuro. Após este período, as células foram lavadas com o tampão de ligação, centrifugadas (500x g, 20°C, 5 min), ressuspensas novamente em tampão de ligação, e marcadas com IP (20 μ g/mL), conforme orientações do fabricante (eBioscience, Thermo Fisher, Rochester, NY). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo, adquirindo-se 10.000 eventos/amostra (Sousa *et al.*, 2024; Ferreira *et al.*, 2023b). Os dados foram obtidos utilizando o software DIVA 6.0. Três experimentos independentes foram realizados em duplicata.

4.3.3.3 Avaliação do efeito do CV2 sobre o estado redox celular

4.3.3.3.1 Ensaio do 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA)

Para avaliar o efeito do tratamento com CV2 no estado redox celular, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi estimada pelo método de oxidação do reagente diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (Hasui; Hirabayashi; Kobayashi, 1989). Para isso, as células MCF-7 foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^5 células/mL) e após 24 h expostas ao CV2 (5 e 10 μ M), a DXR (2 μ M) ou ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (500 μ M) na presença do DCFH-DA (10 μ M). Após o período de incubação (30 min ou 3 h), as células foram tripsinizadas, lavadas e ressuspensas em PBS. A análise foi realizada por citometria de fluxo, adquirindo-se 10.000 eventos/amostra, em fluorescência de 530 nm e comprimento de excitação de 485 nm (Lopes *et al.*, 2023; Sousa *et al.*, 2024). Os dados foram obtidos com o *software* DIVA 6.0. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.3.3.3.2 Avaliação da citotoxicidade do CV2 na presença e na ausência de N-acetilcisteína (NAC)

Para avaliar o envolvimento das EROs no efeito citotóxico do CV2, as células MCF-7 foram pré-tratadas com N-acetilcisteína (NAC), uma molécula antioxidante

que atua neutralizando estas espécies, bem como servindo de precursora para a síntese de glutathiona (Marco; Foti; Corsico, 2022). Para isto, as células MCF-7 (1×10^5 células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços e após 24h incubadas na presença ou ausência de NAC (5 mM) por 3 h, em estufa de CO₂. Decorrido este período, as células foram tratadas com 5 ou 10 μ M do CV2. Após 72 h de incubação, o sobrenadante foi descartado e a solução de MTT (10 μ L, 5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4 h. Em seguida o formazan depositado foi dissolvido com SDS *overnight* (Mosmann, 1983) e a viabilidade celular (%) das amostras foi estimada a partir das densidades ópticas obtidas usando um leitor de microplacas (λ = 570 nm) (Ferreira *et al.*, 2023a; Sousa *et al.*, 2024). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.3.3.4 Avaliação do efeito do CV2 sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)

Para investigar o efeito do CV2 na modulação destas proteínas as células MCF-7 foram semeadas (1×10^5 células/mL) em placas de 24 poços. Após 24 h, as células foram incubadas com CV2 (5 e 10 μ M) por 48 h. Posteriormente, as células foram coletadas, centrifugadas (500 $\times g$ 20°C, 5 min), fixadas em formaldeído (10 min, a 37°C), lavadas e permeabilizadas em solução tampão específica. Em seguida, as células foram ressuspensas e marcadas com anticorpos anti-ERK1/2, anti-JNK ou anti-p38 MAPK, de acordo com as recomendações do fabricante (BD Biosciences ® , NJ, EUA). Após 30 min de incubação com os anticorpos (25 °C, no escuro), as células foram lavadas e centrifugadas (300 $\times g$ 4 °C, 5 min), o sobrenadante foi removido, as células foram ressuspensas mais uma vez e a análise foi realizada em citômetro de fluxo, adquirindo-se 10.000 eventos/amostra (Ferreira *et al.*, 2023b; Sousa *et al.*, 2024). Os dados foram obtidos utilizando o software DIVA 6.0. Três experimentos independentes foram conduzidos em triplicata.

4.3.3.5 Avaliação da citotoxicidade do CV2 na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)

Para avaliar o envolvimento das MAPKs na citotoxicidade do CV2, o ensaio do MTT foi realizado na presença ou ausência de inibidores das MAPKs. Células

MCF-7 foram semeadas (1×10^5 células/mL) em placas de 96 poços e incubadas durante 24 horas, a 37°C, com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram incubadas na presença ou ausência do inibidor de ERK (U0126, 5 µM), inibidor de JNK (SP600125, 5 µM) e do inibidor de p38 MAPK (PD 169316, 5 µM) por 3 h. Após este período, as células foram tratadas com CV2 (5 ou 10 µM) e incubadas por 72 h (5% de CO₂, a 37 °C). Ao término do tratamento, o MTT foi adicionado (10 µL, 5 mg/mL) e a placa foi incubada por 4 h, em estufa de CO₂, a 37 °C. Os cristais de formazan foram dissolvidos com SDS *overnight* (Mosmann, 1983) e a viabilidade celular (%) das amostras foi estimada a partir das densidades ópticas obtidas usando um leitor de microplacas (λ = 570 nm) (Ferreira *et al.*, 2023a; Sousa *et al.*, 2024). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.3.3.6 Avaliação do efeito do CV2 sobre a modulação das proteínas NF-κB e PKB/AKT

Para investigar o efeito do CV2 na modulação destas vias de sinalização as células MCF-7 foram semeadas (1×10^5 células/mL) em placas de 24 poços e após 24 h tratadas com o CV2 (5 e 10 µM) e DXR (2 µM). Após 48h de incubação, as células foram coletadas, centrifugadas (500 x g, 20°C, 5 min) e fixadas por 30 min, a 4°C. Posteriormente, as células foram permeabilizadas (30 min em gelo), lavadas, ressuspensas e marcadas com os anticorpos anti-NF-κB/p65 ou anti-PKB/AKT, seguindo as recomendações do fabricante (BD Biosciences ® , NJ, EUA). Após 30 min de incubação (25°C, no escuro), as células foram novamente lavadas, centrifugadas (300 x g, 4°C, 5 min) e o sobrenadante foi removido. Em seguida, as células foram ressuspensas e a análise foi realizada em citômetro de fluxo, adquirindo-se 10.000 eventos/amostra (Ferreira *et al.*, 2023b). Os dados foram obtidos utilizando o software DIVA 6.0. Três experimentos independentes foram realizados em duplicata.

4.3.4 Investigação da toxicidade aguda do CV2 em embriões e larvas de peixe-zebra

O ensaio para investigação da toxicidade aguda em peixe zebra (teste FET) foi conduzido de forma independente com o CV2, de acordo com a diretriz nº 236 da OECD (OECD, 2013), com adaptações propostas por Muniz *et al.* (2021).

Embriões de peixe-zebra com até 3 horas pós-fertilização (hpf) foram expostos a cinco concentrações crescentes (2,0, 2,5, 3,0, 3,5 e 4,0 µM) do CV2. Em placas de 96 poços, foram reservados 20 poços para cada concentração testada, acomodando 1 embrião/poço em 0,3 mL de solução teste. Nas mesmas condições foram preparadas exposições com meio embrionário E3 (controle negativo) e em DMSO 0,1% (controle do solvente). 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; não desprendimento da base da cauda do saco vitelino e ausência 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.

O número de mortes e efeitos não letais prevalentes (presença em pelo menos três concentrações) foram usados para calcular a CL₅₀ (concentração letal mediana) por meio de análise probit (Finney, 1971).

As exposições foram realizadas 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 (Moticam+ Motic, Canadá). Após 96 h, as larvas sobreviventes foram eutanasiadas com overdose de óleo de cravo da Índia (0,5 mL/L), sendo mantidas congeladas até o momento da incineração.

4.3.5 Avaliação da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra expostas ao CV2

O teste FET foi repetido para o CV2 nas mesmas condições descritas no item anterior, porém os embriões foram expostos de forma independente a três

concentrações subletais do CV2 (0,12, 0,25 e 0,50 μM) (Martins *et al.*, 2021). Após 96 h de exposição, as larvas foram congeladas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4. Em seguida, 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 mensurar o conteúdo de proteína solúvel e atividade das enzimas glutathione transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (Domingues *et al.* 2010; Ferreira *et al.*, 2023a).

Os testes foram realizados em quadruplicata para cada enzima. Os experimentos conduzidos com peixe-zebra foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), com autorização documentada pelo protocolo número 5391250222 (Anexo 1).

4.3.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* 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 pós teste de Tukey ($p < 0,05$).

As CL_{50} e seus intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram obtidos por análise de regressão não-linear. Para o ensaio de embriotoxicidade com peixe zebra, a concentração letal mediana (CL_{50}) foi calculada por análise de regressão probit.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas

Os resultados do ensaio de redução do MTT com o CV2 estão expressos como a concentração que produz 50% de redução da viabilidade celular (CI_{50}), conforme demonstrado na tabela 2, que também apresenta os valores do índice de seletividade (IS) calculados.

Tabela 2. Citotoxicidade do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2) e da Doxorrubicina (DXR) em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas após 72 h de tratamento.

Linhagem celular ^a	CI_{50} ^b		IS ^c	
	CV2 (μ M)	DXR (μ M)	CV2	DXR
MCF-7	4,63 $\pm$ 0,16	1,53 $\pm$ 0,20	9,69	0,44
MDA-MB-231	23,72 $\pm$ 1,76	0,2 $\pm$ 0,02	1,85	3,4
HCT-116	12,85 $\pm$ 1,16	2,57 $\pm$ 0,01	3,43	0,26
HeLa	51,78 $\pm$ 0,79	3,80 $\pm$ 1,10	0,86	0,17
SK-MEL- 28	16,62 $\pm$ 1,22	3,55 $\pm$ 1,67	2,65	0,19
MCF-10A	44,09 $\pm$ 1,00	0,68 $\pm$ 0,07	-	-

^aMCF-7: adenocarcinoma mamário; MDA-MB-231: adenocarcinoma mamário; HCT-116: carcinoma colorretal; HeLa: câncer cervical; SK-MEL-28: melanoma; MCF-10A: linhagem celular epitelial mamária não tumoral; ^bConcentração que reduz 50% da viabilidade celular; ^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%.

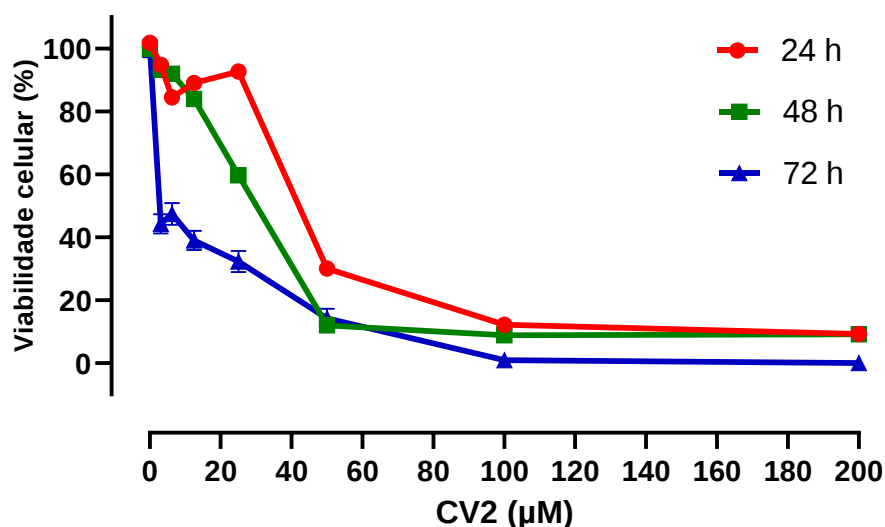
O CV2 induziu citotoxicidade nas linhagens tumorais após 72 horas de tratamento, com menor efeito na linhagem de câncer cervical HeLa (CI_{50} : 51,98 $\pm$ 0,79 μ M), enquanto as células da linhagem de câncer mamário MCF-7 mostraram-se as mais sensíveis ao tratamento (CI_{50} : 4,63 $\pm$ 0,16 μ M). Em relação à linhagem não tumoral mamária humana (MCF-10A), o CV2 apresentou CI_{50} de 44,09 $\pm$ 1,00 μ M, enquanto a doxorrubicina CI_{50} de 0,68 $\pm$ 0,07 μ M, após 72 h de tratamento. Então, a partir dos valores de CI_{50} obtidos, foi determinado o IS do CV2 e da doxorrubicina (DXR) utilizando como modelo celular não tumoral a linhagem de células epiteliais

mamária humana MCF-10A. O CV2 apresentou maior IS para as células da linhagem MCF-7 (9,69), conforme observado na tabela 1.

Diante desses resultados, a linhagem MCF-7 foi escolhida para dar continuidade aos experimentos, com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico do CV2 por meio da determinação da CI_{50} em diferentes tempos de tratamento.

Conforme observado na figura 16, o CV2 apresentou citotoxicidade significativa na linhagem MCF-7 após 24, 48, e 72h de tratamento (CI_{50} : $41,29 \pm 3,39 \mu M$; $29,22 \pm 1,65 \mu M$ e $4,63 \pm 0,16 \mu M$, respectivamente). Em adição, a doxorrubicina, utilizada como droga padrão, mostrou valor de CI_{50} de $1,53 \pm 0,20 \mu M$, após 72 h de tratamento.

Figura 16. Citotoxicidade do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2) em linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7 após 24, 48 e 72 h de tratamento.

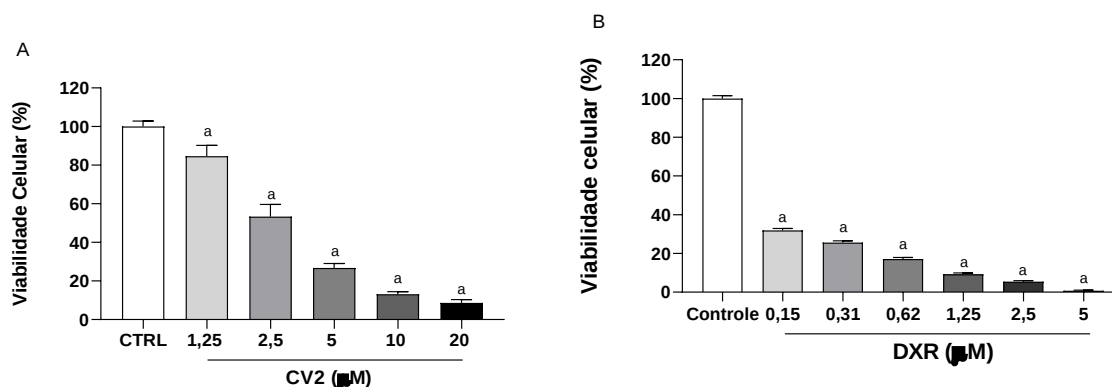


Viabilidade celular (%) após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com o CV2. Dados obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.2 Citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humanas

A citotoxicidade de CV2 também foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC). O CV2 apresentou CI_{50} de $1,75 \pm 0,06 \mu M$ (Figura 17A) e a doxorrubicina apresentou CI_{50} de $0,06 \pm 0,006 \mu M$ (Figura 17B) para estas células, após 72h de tratamento.

Figura 17. Citotoxicidade do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila e da Doxorrubicina (DXR) em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMNC) após 72h de tratamento.



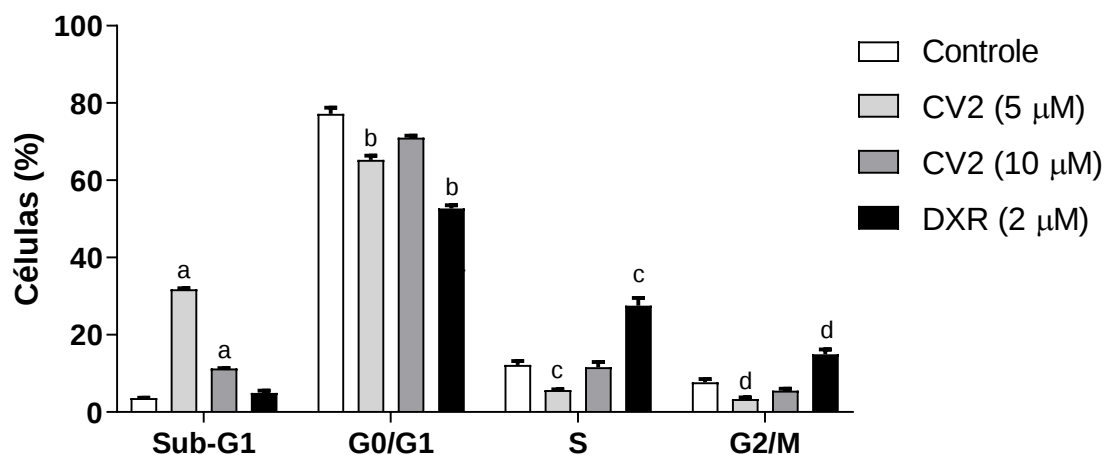
Viabilidade celular (%) após 72 h de tratamento com CV2 (**A**) e DXR (**B**). Dados obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de *Dunnet*. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.3 Efeito do CV2 sobre a progressão do ciclo celular

Após 48 horas de tratamento com o CV2, foi possível observar um aumento significativo do percentual de células na população sub-G1 (5 µM: $31,77 \pm 4,93\%$ e 10 µM: $11,29 \pm 0,12\%$, $p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle ($3,50 \pm 0,1\%$). Este efeito foi acompanhado de uma redução no percentual de células nas fases G0/G1 (5 µM: $65,28 \pm 1,19\%$, $p < 0,05$), S (5 µM: $5,71 \pm 0,78\%$, $p < 0,05$) e G2/M (5 µM: $3,40 \pm 0,42\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($77,18 \pm 1,59\%$; $12,21 \pm 1,01\%$; $7,71 \pm 0,79\%$, respectivamente) (Figura 18).

A Doxorrubicina (2 µM) também aumentou nas fases: S ($27,52 \pm 2,04\%$, $p < 0,05$) e G2/M ($14,96 \pm 1,27\%$, $p < 0,05$) enquanto na fase G0/G1 reduziu o percentual de células ($57,62 \pm 0,88\%$, $p < 0,05$), quando comparados ao controle ($77,18 \pm 1,59\%$; $12,21 \pm 1,01\%$; $7,71 \pm 0,79\%$) respectivamente.

Figura 18. Efeito do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) e da doxorubicina (DXR, 2 μ M) na linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7 nas diferentes fases do ciclo celular após 48 horas de tratamento.



Percentual de células em cada fase do ciclo celular. Dados obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle Sub-G1; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo controle G0/G1; ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo controle S; ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo controle G2/M.

5.4 Indução de apoptose por CV2

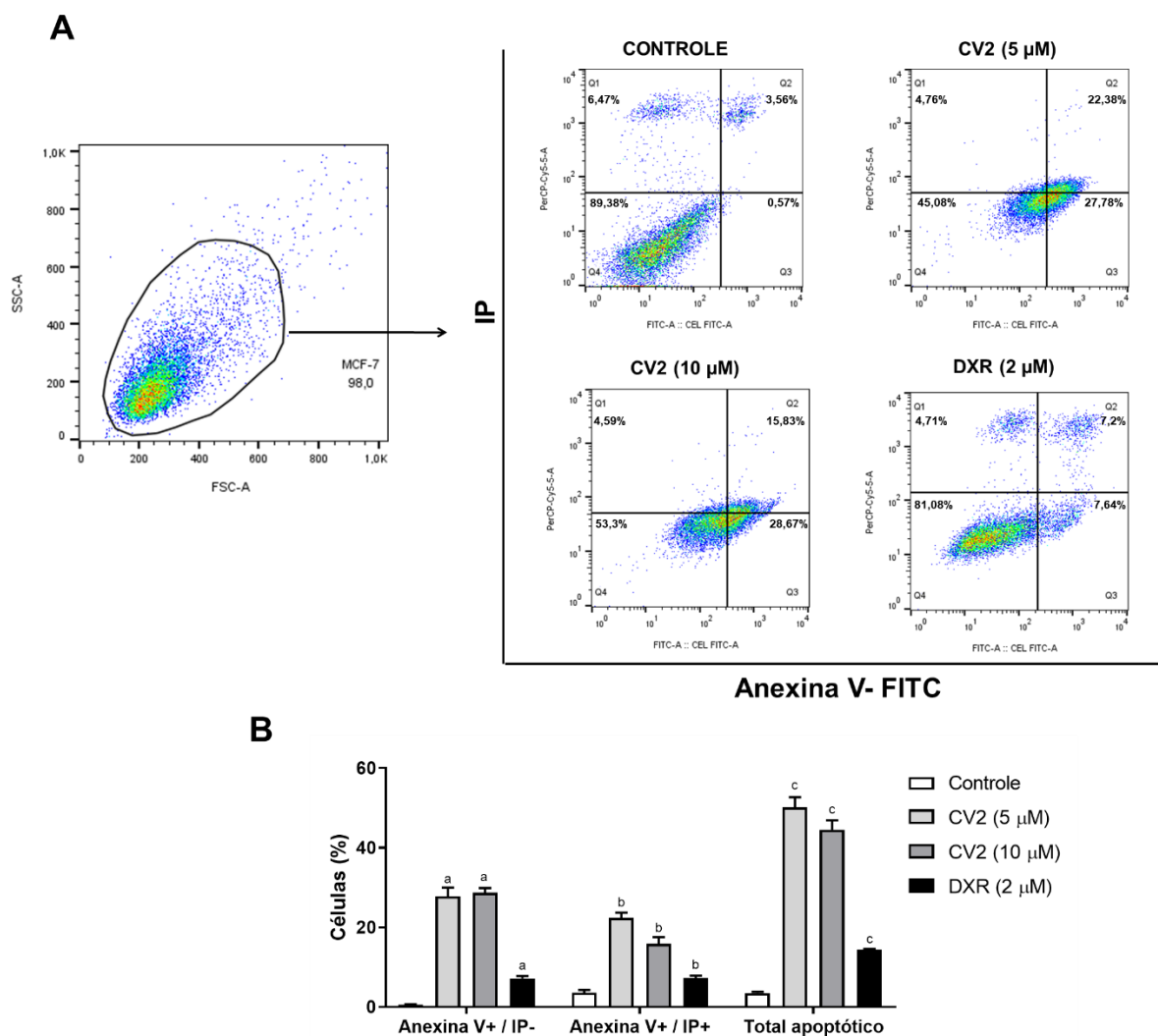
5.4.1 Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo

Após tratamento de 48 horas com o CV2, as células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP) e analisadas por citometria de fluxo. Como observado na figura 4, verificou-se aumento significativo do percentual de células marcadas apenas com Anexina V-FITC (5 μ M: $27,78 \pm 2,17\%$; e 10 μ M: $28,67 \pm 1,19\%$, $p < 0,05$ para ambos) e duplamente marcadas com Anexina V-FITC e IP (5 μ M: $22,38 \pm 1,32\%$; e 10 μ M: $15,83 \pm 1,72\%$ $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($0,57 \pm 0,10\%$ e $3,56 \pm 0,69\%$, respectivamente).

Estes resultados permitem observar que o tratamento com o CV2 aumentou significativamente o percentual de células apoptóticas (apoptose total) nas concentrações utilizadas (5 μ M: $50,17 \pm 2,52\%$; e 10 μ M: $44,50 \pm 2,37\%$, $p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle ($4,17 \pm 0,32\%$) (Figura 19).

A doxorubicina induziu aumento significativo do número de células em apoptose inicial ($7,64 \pm 0,66\%$, $p < 0,05$), tardia ($7,2 \pm 0,67\%$, $p < 0,05$) e total ($14,84 \pm 0,23\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (Figura 19).

Figura 19. Efeito do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2 5 ou 10 μM) e da Doxorubicina (DXR, 2 μM) em linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP) após 48 horas de tratamento.



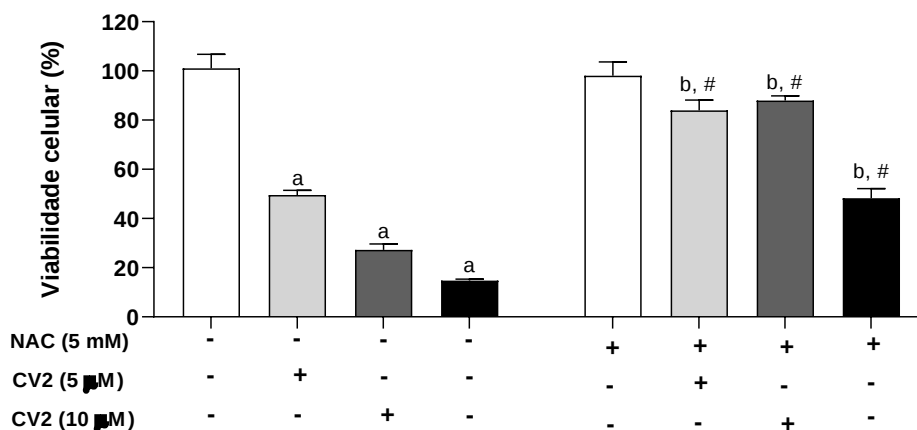
(A) Dotplots representativos obtidos por meio da análise de citometria de fluxo. Os dotplots foram divididos em quatro quadrantes que representam diferentes populações celulares: células viáveis (anexina V-FITC-/IP-, quadrante inferior esquerdo), células em apoptose precoce (anexina V-FITC+/IP-, quadrante 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)** Representação gráfica dos resultados obtidos a partir dos dotplots. A porcentagem de células marcadas com anexina V-FITC (apoptose inicial), anexina V-FITC e IP (apoptose tardia/necrose) e o total apoptótico (células em apoptose inicial e tardia/necrose) foi evidenciado. 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. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle Anexina V-FITC V+/IP-; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo controle Anexina V-FITC V+/IP+; ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo controle Total apoptótico.

5.5 Efeito do CV2 sobre o estado redox celular na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

Após 72 horas de tratamento, na ausência de N-acetilcisteína (NAC), foi observada redução significativa da viabilidade celular após tratamento com CV2 nas concentrações de 5 μ M ($52,47 \pm 0,22\%$, $p < 0,05$) e 10 μ M ($66,03 \pm 0,17\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($99,97 \pm 1,18\%$). O pré-tratamento de 3 horas com a N-acetilcisteína (NAC, 5 mM) preveniu o efeito citotóxico do CV2 quando comparado aos grupos tratados apenas com CV2 (CV2 5 μ M na presença de NAC: $73,09 \pm 1,02\%$; CV2 10 μ M na presença de NAC: $87,90 \pm 1,00\%$ $p < 0,05$ para ambos) (Figura 20).

Figura 20. Citotoxicidade do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) em linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC) por 72 horas.



Viabilidade celular (%) após 72h de tratamento com CV2 e DXR na presença ou ausência de NAC. Dados obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle na ausência de NAC; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo controle na presença de NAC; [#] $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo na ausência de NAC.

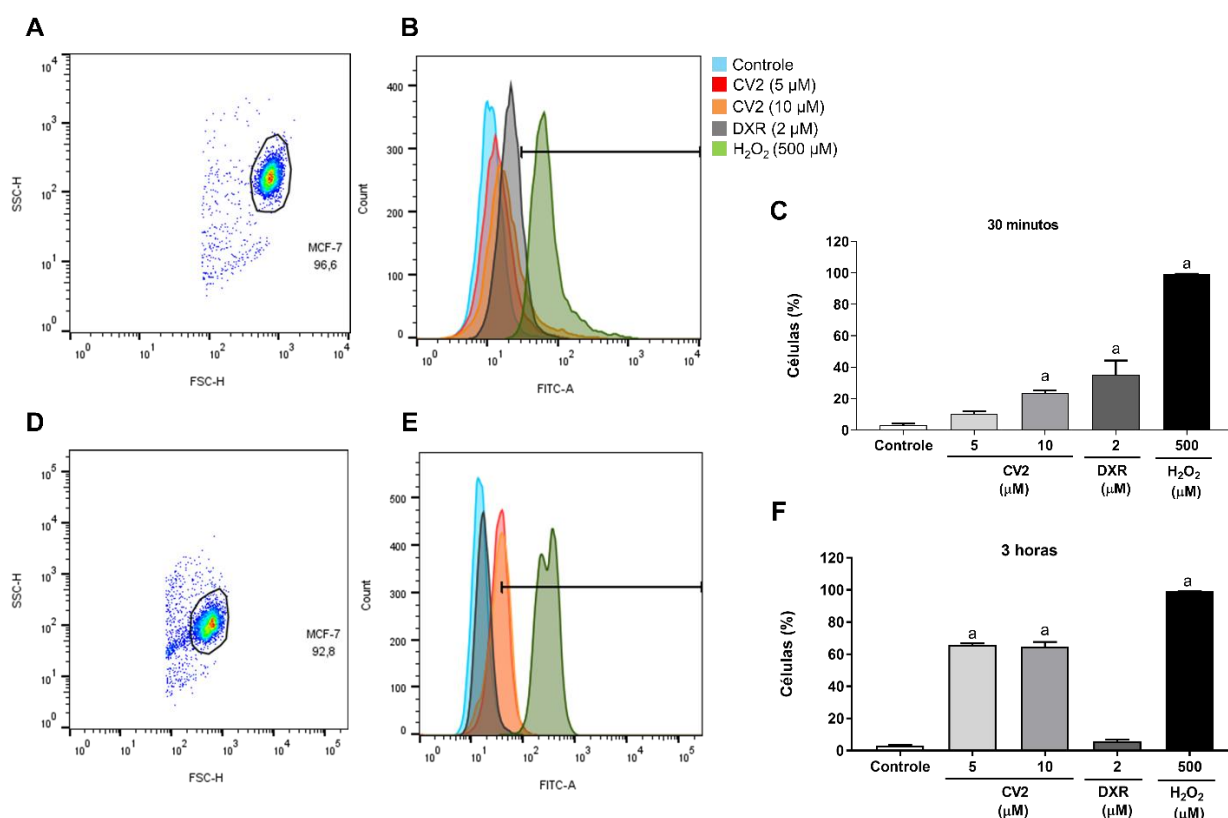
5.6 Efeito do CV2 na produção de espécies reativas de oxigênio

No ensaio do 2'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), o tratamento com CV2 (5 ou 10 μ M) aumentou significativamente o percentual de células fluorescentes após 30 minutos (10 μ M: $23,78 \pm 1,42\%$, $p < 0,05$), e após 3

horas (CV2 5 μM : $65,83 \pm 0,94\%$; CV2 10 μM : $64,84 \pm 2,78\%$, $p < 0,05$ para ambos) de tratamento, quando comparado ao grupo controle (30 minutos: $3,17 \pm 0,90\%$ e 3 horas: $3,10 \pm 0,34\%$) (Figura 21).

A Doxorrubicina, utilizada como droga padrão, induziu aumento significativo do percentual de células fluorescentes no tempo de 30 minutos ($35,18 \pm 9,04\%$ $p < 0,05$) em relação ao grupo controle. No tempo de 3 horas, não houve aumento significativo do percentual de células fluorescentes em comparação ao grupo controle. Como esperado, no grupo tratado com o peróxido de hidrogênio, observou-se aumento significativo do percentual de células fluorescentes em 30 minutos ($99,42 \pm 0,04\%$, $p < 0,05$) e 3 horas de exposição ($99,99 \pm 0,01\%$, $p < 0,04$), quando comparado ao grupo controle (30 minutos: $3,17 \pm 0,90\%$ e 3 horas: $3,10 \pm 0,34\%$) (Figura 21).

Figura 21. Efeito do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μM) e da Doxorrubicina (DXR, 2 μM) no percentual de células fluorescentes após incubação com o 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), em diferentes tempos de tratamento.



Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em células MCF-7 após 30 minutos ou 3 h de incubação com CV2 (5 ou 10 μM) ou DXR (2 μM) e 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFDA). **(A)** e **(D)**: a população de células MCF-7 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)**: *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)** e **(F)**:

representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. Dados obtidos de três experimentos independentes realizados em duplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.
Legenda: H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

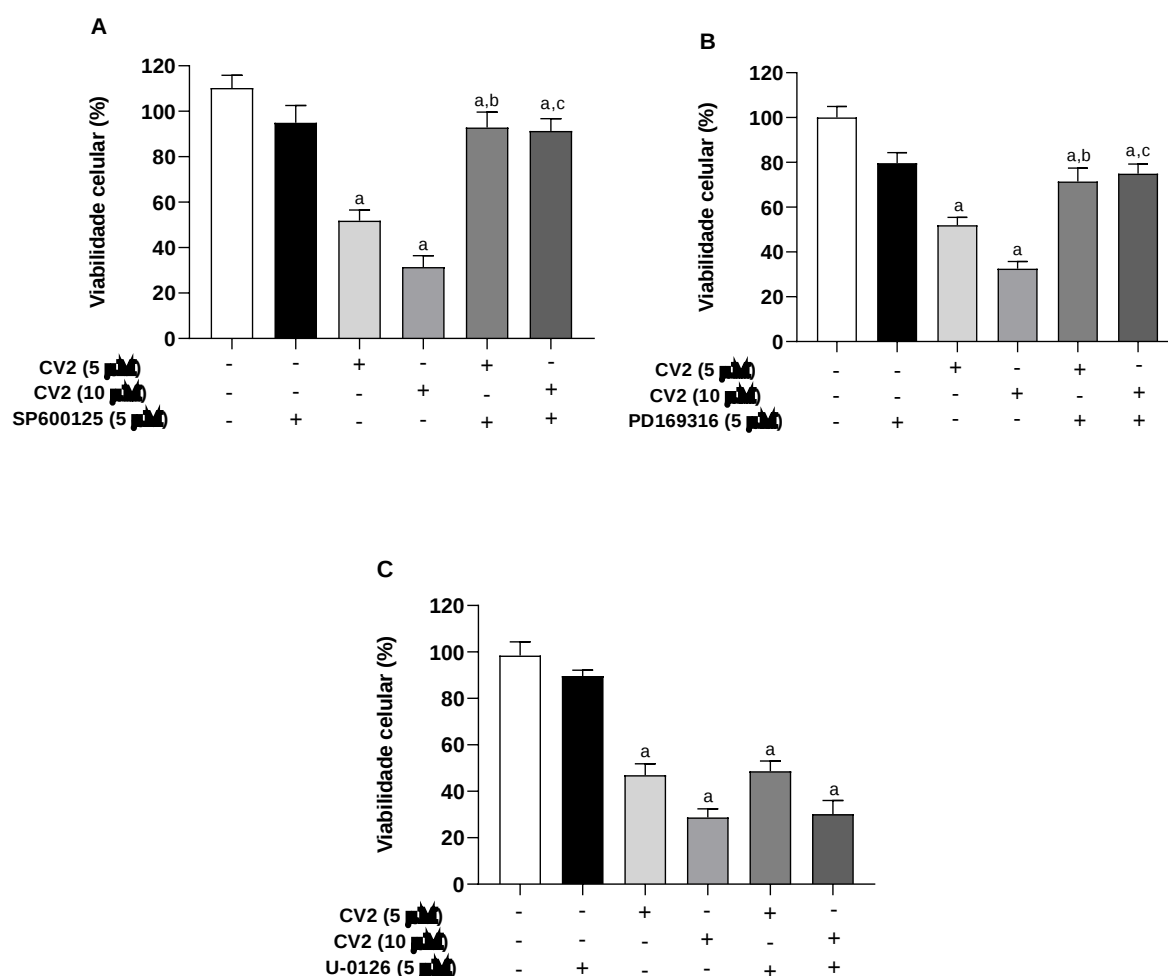
5.7 Efeito de inibidores de MAPKs na citotoxicidade do CV2

Ao avaliar o efeito do CV2 na presença ou ausência de inibidores das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (iMAPKs), obteve-se a figura 8.

Após o tratamento de 72 h com CV2 (5 ou 10 μ M) houve uma significativa redução do efeito citotóxico na presença do inibidor de JNK_{1/2/3}, elevando a viabilidade celular para $92,81 \pm 2,80\%$ e $91,30 \pm 2,45\%$ ($p < 0,05$), respectivamente, quando comparado ao grupo tratado apenas com o CV2 (5 μ M: $51,89 \pm 1,65\%$; 10 μ M: $31,46 \pm 1,77\%$) (Figura 22A). O pré-tratamento com o inibidor de p38 preveniu o efeito citotóxico de CV2 aumentando de forma significativa a viabilidade celular (5 μ M: $71,50 \pm 1,37\%$; 10 μ M: $74,91 \pm 1,88\%$, $p < 0,05$) em relação ao grupo de células tratadas apenas com o CV2 (5 μ M: $51,91 \pm 1,10\%$; 10 μ M: $32,53 \pm 1,01\%$) (Figura 22B).

Já o pré-tratamento com o inibidor de ERK_{1/2}, conforme observado na figura 8C, não alterou significativamente o efeito citotóxico do CV2 (5 μ M: $48,67 \pm 1,46\%$; 10 μ M: $30,17 \pm 1,95$), quando comparado aos grupos tratados apenas com o CV2 (5 μ M: $46,97 \pm 1,61\%$; 10 μ M: $28,75 \pm 1,22$) (Figura 22C).

Figura 22. Citotoxicidade do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2) (5 ou 10 μ M) na presença ou ausência de inibidores da JNK1/2/3 (SP600125), p38 (PD169316) e ERK1/2 (U-0126) em células da linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 72h.



Viabilidade celular (%) após 72h de tratamento com CV2 (5 ou 10 μ M) com ou sem o pré-tratamento de 3h com iJNK_{1/2/3} (5 μ M) (A), ip38 (5 μ M) (B) e iERK_{1/2} (5 μ M) (C). Dados obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com 5 μ M de CV2; ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com 10 μ M de CV2.

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

Como demonstrado na Figura 23, o uso de anticorpos anti-JNK_{1/2} permitiu a observação de um aumento significativo no percentual de células marcadas após 48 horas de tratamento com o CV2, nas concentrações de 5 ou 10 μ M ($98,17 \pm 0,46\%$;

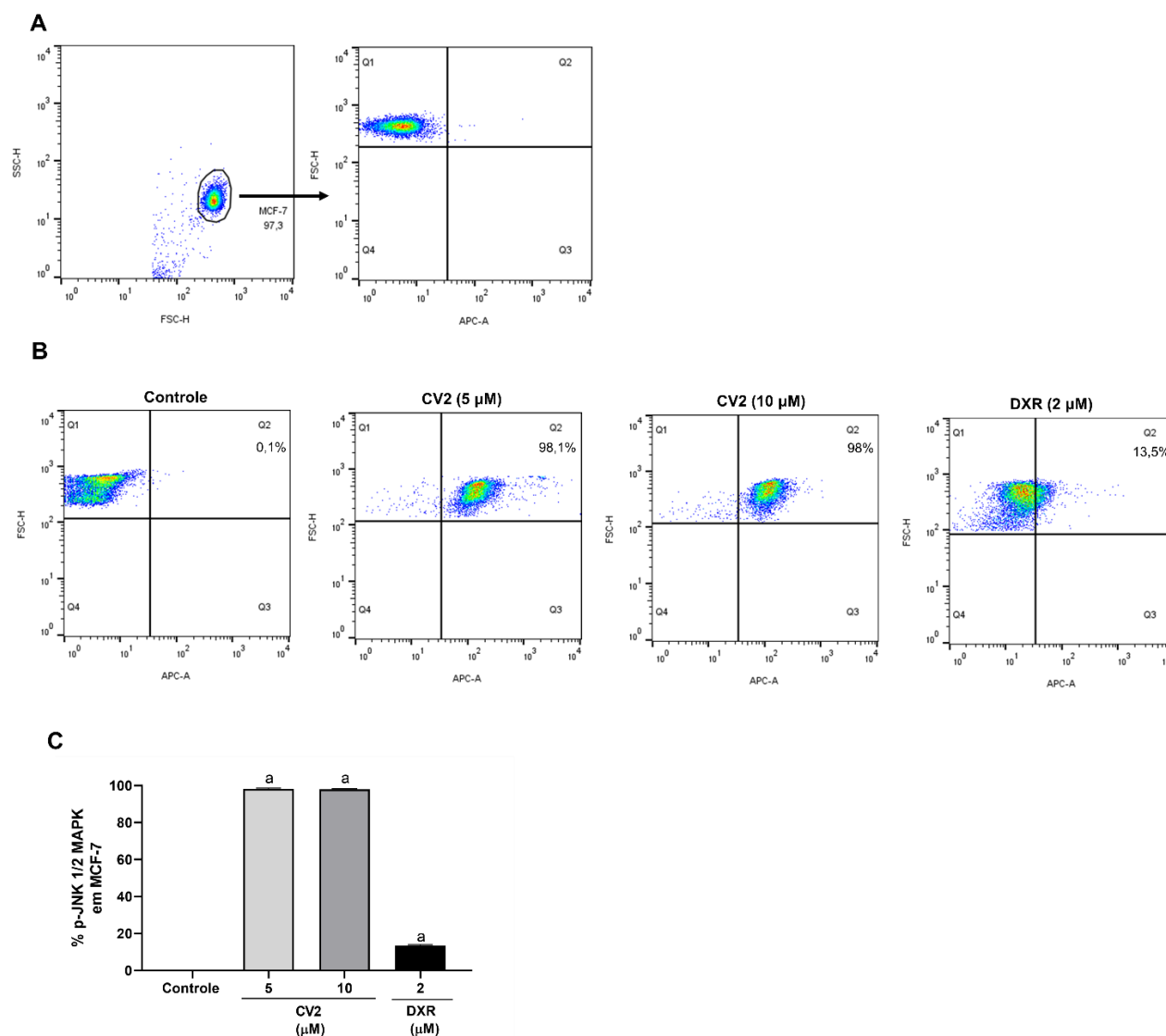
e $98,00 \pm 0,28\%$, respectivamente, $p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle ($0,14 \pm 0,02\%$).

Quanto à marcação das células com anticorpos anti-p38, foi observado aumento significativo do percentual de células marcadas após o tratamento com CV2 5 ou $10\mu\text{M}$ ($93,43 \pm 0,17 \pm 0,32\%$; e $93,88 \pm 1,42\%$, respectivamente, $p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle ($15,98 \pm 0,76\%$) (Figura 24).

Também foi observado aumento no percentual de células marcadas com anticorpos anti-ERK1/2 após 48 horas de tratamento com o CV2, nas concentrações de 5 ou $10\mu\text{M}$ ($22,10 \pm 1,22\%$; e $34,10 \pm 2,32\%$, respectivamente, $p < 0,05$ para ambos), em comparação ao grupo controle ($1,18 \pm 0,19\%$) (Figura 25).

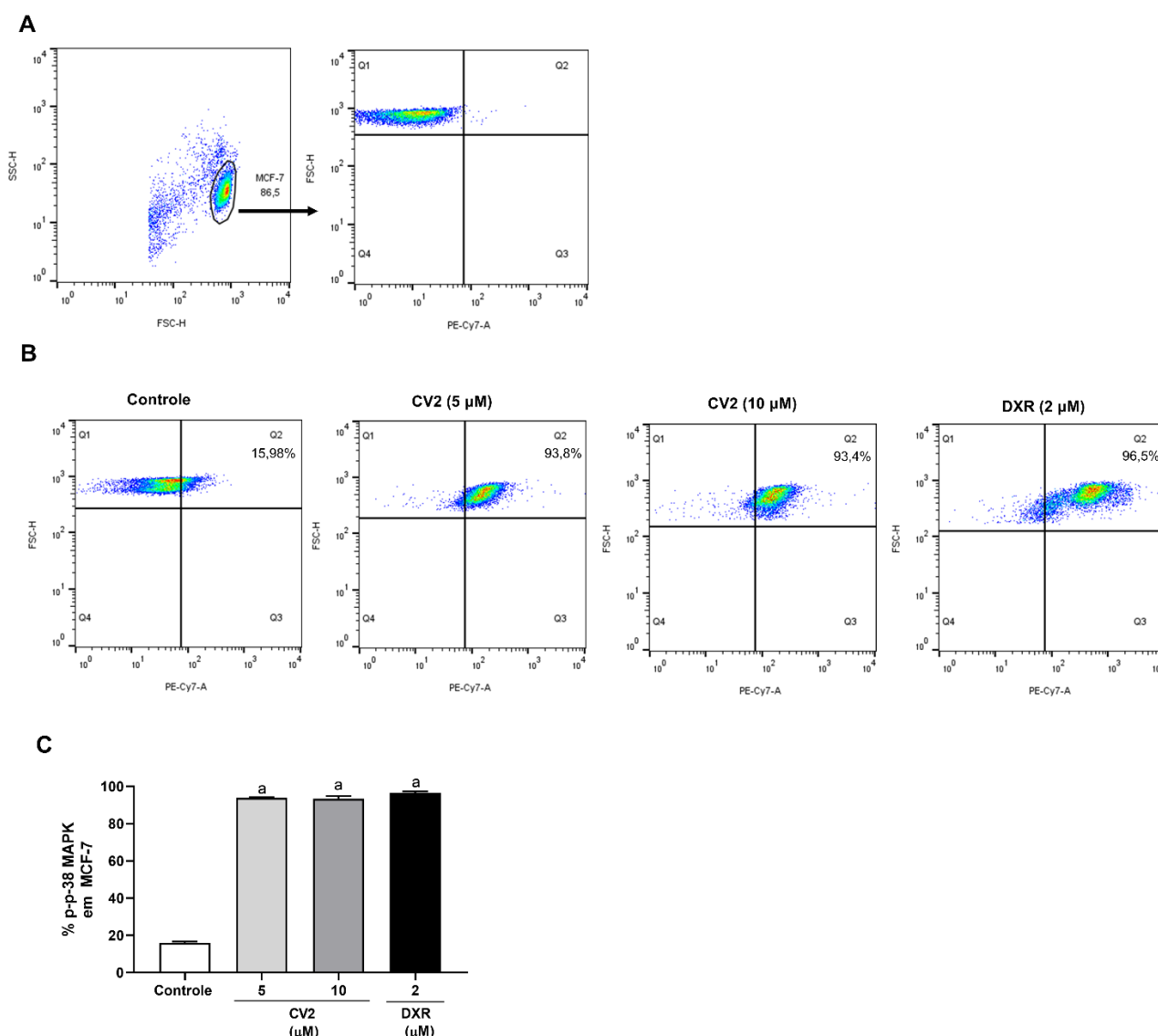
O tratamento com a droga padrão, doxorrubicina ($2\mu\text{M}$), induziu aumento significativo no percentual de células marcadas com os anticorpos anti-JNK_{1/2}, anti-p38 e anti-ERK_{1/2} ($13,52 \pm 0,46$; $96,57 \pm 0,83\%$ e $82,08 \pm 1,62\%$ respectivamente, $p < 0,05$ para todos), quando comparado ao grupo controle ($0,14 \pm 0,02$; $15,98 \pm 0,76\%$; $1,18 \pm 0,19\%$) (Figuras 23, 24 e 25).

Figura 23. Percentual de células marcadas com anticorpo anti-JNK1/2 após 48 horas de tratamento com Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μM) ou Doxorubicina (DXR, 2 μM).



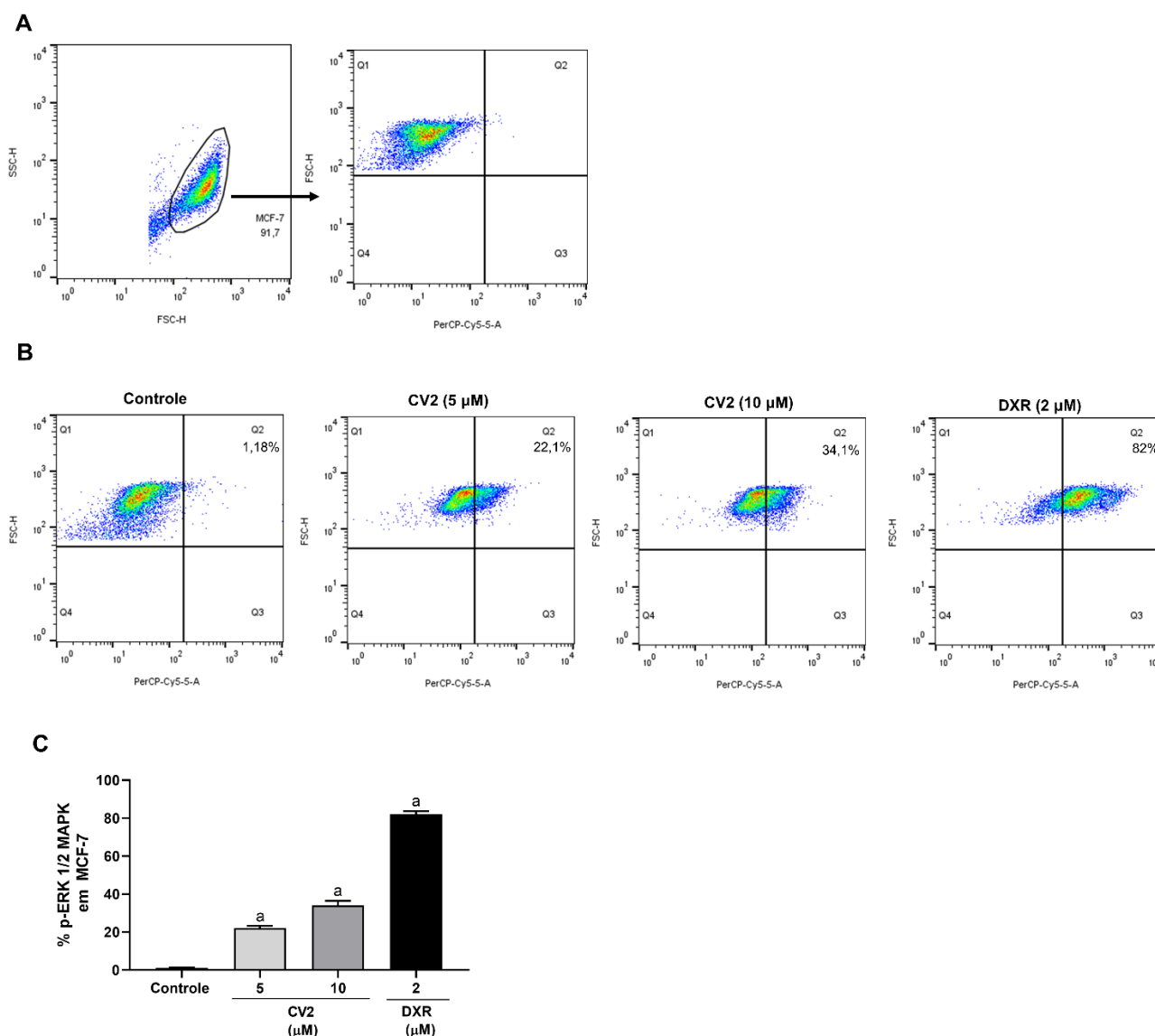
Efeito do tratamento com CV2 sobre a atividade das proteínas JNK1/2. **(A)** A população celular foi determinada a partir da análise dos *dotplots* de tamanho celular (FSC-Forward Scatter, eixo X) e granulosidade citoplasmática (SSC-Side Scatter, eixo Y) obtidos por citometria de fluxo. Para a análise 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)** *Dotplots* 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 $\pm$ erro padrão da média (SEM), analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguida pelo teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Figura 24. Percentual de células marcadas com anticorpo anti-p38 após 48 horas de tratamento com do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μM) ou Doxorrubicina (DXR, 2 μM).



Efeito do tratamento com CV2 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. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Figura 25. Percentual de células marcadas com anticorpo anti-ERK1/2 após 48 horas de tratamento com do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2 5 ou 10 μM) ou Doxorubicina (DXR).

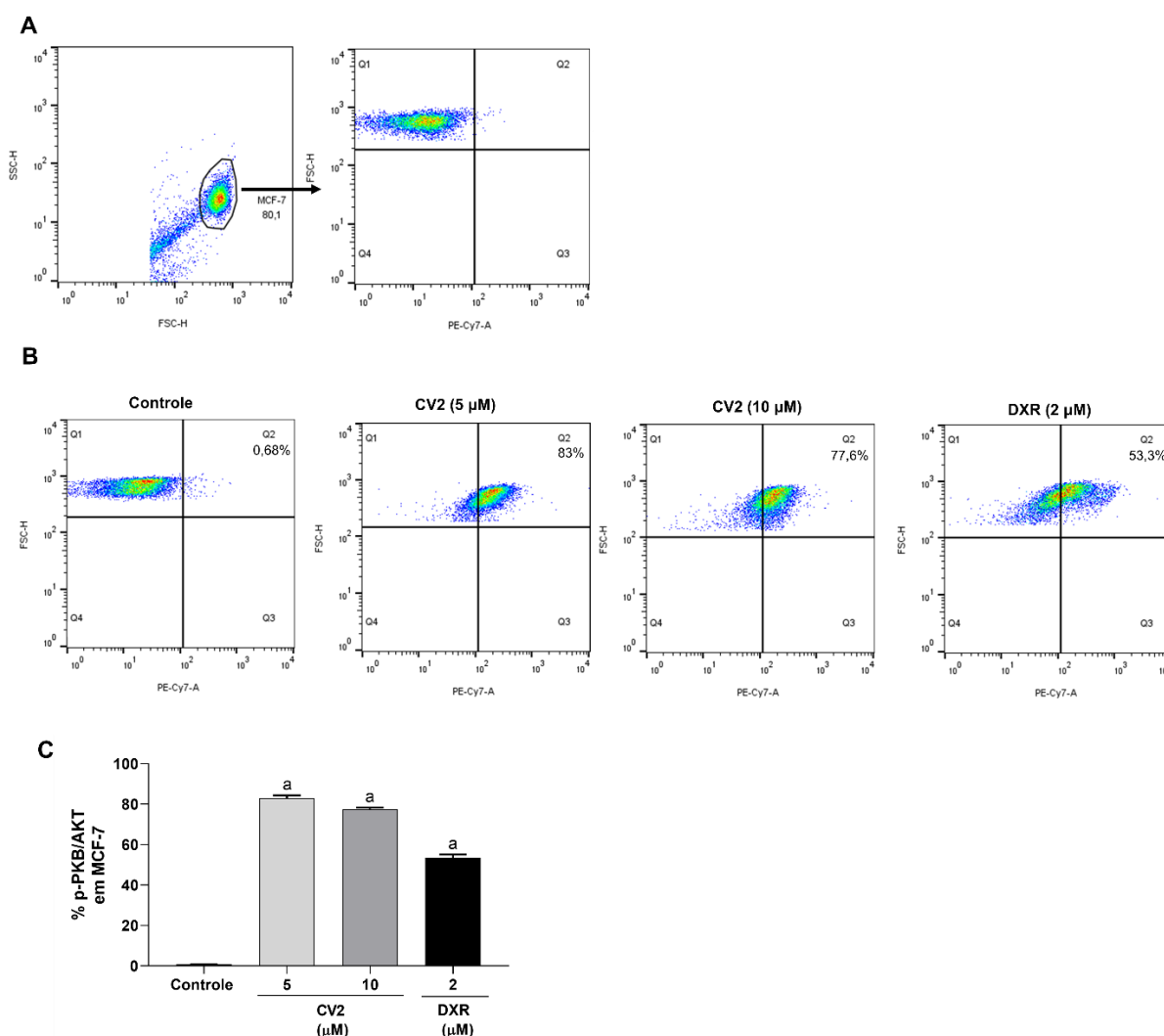


Efeito do tratamento com CV2 sobre a atividade das proteínas ERK1/2. **(A)** A população celular foi determinada a partir da análise dos *dotplots* de tamanho celular (FSC-Forward Scatter, eixo X) e granulidade citoplasmática (SSC-Side Scatter, eixo Y) obtidos por citometria de fluxo. Para a análise 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. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.8 Marcação com anticorpos anti-PKB/AKT e análise por citometria de fluxo

Como observado na figura 26, houve aumento significativo do percentual de células marcadas com os anticorpos anti-PKB/AKT após 48 h de tratamento com o CV2 nas duas concentrações (5 μ M: $83,03 \pm 1,38\%$; 10 μ M: $77,68 \pm 0,65\%$, $p < 0,05$ para ambos) ou DXR (2 μ M) ($53,33 \pm 1,80\%$, $p < 0,05$), em comparação ao grupo controle ($0,68 \pm 0,16\%$).

Figura 26. Percentual de células marcadas com anticorpo anti-PKB/AKT após 48 horas de tratamento com do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2 μ M).



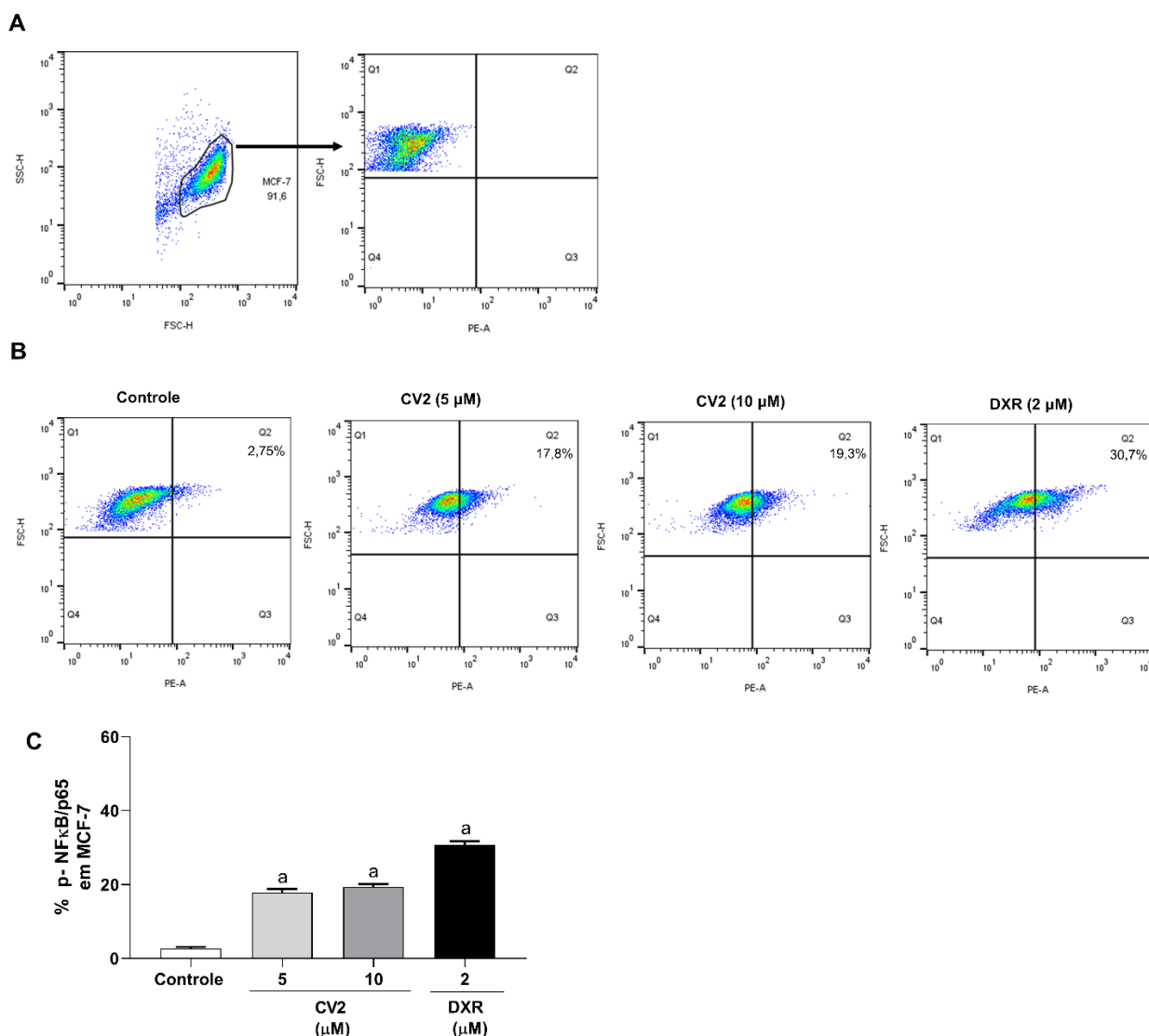
Efeito do tratamento com CV2 sobre a atividade da proteína PKB/AKT. **(A)** A população celular foi determinada a partir da análise dos *dotplots* de tamanho celular (FSC-Forward Scatter, eixo X) e granuloseidade citoplasmática (SSC-Side Scatter, eixo Y) obtidos por citometria de fluxo. Para a análise 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 ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.9 Marcação com anticorpos anti-NF- κ B (p65) e análise por citometria de fluxo

A marcação das células com anticorpos anti-NF- κ B (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 CV2 (5 μ M: $17,87 \pm 0,97\%$; 10 μ M: $19,37 \pm 0,81\%$, $p < 0,05$ para ambos), em comparação ao grupo controle ($2,75 \pm 0,36\%$) (Figura 13).

O tratamento com a Doxorrubicina (2 μ M) induziu aumento significativo do percentual de células marcadas com os anticorpos anti-NF- κ B (p65) ($30,07 \pm 1,04\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (Figura 27).

Figura 27. Percentual de células marcadas com anticorpo anti-NF- κ B (p65) após 48 horas de tratamento com do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2, 5 ou 10 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2 μ M).



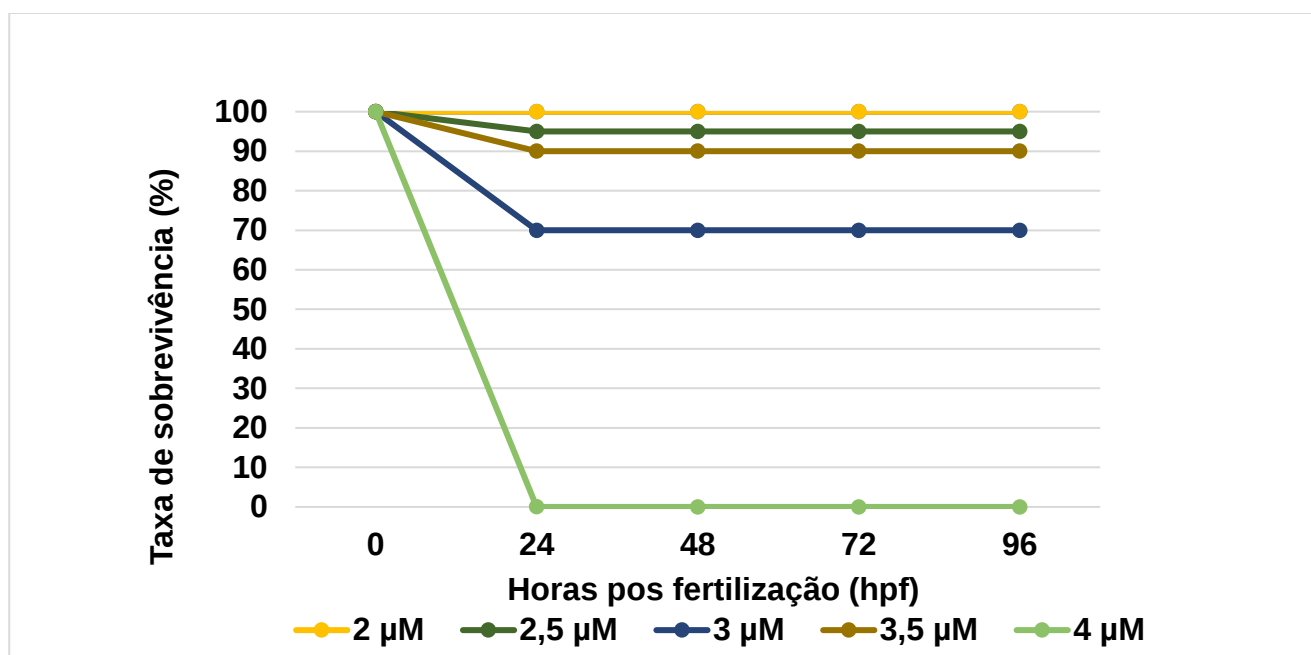
Efeito do tratamento com CV2 sobre a atividade do NF- κ B. **(A)** A população celular foi determinada a partir da análise dos *dotplots* de tamanho celular (FSC-*Forward Scatter*, eixo X) e granulosidade citoplasmática (SSC-*Side Scatter*, eixo Y) obtidos por citometria de fluxo. Para a análise dos 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. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.10 Embriotoxicidade do CV2 em modelo peixe-zebra

5.10.1 Toxicidade aguda do CV2

Neste ensaio foi possível observar a taxa de sobrevivência de embriões de peixe-zebra após 96 horas de exposição ao CV2. Nas primeiras 24 horas, a concentração mais elevada (4 μM) do CV2 induziu a morte de todos os embriões. Conforme a concentração diminuiu, a letalidade também diminuiu, sendo que a concentração mais baixa (2 μM) não causou morte, com isso foi possível obter uma concentração letal de CL_{50} de 3,07 μM (Figura 28).

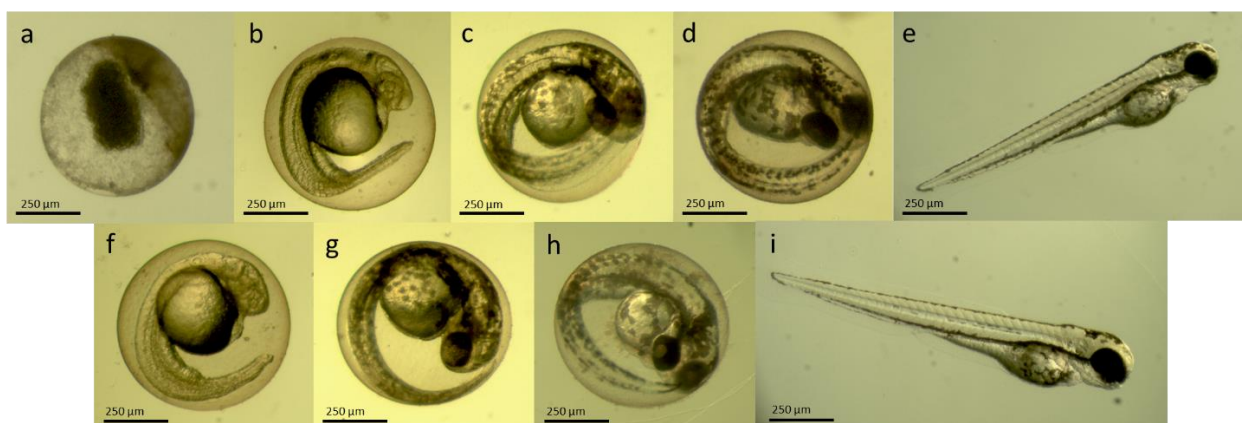
Figura 28. Taxa de sobrevivência de embriões de peixe-zebra expostos a concentrações crescentes do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2) por 96 h.



Os embriões que foram tratados com a concentração máxima de CV2 (4 μM) exibiram coagulação dos ovos após 24 h de exposição. Não foi verificada mortalidade na concentração mais baixa não, bem como não foram observados efeitos não letais.

A coagulação foi o único *endpoint* de letalidade observado (Figura 29).

Figura 29. Efeitos letais e não letais observados em embriões de peixe-zebra expostos a diferentes concentrações do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2).

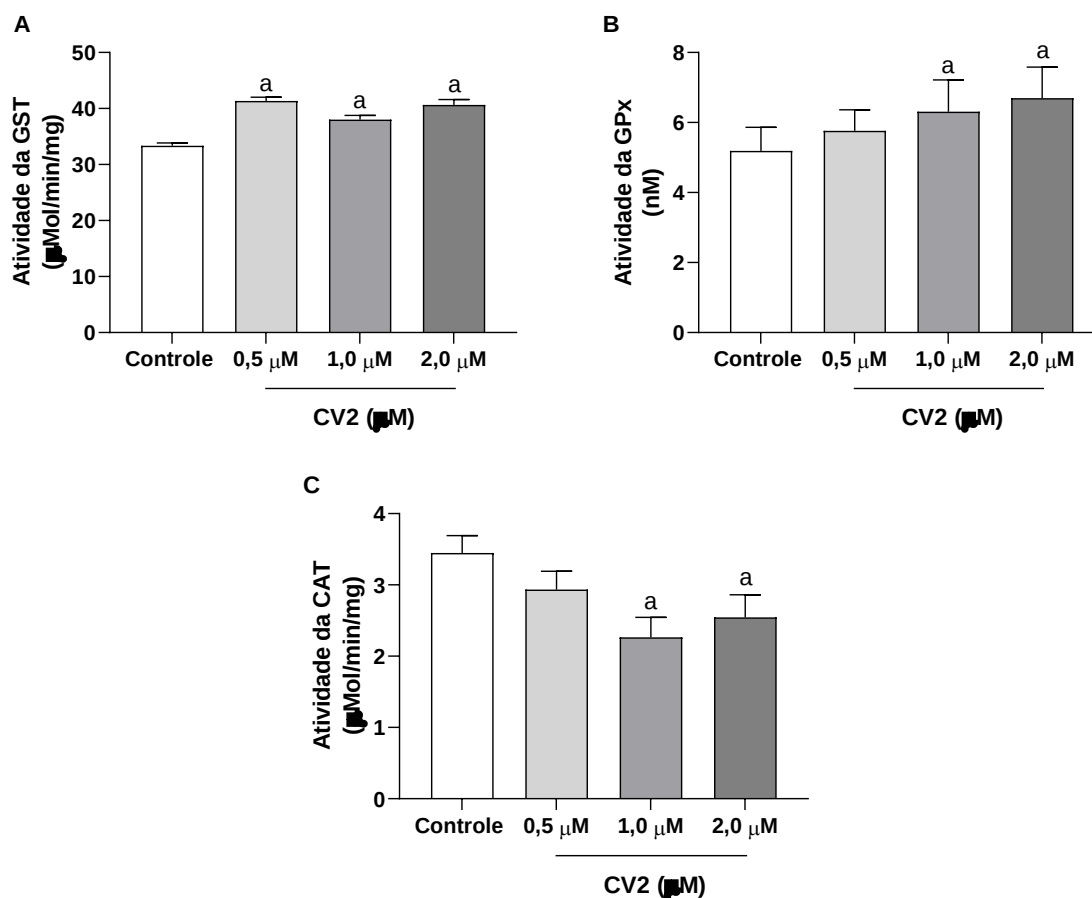


Imagens representativas dos efeitos em embriões de peixe-zebra expostos a concentrações crescentes do CV2 no teste de embriotoxicidade. Em (a) embrião pós-fertilização (hpf) 24 horas exibiu coagulação do ovo após exposição a 4 μM de CV2. (b), (c), (d) e (e) Organismos tratados com 2,5 μM de CV2 apresentaram desenvolvimento normal após 24, 48, 72 e 96 hpf, respectivamente. (f), (g), (h) e (i) Organismos controle com desenvolvimento normal após 24, 48, 72 e 96 h, respectivamente, expostos apenas ao meio E3.

5.10.2 Efeitos do CV2 na atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra

Após 96 h de exposição ao CV2, foi realizada avaliação da atividade da glutathione transferase (GST) que permitiu identificar um aumento significativo desta enzima, nas larvas de peixe zebra nas concentrações de 0,5 μM ($41,34 \pm 0,68 \mu\text{mol/min/mg}$, $p < 0,05$), 1,0 μM ($38,02 \pm 0,74 \mu\text{mol/min/mg}$, $p < 0,05$) e 2,0 μM ($40,64 \pm 0,95 \mu\text{mol/min/mg}$, $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle ($33,36 \pm 0,48 \mu\text{mol/min/mg}$). Também foi possível observar um aumento significativo da atividade da glutathione peroxidase (GPx) nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 μM de CV2 ($5,76 \pm 0,60 \text{ nM}$; $6,31 \pm 0,90 \text{ nM}$; $6,69 \pm 0,88 \text{ nM}$, respectivamente, $p < 0,05$ para todos), quando comparados ao controle ($5,18 \pm 0,67 \mu\text{mol/min/mg}$). Ainda, foi observado uma redução significativa na atividade da catalase (CAT) nos embriões tratados com as três concentrações (0,5 μM : $2,93 \pm 0,25 \mu\text{mol/min/mg}$; 1,0 μM : $2,26 \pm 0,28 \mu\text{mol/min/mg}$; e 2,0 μM : $2,54 \pm 0,31 \mu\text{mol/min/mg}$, $p < 0,05$ para todos), quando comparado ao grupo controle ($3,44 \pm 0,24 \mu\text{mol/min/mg}$). (Figura 30).

Figura 30. Atividade de enzimas marcadoras de estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra após 96 h de exposição a diferentes concentrações do Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2).



Avaliação da atividade das enzimas **(A)** glutathiona transferase (GST), **(B)** glutathiona peroxidase (GPx), **(C)** catalase (CAT) em larvas de peixe-zebra após exposição a diferentes concentrações do CV2. Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média e analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O câncer de mama é, predominantemente, uma doença que afeta mulheres e representa a principal causa de morte relacionada ao câncer nesse grupo (Riggio et al., 2021). Os produtos naturais derivados de plantas têm emergido como uma área promissora de pesquisa para obtenção de novos compostos com potencial anticâncer. Estudos têm demonstrado que esses produtos possuem propriedades antitumorais e pró-apoptóticas contra diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (Naeem et al., 2022). Fenilpropanóides são compostos extraídos de produtos naturais conhecidos por ativarem uma variedade de vias de sinalização, oferecendo assim um potencial significativo para o desenvolvimento de novos tratamentos contra o câncer de mama (Padhy et al., 2022).

Nesse contexto, o presente estudo descreveu o potencial antitumoral e possíveis os mecanismos de ação *in vitro*, bem como a toxicidade em modelo de peixe-zebra do benzoato de (E)-4-(1-epoxi-7,8-propen)fenila (CV2), um novo fenilpropanóide extraído das raízes de *Croton velutinus* (Euphorbiaceae).

Inicialmente, diversas linhagens tumorais humanas foram utilizadas para identificar qual dentre elas, o composto CV2 apresentaria o mais elevado potencial citotóxico. Para isso, foi conduzido o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), um dos métodos colorimétricos mais comumente empregados para avaliar citotoxicidade (Deepthi et al., 2023). Como droga padrão, utilizou-se a doxorrubicina, um fármaco antineoplásico utilizado no tratamento de uma variedade de tumores, incluindo leucemia, linfomas, sarcomas de tecidos moles (Silva et al., 2023) e câncer de mama (Souza et al., 2018).

A doxorrubicina, pertencente à família das antraciclinas, exerce sua atividade antitumoral ao intercalar-se entre as bases nitrogenadas do DNA, inibindo a atividade enzimática da topoisomerase II e, conseqüentemente, interferindo na proliferação celular (Kalantary-Charvadeh et al., 2024). É amplamente utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer devido às suas potentes propriedades antitumorais de amplo espectro. No entanto, um desafio significativo associado à administração de doxorrubicina é seu efeito tóxico inespecífico, que compromete não

apenas células cancerígenas, mas também células não cancerígenas, limitando sua aplicação clínica (Li et al., 2022).

O CV2 apresentou atividade antiproliferativa em todas as linhagens testadas, entretanto exibiu maior atividade na linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, ($CI_{50} = 4,63 \pm 0,16 \mu M$) após 72 h de tratamento, corroborado os resultados previamente publicados por Abreu e colaboradores (2020), que mostrou o potencial citotóxico do CV2 em diferentes linhagens tumorais, incluindo MCF-7. Uma menor atividade na linhagem não tumoral MCF-10A (CI_{50} de $44,09 \pm 1,00 \mu M$) foi observada. Diante disso, considerando as linhagens celulares utilizadas neste estudo, os dados obtidos permitem inferir que o CV2 possui significativo efeito antitumoral *in vitro* mais seletivo para linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), quando comparado ao seu efeito citotóxico em linhagem de células sadias MCF-10A.

Considerando que o câncer de mama é o tipo mais comum e invasivo entre as mulheres, existe uma demanda crescente por tratamentos farmacológicos inovadores e menos agressivos (Gadaleta et al., 2022). Os fenilpropanóides têm mostrados resultados promissores em relação a sua atividade citotóxica para o câncer de mama. A investigação do efeito citotóxico do M-etil ferulato (cloreto de metoxifenoxi propil trifenílfosfônio), apresentou $CI_{50} = 1,3 \mu M$ para MCF-7 (Patil et al., 2023). O eugenol, é um potente agente citotóxico que suprimiu metástase e migração de células cancerígenas em MCF-7 com uma CI_{50} de $1,5 \text{ mcg/mL}$ (Padhy et al., 2022). O ácido salvanólico B demonstrou potente atividade inibitória do crescimento de células de câncer de mama MDA-MB-231, apresentando uma CI_{50} de $0,11 \mu M$ (Lin et al., 2020). Ainda, a CI_{50} $117 \mu M$ do acteosídeo (verbacosídeo) inibiu a atividade proliferativa de células 4T1 de câncer de mama (Xiao et al., 2022).

Desta forma foi possível calcular o valor do Índice de Seletividade (IS), que nos revela quantas vezes o CV2 é mais seletivo para a linhagem tumoral em relação a não tumoral. Foi possível observar que o CV2 apresentou uma alta seletividade para MCF-7 (IS: 9,69) em relação as demais linhagens, enquanto a doxorrubicina baixa seletividade (IS: 0,44). Apesar de não haver um número específico do índice de seletividade, que determine segurança e eficácia de novos compostos e candidatos a fármacos, pois dependem de muitos fatores que caracterizam uma relação risco-benefício aceitável (Muller, P.Y.; Milton, M.N., 2012), estes resultados

mostram que o CV2 apresenta uma maior seletividade para a linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 em relação a droga padrão, doxorrubicina.

Por este motivo escolhemos a linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 para dar continuidade aos estudos de atividade antitumoral, bem como dos seus possíveis mecanismos de ação.

Embora tenham ocorrido avanços significativos no tratamento do câncer de mama, com o objetivo de melhorar os resultados e aumentar a sobrevida dos pacientes, os limites da quimioterapia tornam-se cada vez mais evidentes. Os efeitos colaterais graves e o desenvolvimento de resistência tumoral em alguns pacientes destacam a necessidade urgente de terapias alternativas que sejam mais eficazes e apresentem menor toxicidade (Barzaman *et al.*, 2020). Entre os efeitos colaterais mais preocupantes dos agentes quimioterápicos, destaca-se a mielossupressão, uma condição em que a medula óssea tem sua função suprimida. Isso ocorre porque esses medicamentos inibem o crescimento de células de alta taxa proliferativa, como as células hematopoiéticas da medula óssea, impactando negativamente o sistema imunológico e aumentando a vulnerabilidade do paciente a infecções e outras complicações (Han *et al.*, 2023).

O ensaio utilizando as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humanas, que exercem papel fundamental na hematopoiese e sistema imunológico, permite investigar o comportamento citotóxico de diferentes compostos (Yi *et al.*, 2023). Diante dos resultados obtidos, foi possível observar que a CI_{50} de CV2 ($1,75 \pm 0,06 \mu M$) foi significativamente maior do que a CI_{50} da doxorrubicina ($0,06 \pm 0,006 \mu M$), sugerindo que o CV2 apresenta toxicidade em PBMC, entretanto com uma CI_{50} 30 vezes menor em relação a droga padrão. Entretanto, este efeito é inerente ao perfil de drogas antineoplásicas, o que não torna um fator determinante para o seu uso. Contudo, apesar dos efeitos colaterais graves, tais como nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e mielossupressão causados pela falta de especificidade tumoral, a doxorrubicina ainda é amplamente utilizada como uma droga clínica anticâncer de primeira linha (Zhu, 2021).

Dois derivados fenólicos de asarona, o γ -asarona (1-alil-2,4,5-trimetoxibenzeno) e o 2,4,5-trimetoxi-estireno, foram isolados da casca do caule de *Duguetia pycnastera* (Annonaceae). Nos testes de citotoxicidade, ambos os

compostos demonstraram baixa atividade contra PBMC, apresentando valores de CI_{50} superiores a 120,04 $\mu\text{g/mL}$ e 128,71 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Souza *et al.*, 2020). Já o 3,4-(metilenodioxi) ácido cinâmico, um fenilpropanóide sintetizado a partir da piperina extraída por meio de hidrogenação catalítica do fruto da pimenta-preta (*Piper nigrum* L., Piperaceae), também não apresentou citotoxicidade significativa em células PBMC humanas, com CI_{50} superior a 5200 μM e um índice de seletividade (SI) maior que 200 após 24 horas de exposição (Silva *et al.*, 2024).

Diante dos valores promissores referente a sua citotoxicidade, para melhor caracterizar a ação antitumoral deste composto, especificamente na linhagem de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), foram investigados os possíveis mecanismos de ação do CV2. Inicialmente, foi avaliado a sua capacidade de parada do ciclo celular.

O ciclo celular é um processo fundamental para o crescimento e divisão celular composto por três etapas: fase G1 no qual as células estão crescendo em tamanho e acumulando conteúdo de DNA ($2n$); fase S onde ocorre um aumento na quantidade de DNA ($>2n$) e fase G2, momento em que as células estão preparadas para finalizar o ciclo celular e iniciar a divisão, uma vez que o material genético está completamente duplicado ($4n$). Além dessas fases, também é observada a presença de um pico com quantidade de DNA inferior àquela encontrada na fase G1 ($<2n$), conhecido como pico sub-G1. As diferentes fases do ciclo celular podem ser identificadas de acordo com a quantidade de DNA marcada com o iodeto de propídio (IP), um agente intercalante fluorescente capaz de se ligar às moléculas de DNA, podendo ser identificadas e analisadas por citometria de fluxo, com o intuito de avaliar a viabilidade, bem como analisar o ciclo celular (Sun *et al.*, 2021; Gupta, Chaudhuri., 2022).

No tratamento atual do câncer, a utilização de drogas que atuam na regulação do ciclo celular é primordial para controlar a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, que estão favorecendo o crescimento do tumor. Por exemplo, drogas quimioterápicas como o metotrexato (MTX) ou o 5-fluorouracil (5-FU) destroem principalmente a síntese de nucleotídeos e a replicação do DNA no processo de proliferação celular, causando parada do ciclo na fase S (Bonacci *et al.*, 2021). Para a investigação do efeito do CV2 sobre a progressão do ciclo celular, após 48 h de

tratamento, realizou-se a marcação das células MCF-7 com o intercalador de DNA iodeto de propídio (IP) seguido de análise por citometria de fluxo.

O tratamento de 48 h com o CV2 induziu alterações no ciclo celular apenas na concentração correspondente a CI_{50} (5 μ M), provocando um aumento no conteúdo do DNA em sub-G1. Da mesma forma foi observado por Kim e colaboradores (2019), após avaliados os efeitos anticancerígenos do extrato de *Rhus verniciflua* (família) sobre as células MCF-7, no qual atribuíram o aumento de DNA no pico sub-G1 ao ácido gálico, um fenilpropanóide majoritariamente presente no extrato. O *p*-ácido cumárico, um fenilpropanóide extraído do trigo, também foi capaz de inibir o ciclo celular, causando aumento da marcação com IP no pico sub-G1 (Anantharaju *et al.*, 2016). Ainda, o verbacosídeo, causou aumento do pico sub-G1, após 48 h de tratamento em linhagem de câncer gástrico humano (MKN45) (Zhang *et al.*, 2002). Diante dos resultados obtidos com o CV2 e os dados sobre fenilpropanóides obtidos da literatura, pode-se sugerir que a regulação do ciclo celular causando aumento na população sub-G1 é característico de compostos da classe dos fenilpropanóides (Abotaleb *et al.*, 2021).

Dados da literatura sugerem que o aumento no pico sub-G1 está associado ao processo de apoptose, pois geralmente são corpos celulares com cromatina condensada de forma semelhante às células em estágio inicial de apoptose (Yang *et al.*, 2015; Azevedo-Barbosa *et al.*, 2019). A apoptose é considerada como um importante sistema de morte celular regulada, provocando mudanças bioquímicas como externalização de fosfatidilserina, fragmentação do DNA ocorrida no núcleo, bem como condensação de material cromático, além da ativação de caspases e, entre outras mudanças que resultam na morte celular (Fasoulakis *et al.*, 2021). A resistência à apoptose é uma característica distintiva das células cancerosas, assim como sua capacidade de evasão, pois isso desempenha um papel crucial na resistência aos tratamentos anticancerígenos e na progressão tumoral. Essa resistência não só compromete a eficácia das terapias contra o câncer, mas também promove o desenvolvimento e a disseminação do tumor. (Hanahan, 2011; Azevedo-Barbosa *et al.*, 2019).

Para corroborar a indução da apoptose de células MCF-7 após tratamento com o CV2, foram utilizados marcadores específicos que, por meio da técnica de citometria de fluxo, permitem identificar o estágio de morte em que as células se

encontram. As células que não apresentaram marcação nem para IP nem para a anexina V foram identificadas como viáveis. Quando no processo de apoptose inicial, as células se mostram positivas para anexina V e negativas para IP. Por outro lado, células que testaram uma dupla marcação positiva, tanto para IP como para anexina V, foram classificadas como em apoptose tardia. Já as células que marcaram positivo para IP e negativo para anexina V foram classificadas como necróticas. Para análise das células apoptóticas totais, foi considerada a soma das células apoptóticas em fase inicial e fase tardia. Essa abordagem permite uma avaliação mais completa dos diferentes estágios do processo de morte celular por apoptose (Rashidi et al., 2023).

Diante disso, investigou-se a possível indução de apoptose pelo CV2 após 48 horas de tratamento em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7). O tratamento com 5 ou 10 μ M de CV2 resultou em um aumento significativo no percentual de células marcadas apenas com anexina V-FITC, indicando apoptose inicial, bem como na porcentagem de células duplamente marcadas, indicando apoptose tardia. Esses achados refletiram no aumento significativo do percentual total de células apoptóticas após o tratamento de 48 horas nas concentrações utilizadas.

Além disso, um estudo comparativo realizado para avaliar a atividade apoptótica do resveratrol, após 48 horas de tratamento, demonstrou um efeito semelhante ao observado com o CV2, um aumento significativo na proporção de células apoptóticas precoces e tardias em linhagem de células de câncer de mama murino (4T1), resultando em um aumento consequente da população apoptótica total (Wu et al., 2019). O eugenol mostrou induzir a exposição de fosfatidilserina nas células MDA-MB-231, MCF-7 e A2058, aumentando a porcentagem de células marcadas apenas com anexina V-FITC, indicativo de células em apoptose inicial (Al-Sharif et al., 2013; Junior et al., 2016). Portanto, pode-se inferir que o CV2 exerce seu efeito citotóxico por meio da ativação da apoptose.

No câncer, as espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um papel crucial na regulação da sobrevivência celular. Diferentes concentrações de EROs nas células, especialmente nas células cancerígenas, podem causar diferentes estágios na tumorigênese (Nawrot-Hadzik et al., 2023). Em baixos níveis, as EROs podem ter um efeito pró-tumoral, enquanto em altos níveis são citotóxicas, podendo

causar danos celulares irreversíveis e resultar na ativação de mecanismos de apoptose (Dodson *et al.*, 2019). As EROs são mediadores proeminentes nos estágios iniciais da apoptose como também contribuem para a indução de danos no DNA. Vários estudos têm demonstrado que produtos naturais capazes de modular as EROs podem regular a apoptose e induzir a morte seletiva em células de câncer de mama (Foo *et al.*, 2016; Kavitha *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2015; Marvibaigi *et al.*, 2016). Portanto, as EROs desempenham um papel crucial na ativação específica dos mecanismos de apoptose em células de adenocarcinoma mamário (Lee *et al.*, 2019).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares pode ser analisada utilizando o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), uma sonda não fluorescente que possibilita uma quantificação sensível das EROs dentro das células (Panichi *et al.*, 2023). O DCFH-DA possui a capacidade de atravessar a membrana celular e penetrar no interior das células. Na presença de esterases, o DCFH-DA é reduzido a DCFH, que posteriormente é oxidado a DCF pelas EROs, resultando na emissão de fluorescência que indica a presença de EROs. Portanto, quanto maior a fluorescência observada, maior a quantidade de EROs produzidas pelas células em resposta ao tratamento com o composto (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).

O tratamento com o CV2 foi capaz de aumentar significativamente a fluorescência do DCF, indicando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na linhagem celular MCF-7. Esse aumento foi observado em ambos os tempos avaliados, porém com maior intensidade após 3 horas de tratamento com o DCFH-DA. Além disso, para confirmar o papel das EROs nos efeitos antiproliferativos induzidos pelo CV2, as células foram tratadas com CV2 na presença e na ausência do antioxidante NAC. Os efeitos da citotoxicidade induzida pelo CV2 nas células de câncer de mama MCF-7 foram revertidos pelo NAC. Esses resultados sugerem que a produção de EROs é essencial para a atividade antiproliferativa do CV2 em células de câncer de mama MCF-7. Também, a seringina (Syr), um fenilpropanóide extraído de *Eleutherococcus senticosus* (Araliaceae), aumentou significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Além

disso, as células foram tratadas com Syr na presença ou na ausência de NAC, e foi observado que os efeitos da citotoxicidade das células de câncer de mama induzidos por Syr foram revertidos pelo NAC (Lee *et al.*, 2019).

Os compostos asaricin e isoasarone são fenilpropanóides isolados do extrato de metanol das raízes de *P. sarmentosum* (Piperaceae). A exposição a ambos resultou em um aumento nos níveis de EROs nas células MDA-MB-231, levando à interrupção do ciclo celular e à apoptose (Hematpoor *et al.*, 2018). O eugenol também induziu um aumento na produção de EROs nas linhagens celulares MCF-7, SIHA e A2058, sugerindo que os mecanismos de morte celular estariam sendo ativados pelo aumento de EROs. Com isso, podemos inferir que moléculas induzindo o aumento das EROs intracelulares podem assumir uma importância notável na terapia do câncer (Júnior *et al.*, 2016).

As vias de sinalização das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) regulam uma variedade de processos biológicos através de múltiplos mecanismos celulares. Na maioria desses processos, as MAPKs têm um duplo papel, podendo atuar como ativadores ou inibidores, dependendo do tipo celular e do estímulo (Yue e López, 2020). A expressão aberrante de MAPKs está intimamente relacionada ao desenvolvimento, proliferação, sobrevivência e inflamação. Embora muitas vezes associadas à progressão tumoral, as vias da MAPKs também podem apresentar efeitos antitumorais (Du *et al.*, 2023; Jia *et al.*, 2021).

As proteínas JNK e p38 são ativadas pelo estresse e consideradas as principais proteínas das vias de sinalização MAPK que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento do câncer, incluindo crescimento celular, proliferação e apoptose (Kim *et al.*, 2019; He *et al.*, 2020). A sinalização da JNK é necessária para o desenvolvimento normal da glândula mamária; no entanto, ela tem um papel supressor na tumorigênese, que pode estar relacionado à sua atividade pró-apoptótica (Cellurale *et al.*, 2012; Ryu *et al.*, 2020). A proteína p38 MAPK desempenha um papel crucial na indução de apoptose mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs) em células cancerígenas. As EROs podem modular a expressão de proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas, como Bax e Bcl-2, por meio da ativação da p38 MAPK. Essa ativação promove o aumento dos níveis de citocromo c no citoplasma, desencadeando uma cascata de reações das caspases

que culmina na apoptose celular (Jia *et al.*, 2021). A ativação ERK1/2 é amplamente associada a funções anti-apoptóticas, controlando a proliferação e diferenciação celular, estimulada pelo fator de crescimento celular (Yue *et al.*, 2020).

Diante disso, as células foram marcadas com anticorpos anti-MAPKs e analisadas por citometria de fluxo para melhor compreensão dos efeitos do CV2, nessas vias de sinalização. Além disso, para melhor caracterizar o envolvimento da modulação das vias de sinalização das MAPKs no efeito citotóxico desse composto, foi realizado o ensaio do MTT na presença ou ausência de inibidores dessas proteínas. Os resultados mostraram que o tratamento com CV2 aumentou acentuadamente os níveis de expressão de JNK e p38 MAPK, e de forma moderada os níveis de ERK, como evidenciado pelo aumento na fluorescência nas células de MCF-7, conforme analisado por citometria de fluxo. Para corroborar esses achados, o pré-tratamento com os inibidores de JNK (SP600125) e p38 MAPK (PD169316) preveniu significativamente a citotoxicidade do CV2. No entanto, não houve alteração significativa na viabilidade celular nas células que passaram pelo pré-tratamento com inibidor de ERK (U0126). Esses resultados sugerem que o CV2 exerce seus efeitos citotóxicos em células de câncer de mama MCF-7 principalmente através da ativação das vias de sinalização de JNK e p38 MAPK, enquanto a via de sinalização de ERK parece estar pouco envolvida nesse processo.

Os fenilpropanóides são conhecidos na literatura por atuar na via das MAPKs como agentes anticâncer, especialmente no câncer de mama (Guo *et al.*, 2022). O M-etil ferulato aumentou significativamente a fosforilação de JNK em células A549 (Patil *et al.*, 2023). Estudos realizados em células de câncer de pâncreas, mostraram que os efeitos indutores de apoptose da capsaicina, um fenilpropanóide abundantemente presente no gênero *Capsicum*, foram associados à geração de EROs e ativação de JNK (Athanasίου *et al.*, 2007; Chapa-Oliver *et al.*, 2016). O ácido cinâmico, aumentou a expressão de JNK, p38 MAPK e ERK fosforilados de forma dependente de tempo, sugerindo que a apoptose foi mediada pela ativação das vias MAPK em células de câncer de fígado (Wu *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2015).

O salidrosideo, é um fenilpropanóide extraído de *Rhodiola rosea* (Crassulaceae), foi capaz de suprimir a tumorigênese em linhagem de células

colorretais humanas (HT29) aumentando a expressão de JNK, resultando na regulação positiva de proteínas pró-apoptóticas (El-kott *et al.*, 2021; Bernatoniene *et al.*, 2023). O acteosídeo, fenilpropanóide isolado de muitas plantas, induziu o aumento de ERK em células de melanoma murino (B16-F10), no qual inibiu a ação de proteínas que favorecem a divisão e crescimento do tumor (Xiao *et al.*, 2022). O composto fenólico WZ35, um derivado da curcumina, isolada da *Curcuma longa* (Zingiberaceae), exerceu significativo efeito antitumoral frente linhagem de células de câncer de mama humanas (MDA-MB-231) por aumento da produção de EROs e ativação da JNK (Wang *et al.*, 2019a). O resveratrol pode desencadear a autofagia e apoptose nas células de leucemia linfoblástica aguda das células T por estimular as vias p38 MAPK (Wang *et al.*, 2019b).

O fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K)-Akt e o alvo mamífero da rapamicina (mTOR) representam duas vias vitais de sinalização intracelular, que estão associadas a vários aspectos das funções celulares. A ativação da via PI3K-Akt-mTOR é comum no câncer de mama, em especial no tipo de câncer de mama positivo para receptores de estrogênio (ER), onde o PIK3CA é o gene mais comumente mutado (Tewari *et al.*, 2022). Contudo, muitos estudos relatam que a via de sinalização PI3K/AKT tem sido envolvida na regulação do desenvolvimento do câncer, e tornou-se um alvo potencial para o rastreamento de produtos naturais (Narayanankutty, 2021).

O M-etil ferulato aumentou significativamente a fosforilação de Akt em linhagem de células de câncer de pulmão humanas (A549), resultando na indução de morte celular (Patil *et al.*, 2023). Além disso, um estudo demonstrou que o pterostilbeno (3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno; PTS), isolado do extrato de *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae), inibiu a proliferação de linhagem de células cancerígenas do colo do útero humanas (HeLa) ao promover apoptose. Esse efeito ocorreu por meio da ativação da via de sinalização PI3K/AKT, o que estimulou a expressão de MICA/B (proteínas relacionadas à cadeia do complexo de histocompatibilidade). Essas proteínas tornaram as células tumorais mais "visíveis" às células *natural killer* (NK), modulando assim a resposta imune antitumoral (Li *et al.*, 2024).

O fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) é um fator de transcrição que também atua como regulador de genes pró-inflamatórios, desempenhando um papel crucial no controle da inflamação, produção de citocinas e processos de sobrevivência celular

e um papel duplo no câncer. O NF- κ B pode ser ativado por diversos estímulos, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o aumento do estresse oxidativo, que eleva os níveis de radicais superóxidos (Sahyon *et al.*, 2022). Em sua forma inativa, o NF- κ B permanece ligado ao inibidor do *kappa* B (I κ B) no citoplasma e ao ser estimulado é ativado dependente de ubiquitinação, promovendo a degradação das proteínas I κ B. Essa degradação resulta na dissociação do NF- κ B, permitindo que ele se transloque para o núcleo e inicie a transcrição gênica (Yu *et al.*, 2020).

No presente estudo, foi observado que o tratamento de células MCF-7 com CV2 aumentou significativamente a porcentagem de células marcadas com anticorpos anti-NF- κ B. Kim *et al.* (2005) observaram indução de apoptose em células HL-60 após ativação do NF- κ B induzida por escopoletina, uma 6-metoxi-7-hidroxycumarina. Curiosamente, a curcumina, uma molécula estruturalmente relacionada aos fenilpropanóides, induziu um efeito bifásico nos níveis de NF- κ B (aumento e diminuição após 8 e 16 h de tratamento, respectivamente) em uma linhagem de células de câncer hepático humanas (HA22T/VGH), inibindo a proliferação do tumor (Notarbartolo *et al.*, 2005).

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que o CV2 exerça efeito antitumoral *in vitro* por meio da indução de apoptose, mediada pela modulação da atividade de ERK1/2, JNK, p38 MAPK, PKB/AKT e NF- κ B.

O ensaio com *zebrafish* (*Danio rerio*) tem se consolidado como um modelo eficiente para a análise da adequação de medicamentos e seus potenciais usos no tratamento de doenças humanas. O *zebrafish* é um pequeno peixe tropical de água doce da família Cyprinidae, nativo do Sudeste Asiático. Este organismo modelo ganhou destaque na pesquisa científica devido às suas características únicas e às significativas semelhanças genéticas com os seres humanos. Uma das principais vantagens do *zebrafish* é sua transparência durante os estágios iniciais de desenvolvimento, permitindo a observação direta de órgãos e processos internos. Além disso, sua reprodução é rápida e simples, tornando-o ideal para estudos que envolvem biologia, genética e doenças humanas (Khoshnood, 2024).

Outra característica marcante é que o teste FET está substituindo gradativamente os testes agudos em roedores, visto que os resultados obtidos em embriões são muito próximos àqueles obtidos em roedores. A adequação do *zebrafish* como modelo biológico é reforçada pela análise filogenética comparativa

entre os genomas humano e de peixes, evidenciando semelhanças significativas na fisiologia e morfologia dos sistemas nervoso, cardiovascular e digestivo (Han et al., 2018). Essas características tornam o *zebrafish* uma ferramenta indispensável na investigação científica e no desenvolvimento de novas terapias

O teste de embriotoxicidade do *zebrafish*, conhecido como teste de embriotoxicidade em peixes (FET), tem ganhado popularidade devido à sua capacidade de envolver o ciclo de desenvolvimento completo e bem definido de um embrião vertebrado, possibilitando o estudo detalhado de seus estágios iniciais de vida (Modarresi Chahardehi et al., 2020), abrangendo desde a avaliação de compostos bioativos ou extratos brutos de plantas até a otimização de processos experimentais (Ullah et al., 2024).

Nos últimos anos, diversos ensaios para a avaliação de toxicidade têm utilizado o *zebrafish*, com destaque para o teste de toxicidade aguda em embriões de peixe zebra (Chahardehi, Arsad e Lim, 2020). Esse método foi validado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, *Organisation for Economic Cooperation and Development*) sob o teste nº 236 (OECD, 2013). Nesse protocolo, embriões de *zebrafish* com poucas 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 horas. Durante a exposição, *endpoints* de letalidade são avaliados a cada 24 horas. Ao término do experimento, calcula-se a Concentração Letal (CL₅₀) que mata 50% dos embriões (OECD, 2013).

O ensaio de toxicidade aguda com peixe-zebra revelou que, após 96 horas de exposição ao composto CV2, a concentração mais elevada (4 µM) induziu a morte de todos os embriões nas primeiras 24 horas. Por outro lado, as demais concentrações não apresentaram mortalidade bem como não foram observados efeitos não letais, permitindo a determinação da CL₅₀ em 3,07 µM. Em contrapartida, na concentração máxima de CV2 (4 µM), os embriões exibiram um único *endpoint* de letalidade, caracterizado pela coagulação dos ovos dentro das primeiras 24 horas de exposição.

Shiau e colaboradores (2021) observaram que na presença de 12,5 e 7,5 microM de curcumina, nenhum embrião ou larva de peixe-zebra sobreviveu após 3 dias de incubação. Um estudo com o extrato aquoso de *Piper sarmentosum*

(Piperaceae), rico em compostos fenólicos como fenilpropanóides, demonstrou uma significativa redução na sobrevivência de embriões de peixe-zebra, após 24 horas de exposição com 50 µg/mL do extrato, a porcentagem de sobreviventes diminuiu consideravelmente, enquanto após 48 horas, nenhum embrião sobreviveu. Além disso, foi observada uma redução na frequência dos batimentos cardíacos embrionários (Abdin *et al.*, 2020). Ainda a exposição às concentrações de 25 e 30 mg/L do eugenol revelou uma toxicidade mais acentuada, resultando em atrasos na eclosão e morte dos embriões de peixe-zebra (Tao *et al.*, 2023).

O efeito do CV2 na atividade enzimática foi investigado em larvas de peixe-zebra, analisando as enzimas glutathione transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Após 96 horas de exposição ao CV2, verificou-se um aumento significativo na atividade das enzimas GST e GPx nas larvas e redução da catalase.

A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante fundamental na defesa celular contra o estresse oxidativo, catalisando a conversão do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular (Glorieux e Calderon, 2024). Apesar de seu reconhecido papel protetor, o tratamento com o composto CV2 resultou em uma redução significativa na atividade da catalase em embriões tratados. Esse achado pode ser atribuído ao efeito indutor de estresse oxidativo causado pelo tratamento com o CV2, tendo em vista que a inibição da atividade dessa enzima está associada a altos níveis de ROS intracelular (Ferreira *et al.*, 2023).

A glutathione transferase (GST) e a glutathione peroxidase (GPx) são enzimas antioxidantes pertencentes a uma família que desempenha um papel crucial na proteção celular contra o estresse oxidativo. Essas enzimas reduzem o peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos lipídicos solúveis, utilizando a glutathione (GSH) como agente redutor. Geralmente, essas enzimas são encontradas no citoplasma e nas mitocôndrias das células, locais estratégicos para sua atuação no controle do equilíbrio redox celular (Handy e Loscalzo, 2022). O aumento da atividade das enzimas GPx e GST, observado após a exposição ao composto CV2, pode estar associado à ativação da capacidade antioxidante do organismo em resposta à elevação das espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas pelo composto. Essa resposta adaptativa tem como objetivo neutralizar as EROs geradas, considerando que essas enzimas desempenham um papel crucial na defesa antioxidante celular,

protegendo as células contra danos oxidativos. Sachett e colaboradores (2022) observaram o mesmo, um aumento significativo na atividade da glutathione peroxidase (GPx) após a exposição de embriões à curcumina.

Diante disso, os resultados revelados neste estudo, indicam que apesar do CV2 induzir aumento de ROS isto não se traduziu em mortalidade ou efeitos não letais, mostrando-se supostamente como um quadro adaptativo e transiente.

Os resultados apresentados mostram a significativa atividade antitumoral *in vitro* de um produto natural inédito, o benzoato de (*E*)-4-(1-epóxi-7,8-propenil)fenila (CV2), 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 antitumoral desse composto, além de contribuir para os estudos da classe dos fenilpropanóides, que apesar de mostrar ser promissora, ainda é pouco estudada.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o Benzoato de(E)-4-(1-Epoxi-7,8-Propen) Fenila (CV2):

- Apresentou efeito antitumoral *in vitro*, em especial em linhagem celular MCF-7 (Câncer de mama humana);
- Induziu citotoxicidade mais seletiva para a linhagem de células MCF-7 em comparação com a linhagem não tumoral (MCF-A10);
- Apresentou citotoxicidade dependente de concentração frente células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas;
- Apresentou efeito antitumoral por indução de apoptose;
- Exerceu efeito antitumoral por indução de estresse oxidativo via aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS);
- Induziu efeito antitumoral associado ao aumento da atividade das proteínas cinases ativadas por mitógeno JNK, p38 MAPK e ERK;
- Apresentou efeito antitumoral por aumento da atividade da PKB/AKT e do NF- κ B;
- Apresentou toxicidade aguda em embriões e larvas do peixe-zebra;
- Alterou a atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra.

REFERÊNCIAS

- ABOTALAB, M.; LSKOVA, A.; KUBATKA, P.; BÜSSELBERG, D. Potencial terapêutico dos ácidos fenólicos das plantas no tratamento do câncer. *Biomoléculas*, v. 10, n. 2, p. 221, 2020. DOI: 10.3390/biom10020221
- ABREU, L. S.; DO NASCIMENTO, Y. M.; DO ESPÍRITO-SANTO, R. F.; MEIRA, C. S.; SANTOS, I. P.; BRANDÃO, R. B.; SOUTO, A. L.; GUEDES, M. L. S.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F.; DA SILVA, M. S.; VELOZO, E. D. S.; TAVARES, J. F. Phenylpropanoids from *Croton velutinus* with cytotoxic, trypanocidal and anti-inflammatory activities. *Fitoterapia*, v. 145, p. 104632, set. 2020. DOI: 10.1016/j.fitote.2020.104632
- ABU-RUSTUM, N.; YASHAR, C.; AREND, R.; BARBER, E.; BRADLEY, K.; BROOKS, R.; CAMPOS, S. M.; CHINO, J.; CHON, H. S.; CHU, C. et al. Uterine neoplasms, version 1.2023, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, v. 21, n. 2, p. 181-209, fev. 2023. DOI: 10.6004/jnccn.2023.0006
- AKIYAMA, Y.; IVANOV, P. Oxidative stress, transfer RNA metabolism, and protein synthesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 40, n. 10-12, p. 715–735, 2024. DOI: 10.1089/ars.2022.0206
- ALMANSOUR, N. M. Triple-negative breast cancer: a brief review about epidemiology, risk factors, signaling pathways, treatment and role of artificial intelligence. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, p. 836417, jan. 2022. DOI: 10.3389/fmolb.2022.836417
- ALONSO DOMÍNGUEZ, T.; CIVERA ANDRÉS, M.; SANTIAGO CRESPO, J. A.; GARCÍA MALPARTIDA, K.; BOTELLA ROMERO, F. Digestive toxicity in cancer treatments. Bibliographic review. Influence on nutritional status. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición (English Edition)*, v. 70, n. 2, p. 136-150, fev. 2023. DOI: 10.1016/j.endien.2023.02.004
- AL-SHARIF, I.; REMMAL, A.; ABOUSSEKHRA, A. Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/survivin down-regulation. *BMC Cancer*, v. 13, p. 600, 13 dez. 2013. DOI: 10.1186/1471-2407-13-600
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, D.; CUBILLAS-MARTÍN, M.; ÁLVAREZ-SUÁREZ, M. L.; VIESCAS-FERNÁNDEZ, M. J.; MEDINA-MEJÍAS, M. R.; RODRÍGUEZ-BALSERA, C. Macular oedema associated with taxanes: a case report and literature review. Edema macular asociado a taxanos: apresentação de um caso e revisão de literatura. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, v. 95, n. 10, p. 485–495, 2020. DOI: 10.1016/j.oftal.2020.05.030
- AMARILLO, D.; DE BONI, D.; CUELLO, M. Chemotherapy, alopecia, and scalp cooling systems. *Actas Dermosifiliográficas*, v. 113, n. 3, p. 278-283, 2022. DOI: 10.1016/j.ad.2021.09.003
- ANANTHARAJU, P. G.; GOWDA, P. C.; VIMALAMBIKE, M. G.;

MADHUNAPANTULA, S. V. Uma visão geral sobre o papel dos fenólicos na dieta para o tratamento de câncer. *O Nutrition Journal*, v. 15, n. 1, p. 99, 1 dez. 2016. DOI: 10.1186/s12937-016-0217-2

ANDRÉ, F.; CIRUELOS, E.; RUBOVSKY, G.; CAMPONE, M.; LOIBL, S.; RUGO, H. S.; IWATA, H.; CONTE, P.; MAYER, I. A.; KAUFMAN, B.; et al. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 380, n. 20, p. 1929-1940, 2019. DOI: 10.1056/NEJMoa1813904

ARNETH, B. Tumor microenvironment. *Medicina (Kaunas)*, v. 56, n. 1, p. 15, 2019. DOI: 10.3390/medicina56010015

ASHRAFIZADEH, M.; MOHAMMADINEJAD, R.; SAMARGHANDIAN, S.; YARIBEYGI, H.; JOHNSTON, T. P.; SAHEBKAR, A. Efeitos anti-tumor de Osthole em diferentes tecidos malignos: uma revisão de mecanismos moleculares. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 8, p. 918-931, 2020. DOI: 10.2174/18715206206662628110704

ATHANASIOU, A.; SMITH, P. A.; VAKILPOUR, S.; KUMARAN, N. M.; TURNER, A. E.; BAGIOKOU, D.; LAYFIELD, R.; RAY, D. E.; WESTWELL, A. D.; ALEXANDER, S. P. H.; et al. Vanilloid receptor agonists and antagonists are mitochondrial inhibitors: how vanilloids cause non-vanilloid receptor-mediated cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 354, p. 50-55, 2007.

AUGIMERI, G.; FIORILLO, M.; MORELLI, C.; PANZA, S.; GIORDANO, C.; BARONE, I.; CATALANO, S.; SISCO, D.; ANDÒ, S.; BONOFILIO, D. The omega-3 docosahexaenoyl ethanolamide reduces CCL5 secretion in triple-negative breast cancer cells affecting tumor progression and macrophage recruitment. *Cancers (Basel)*, v. 15, n. 3, p. 819, 2023. DOI: 10.3390/cancers15030819

AZEVEDO-BARBOSA, H.; FERREIRA-SILVA, G. Á.; SILVA, C. F.; DE SOUZA, T. B.; DIAS, D. F.; DE PAULA, A. C. C.; IONTA, M.; CARVALHO, D. T. Phenylpropanoid-based sulfonamide promotes cyclin D1 and cyclin E down-regulation and induces cell cycle arrest at G1/S transition in estrogen-positive MCF-7 cell line. *Toxicology In Vitro*, v. 59, p. 150-160, DOI: 10.1016/j.tiv.2019.04.023

BANYAL, A.; TIWARI, S.; SHARMA, A.; CHANANA, I.; PATEL, S. K. S.; KULSHRESTHA, S.; KUMAR, P. Vinca alkaloids as a potential cancer therapeutics: recent update and future challenges. *3 Biotech*, v. 13, n. 6, p. 211, 2023. DOI: 10.1007/s13205-023-03636-6

BARBOSA, M. I. A.; BELINHA, J.; JORGE, R. M. N.; CARVALHO, A. X. Proliferação celular de modelagem computacional: uma revisão. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, v. 39, n. 7, 2023. DOI: 10.1002/cnm.3715

BARDIA, A.; KAKLAMANI, V.; WILKS, S.; WEISE, A.; RICHARDS, D.; HARB, W.; OSBORNE, C.; WESOLOWSKI, R.; KARUTURI, M.; CONKLING, P. et al. Phase I study of elacestrant (RAD1901), a novel selective estrogen receptor degrader, in ER-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*,

v. 39, n. 12, p. 1360-1370, abr. 2021. DOI: 10.1200/JCO.20.02272

BARZAMAN, K.; KARAMI, J.; ZAREI, Z.; HOSSEINZADEH, A.; KAZEMI, M. H.; MORADI-KALBOLANDI, S.; SAFARI, E.; FARAHMAND, L. Breast cancer: biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, v. 84, p. 106535, jul. 2020. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106535

BASELGA, J.; CAMPONE, M.; PICCART, M.; BURRIS, H. A. 3rd; RUGO, H. S.; SAHMOUD, T.; NOGUCHI, S.; GNANT, M.; PRITCHARD, K. I.; LEBRUN, F. et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 366, n. 6, p. 520–529, 2012. DOI: 10.1056/NEJMoa1109653

BASSET-SEGUIN, N.; HERMS, F. Atualização no gerenciamento do carcinoma basal. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 100, n. 11, 2020. DOI: 10.2340/00015555-3495

BEL'SKAYA, L. V.; DYACHENKO, E. I. Oxidative stress in breast cancer: a biochemical map of reactive oxygen species production. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 46, n. 5, p. 4646–4687, 2024. DOI: 10.3390/cimb46050282

BELTJENS, F.; MOLLY, D.; BERTAUT, A.; RICHARD, C.; DESMOULINS, I.; LOUSTALOT, C.; CHARON-BARRA, C.; COURCET, E.; BERGERON, A.; LADOIRE, S. et al. ER-/PR+ breast cancer: a distinct entity, which is morphologically and molecularly close to triple-negative breast cancer. *International Journal of Cancer*, v. 149, n. 1, p. 200-213, jul. 2021. DOI: 10.1002/ijc.33539

BERNATONIENE, J.; JAKSTAS, V.; KOPUSTINSKIENE, D. M. Phenolic compounds of *Rhodiola rosea* L. as the potential alternative therapy in the treatment of chronic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 15, p. 12293, 31 jul. 2023. DOI: 10.3390/ijms241512293

BERTHELOOT, D.; LATZ, E.; FRANKLIN, B. S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 18, n. 5, p. 1106–1121, 2021. DOI: 10.1038/s41423-020-00630-3

BOLDUC, J. A.; COLLINS, J. A.; LOESER, R. F. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 132, p. 73-82, 2019.

BONACCI, T.; EMANUELE, M. J. Dissenting degradation: deubiquitinases in cell cycle and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, v. 67, parte 2, p. 145-158, 2020. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.03.008

BRAICU, C.; BUSE, M.; BUSUIOC, C.; DRULA, R.; GULEI, D.; RADULY, L.; RUSU, A.; IRIMIE, A.; ATANASOV, A. G.; SLABY, O. et al. A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer. *Cancers (Basel)*, v. 11, n. 10, p. 1618, 22 out. 2019. DOI: 10.3390/cancers11101618

BRAVO-TAXA, M.; CHUQUILLANQUI LLIMPE, J.; TAXA-ROJAS, L. Carcinoma adenoescamoso de colon: reporte de caso y revisión de la literatura. *Revista de*

Gastroenterología del Perú, v. 41, n. 4, p. 254-256, out./dez. 2021

CAI, J.; CHEN, H.; LU, M.; ZHANG, Y.; LU, B.; YOU, L.; ZHANG, T.; DAI, M.; ZHAO, Y. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: trends, risk factors, screening, and prognosis. *Cancer Letters*, v. 520, p. 1-11, 1 nov. 2021. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.06.027

CARVALHO, A. A.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, É. B.; DE SOUSA, D. P. Antitumor phenylpropanoids found in essential oils. *Biomed Research International*, 2015, artigo 392674. DOI: 10.1155/2015/392674

CELLURALE, C.; GIRNIUS, N.; JIANG, F.; CAVANAGH-KYROS, J.; LU, S.; GARLICK, D. S.; MERCURIO, A. M.; DAVIS, R. J. Papel do JNK no desenvolvimento da glândula mamária e câncer de mama. *Cancer Research*, v. 72, p. 472-48, 2012.

CHAMBERLIN, M. D.; ISLAMI, D. A.; BARTH, R. J. Jr; DEMACI, S. Breast cancer disparities and innovations: a focus on Kosovo. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 38, n. 1, p. 199-207, 2024. DOI: 10.1016/j.hoc.2023.06.002

CHAPA-OLIVER, A. M.; MEJÍA-TENIENTE, L. Capsaicin: from plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules*, v. 21, p. 931, 2016. DOI: 10.3390/molecules21080931

CHEEK, D. M.; NAXEROVA, K. Mapping the long road to cancer. *Cell*, v. 185, n. 6, p. 939-940, 2022. DOI: 10.1016/j.cell.2022.02.020

CLUSAN, L.; FERRIÈRE, F.; FLOURIOT, G.; PAKDEL, F. A basic review on estrogen receptor signaling pathways in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 7, p. 6834, 2023. DOI: 10.3390/ijms24076834.

CORTI, C.; GIUGLIANO, F.; NICOLÒ, E.; TARANTINO, P.; CRISCITIELLO, C.; CURIGLIANO, G. HER2-low breast cancer: a new subtype?. *Current Treatment Options in Oncology*, v. 24, n. 5, p. 468-478, maio 2023. DOI: 10.1007/s11864-023-01068-1.

CRUZ-GÁLVEZ, C. C.; ORDAZ-FAVILA, J. C.; VILLAR-CALVO, V. M.; CANCINO-MARENTES, M. E.; BOSCH-CANTO, V. Retinoblastoma: review and new insights. *Frontiers in Oncology*, v. 12, 963780, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.963780.

DA, Q.; YAN, Z.; LI, Z.; HAN, Z.; REN, M.; HUANG, L.; ZHANG, X.; LIU, J.; WANG, T. TAK1 is involved in sodium L-lactate-stimulated p38 signaling and promotes apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 476, n. 2, p. 873-882, 2021. DOI: 10.1007/s11010-020-03952-y

DAI, X.; HU, Y.; JIANG, L.; LEI, L.; FU, C.; WU, S.; ZHANG, X.; ZHU, L.; ZHANG, F.; CHEN, J.; ZENG, Q. Decreased oxidative stress response and oxidant detoxification of skin during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 216, artigo 111878, 2023. DOI: 10.1016/j.mad.2023.111878

DE GROOT, A. F.; KUIJPERS, C. J.; KROEP, J. R. CDK4/6 inhibition in early and

metastatic breast cancer: a review. *Cancer Treatment Reviews*, v. 60, p. 130–138, 2017. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.09.003

DE LEVAL, L.; JAFFE, E. S. Lymphoma classification. *Cancer Journal*, v. 26, n. 3, p. 176-185, 2020. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000451.

DE LIMA SILVA, M. S.; DA SILVA, M. S.; DA CRUZ, R. C. D.; DE OLIVEIRA VERAS, B.; DE SOUZA, I. A.; XIMENES, R. M. et al. Biological evaluation of 1,3-benzodioxole acids points to 3,4-(methylenedioxy) cinnamic acid as a potential larvicide against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitology*, v. 256, 108657, 2024. DOI: 10.1016/j.exppara.2023.108657.

DE LUCA, A.; MAIELLO, M. R.; D'ALESSIO, A.; FREZZETTI, D.; GALLO, M.; CAROTENUTO, M.; NORMANNO, N. Avaliação farmacocinética do medicamento palbociclib para o tratamento do cancro da mama. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 14, p. 891–900, 2018. DOI: 10.1080/17425255.2018.1514720.

DE SOUZA, C. A.; NARDELLIA, V. B.; PAZA, W. H.; PINHEIRO, M. L. B.; RODRIGUES, A. C. B. D. C.; BOMFIM, L. M. et al. Asarone-derived phenylpropanoids and isoquinoline-derived alkaloids from the bark of *Duguetia pycnastera* (Annonaceae) and their cytotoxicities. *Química Nova*, v. 43, n. 10, p. 1397-1403, 2020.

DHANASEKARAN, R.; DEUTZMANN, A.; MAHAUAD-FERNANDEZ, W. D.; HANSEN, A. S.; GOUW, A. M.; FELSHER, D. W. The MYC oncogene: the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 19, n. 1, p. 23-36, jan. 2022. DOI: 10.1038/s41571-021-00549-2.

DIAZ-SANTOS, M. A.; MARCOS-DELGADO, A.; AMIANO, P.; ARDANAZ, E.; POLLÁN, M.; ALGUACIL, J.; MCC-SPAIN INVESTIGATORS TEAM. Sociodemographic profile and description of the presenting symptom in women with breast cancer in a population-based study: implications and role for nurses. *Enfermería Clínica* v. 33, n. 4, p. 303-310, 2023. DOI: 10.1016/j.enfcle.2023.02.006

DONG, Q.; LI, F. Cell cycle control of kinetochore assembly. *Nucleus (Austin, Tex.)*, v. 13, n. 1, p. 208–220, 2022. DOI: 10.1080/19491034.2022.2115246

EATON, B. R.; SCHWARZ, R.; VATNER, R.; YEH, B.; CLAUDE, L.; INDELICATO, D. J.; LAACK, N. Osteosarcoma. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 68, suplemento 2, e28352, maio 2021

EL-KOTT, A. F.; ELBEALY, E. R.; ALSHEHRI, A. S.; EL-KENAWY, A. E.; KHALIFA, H. S.; ALRAMLAWY, A. M. Salidroside induces cell apoptosis and inhibits the invasiveness of HT29 colorectal cells by regulating protein kinase R, NF-κB and STAT3. *Cancer Biomarkers*, v. 31, p. 13–25, 2021.

ELLIS, M. J.; DING, L.; SHEN, D.; LUO, J.; SUMAN, V. J.; WALLIS, J. W.; VAN TINE, B. A. et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature*, v. 486, n. 7403, p. 353–360, 2012. DOI: 10.1038/nature11143

ENGELAND, K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death and Differentiation*, v. 29, n. 5, p. 946-960, maio 2022. DOI: 10.1038/s41418-022-00988-z

FAIZAN, U.; MUPPIDI, V. Uterine cancer. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, jan. 2024

FASSL, A.; GENG, Y.; SICINSKI, P. CDK4 and CDK6 kinases: from basic science to cancer therapy. *Science (New York, N.Y.)*, v. 375, n. 6577, eabc1495, 2022. DOI: 10.1126/science.abc1495

FAUBERT, B.; SOLMONSON, A.; DEBERARDINIS, R. J. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, v. 368, n. 6487, eaaw5473, 10 abr. 2020. DOI: 10.1126/science.aaw5473

FEINBERG, A. P.; LEVCHENKO, A. Epigenetics as a mediator of plasticity in cancer. *Science*, v. 379, n. 6632, p. 3835, 2023. DOI: 10.1126/science.aaw3835

FISCHER, M.; SCHADE, A. E.; BRANIGAN, T. B.; MÜLLER, G. A.; DECAPRIO, J. A. Coordinating gene expression during the cell cycle. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 47, n. 12, p. 1009–1022, 2022. DOI: 10.1016/j.tibs.2022.06.007.

FOY, R.; et al. Oncogenic signals prime cancer cells for toxic cell overgrowth during a G1 cell cycle arrest. *Molecular Cell*, v. 83, n. 22, p. 4047-4061.e6.

GADALETA, E.; THORN, G. J.; ROSS-ADAMS, H.; JONES, L. J.; CHELALA, C. Field cancerization in breast cancer. *Journal of Pathology*, v. 257, n. 4, p. 561-574, jul. 2022. DOI: 10.1002/path.5902.

GARRIDO-CASTRO, A. C.; LIN, N. U.; POLYAK, K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer Discovery*, v. 9, n. 2, p. 176-198, fev. 2019. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1177.

GIMPLE, R. C.; WANG, X. RAS: striking at the core of the oncogenic circuitry. *Frontiers in Oncology*, v. 9, artigo 965, 24 set. 2019. DOI: 10.3389/fonc.2019.00965.

GLUZ, O.; GRAESER, M. Molecular profiling in early ER + breast cancer to aid systemic therapy decisions. *Current Oncology Reports*, v. 25, n. 5, p. 491–500, 2023. DOI: 10.1007/s11912-023-01377-6.

GRÜNEWALD, T. G.; ALONSO, M.; AVNET, S.; BANITO, A.; BURDACH, S.; CIDRE-ARANAZ, F.; DI POMPO, G. et al. Sarcoma treatment in the era of molecular medicine. *EMBO Molecular Medicine*, v. 12, n. 11, artigo e11131, 6 nov. 2020. DOI: 10.15252/emmm.201911131.

GUO, M.; JIN, J.; ZHAO, D.; RONG, Z.; CAO, L. Q.; LI, A. H.; SUN, X. Y. et al. Research advances on anti-cancer natural products. *Frontiers in Oncology*, v. 12, artigo 866154, 6 maio 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.866154.

GUPTA, V. K.; CHAUDHURI, O. Mechanical regulation of cell-cycle progression and division. *Trends in Cell Biology*, v. 32, n. 9, p. 773-785, set. 2022. DOI: 10.1016/j.tcb.2022.03.010.

Guy, DG, & Uy, GL (2018). Anticorpos biespecíficos para o tratamento de leucemia mieloide aguda. *Current hematologic malignancy reports*, 13 , 417-425.

Gyamfi J, Kim J, Choi J. O câncer como um transtorno metabólico. *Int J Mol Sci*, 2022 21/01;23(3):1155. doi: 10.3390/ijms23031155. PMID: 35163079; PMCID: PMC8835572

Han J, Sun N, Xing J, Fei X, Cai E, Su F. Efeito e mecanismo da Specnuezhenide sobre a mielossupressão induzida pela quimioterapia. *Chem*, 2023;26(13):2393-2400. doi: 10.2174/13862073266662228120608. PMID: 36852800

HANAHAN, D.; MONJE, M. Cancer hallmarks intersect with neuroscience in the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, v. 41, n. 3, p. 573-580, mar. 2023. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.02.012.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, jan. 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

HARTKOPF, A. D.; GRISCHKE, E. M.; BRUCKER, S. Y. Endocrine-resistant breast cancer: mechanisms and treatment. *Breast Care (Basel, Switzerland)*, v. 15, n. 4, p. 347–354, 2020. DOI: 10.1159/000508675.

HEMATPOOR, A.; PAYDAR, M.; LIEW, S. Y.; SIVASOTHY, Y.; MOHEBALI, N.; LOOI, C. Y.; WONG, W. F.; AZIRUN, M. S.; AWANG, K. Phenylpropanoids isolated from *Piper sarmentosum* Roxb. induce apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species and mitochondrial-dependent pathways. *Chemical Biology Interactions*, v. 279, p. 210-218, jan. 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.11.014.

HERNANDES, E. P.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; BINI, R. D.; NAKAMURA, C. V.; CÓTICA, L. F.; DE OLIVEIRA SILVA LAUTENSCHLAGER, S. Doxorubicin-loaded iron oxide nanoparticles induce oxidative stress and cell cycle arrest in breast cancer cells. *Antioxidants*, v. 12, n. 2, p. 237, 2023.

HERZOG, S. K.; FUQUA, S. A. W. ESR1 mutations and therapeutic resistance in metastatic breast cancer: progress and remaining challenges. *British Journal of Cancer*, v. 126, n. 2, p. 174-186, fev. 2022. DOI: 10.1038/s41416-021-01564-x.

HUME, S.; DIANOV, G. L.; RAMADAN, K. A unified model for the G1/S cell cycle transition. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. 22, p. 12483–12501, 2020. DOI: 10.1093/nar/gkaa1002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Relatório técnico sobre incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2023.

IQBAL, M. J.; KABEER, A.; ABBAS, Z.; SIDDIQUI, H. A.; CALINA, D.; SHARIFI-RAD, J.; CHO, W. C. Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer. *Cell Communication and Signaling*, v. 22, n. 1, p. 7,

2024. DOI: 10.1186/s12964-023-01398-5.

JAKUBCZYK, K.; DEC, K.; KASDUŚKA, J.; KAWCZUGA, D.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Espécies de oxigênio reativas: fontes, funções, danos oxidativos. *Pol Merkur Lek Organ Pol*, v. 48, p. 124–127, 2020.

JAMASBI, E.; HAMELIAN, M.; HOSSAIN, M. A.; et al. O ciclo celular, desenvolvimento do câncer e terapia. *Molecular Biology Reports*, v. 49, p. 10875–10883, 2022. DOI: 10.1007/s11033-022-07788-1.

JIA, X. B.; ZHANG, Q.; XU, L.; YAO, W. J.; WEI, L. Lotus leaf flavonoids induce apoptosis of human lung cancer A549 cells through the ROS/p38 MAPK pathway. *Biological Research*, v. 54, n. 1, p. 7, 2021. DOI: 10.1186/s40659-021-00330-w.

JOMOVA, K.; RAPTOVA, R.; ALOMAR, S. Y.; et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, v. 97, p. 2499–2574, 2023. DOI: 10.1007/s00204-023-03562-9.

JÚNIOR, P. L.; CÂMARA, D. A.; COSTA, A. S.; et al. Apoptotic effect of eugenol involves G2/M phase abrogation accompanied by mitochondrial damage and clastogenic effect on cancer cell in vitro. *Phytomedicine*, v. 23, n. 7, p. 725-735, jun. 2016. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.03.014.

KASHYAP, D.; PAL, D.; SHARMA, R.; et al. Global increase in breast cancer incidence: risk factors and preventive measures. *Biomedical Research International*, 2022, artigo 9605439. DOI: 10.1155/2022/9605439.

KATZENELLENBOGEN, J. A.; MAYNE, C. G.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; GREENE, G. L.; CHANDARLAPATY, S. Structural underpinnings of oestrogen receptor mutations in endocrine therapy resistance. *Nature Reviews Cancer*, v. 18, n. 6, p. 377–388, 2018. DOI: 10.1038/s41568-018-0001-z.

KENT, L. N.; LEONE, G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 19, n. 6, p. 326–338, 2019. DOI: 10.1038/s41568-019-0143-7.

KETELUT-CARNEIRO, N.; FITZGERALD, K. A. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis – Oh My! The many ways a cell can die. *Journal of Molecular Biology*, v. 434, n. 4, p. 167378, 2022. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167378.

KIM, M. S.; LEE, C. W.; KIM, J. H.; LEE, J. C.; AN, W. G. Extract of *Rhus verniciflua* Stokes induces p53-mediated apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, artigo 9407340. DOI: 10.1155/2019/9407340.

KLUSKA, M.; WOŹNIAK, K. Natural polyphenols as modulators of etoposide anti-cancer activity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 12, artigo 6602, 2021. DOI: 10.3390/ijms22126602.

KUBO, M. Adjuvant endocrine treatment for estrogen receptor (ER)-positive/HER2-negative breast cancer. *Chinese Clinical Oncology*, v. 9, n. 3, p. 33, 2020. DOI: 10.21037/cco-20-125.

KUSHWAHA, A. K.; SINGH, M.; SHUAIB, K. S.; PRAJAPATI, P. S.; VARDHAN, S.; GUPTA, S.; KUMAR. 3-O-(E)-p-O ácido betulina-reulo possui atividade anticancerígena e inibe a via de sinalização de entalhe em células de câncer de mama e mamosfera. *Chemical Biology Interactions*, v. 328, p. 1-12, 2020. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109200.

LAU, H. W.; MA, H. T.; YEUNG, T. K.; TAM, M. Y.; ZHENG, D.; CHU, S. K.; POON, R. Y. C. Quantitative differences between cyclin-dependent kinases underlie the unique functions of CDK1 in human cells. *Cell Reports*, v. 37, n. 2, artigo 109808, 2021. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109808.

LEE, C. H.; HUANG, C. W.; CHANG, P. C.; SHIAU, J. P.; LIN, I. P.; LIN, M. Y.; LAI, C. C.; CHEN, C. Y. Reactive oxygen species mediate the chemopreventive effects of syringin in breast cancer cells. *Phytomedicine*, v. 61, p. 152844, ago. 2019. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152844.

LEHMANN, B. D.; PIETENPOL, J. A.; TAN, A. R. Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, v. 35, p. e31–e39, 2015. DOI: 10.14694/EdBook.

LI, B.; SHAO, H.; GAO, L.; LI, H.; SHENG, H.; ZHU, L. Nano-drug co-delivery system of natural active ingredients and chemotherapy drugs for cancer treatment: a review. *Drug Delivery*, v. 29, n. 1, p. 2130-2161, dez. 2022. DOI: 10.1080/10717544.2022.2094498.

G, CHU; TONG, Y.; LIANG, Y.; WANG, S.; MA, C.; WANG, Z.; ZHOU, W. Protective effects of Hippophae rhamnoides L. phenylpropanoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity in zebrafish. *Molecules*, v. 27, n. 24, p. 8858, dez. 2022. DOI: 10.3390/molecules27248858.

LI, X.; HE, S.; MA, B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular Cancer*, v. 19, n. 1, p. 12, jan. 2020. DOI: 10.1186/s12943-020-1138-4.

LI, Y.; YANG, D.; YIN, X.; ZHANG, X.; HUANG, J.; WU, Y.; WANG, M.; et al. Clinicopathological characteristics and breast cancer-specific survival of patients with single hormone receptor-positive breast cancer. *JAMA Network Open*, v. 3, n. 1, artigo e1918160, jan. 2020. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2019.18160.

LI, Z.; WEI, H.; LI, S.; WU, P.; MAO, X. The role of progesterone receptors in breast cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 16, p. 305-314, jan. 2022. DOI: 10.2147/DDDT.S336643.

LIANG, J.; ZHAO, W.; TONG, P.; LI, P.; ZHAO, Y.; LI, H.; LIANG, J. Comprehensive molecular characterization of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for therapeutic targeting in cancer. *BMC Medical Genomics*, v. 13, n. 1, artigo 7, 2020. DOI: 10.1186/s12920-020-0661-x.

LIGASOVÁ, A.; FRYDRYCH, I.; KOBERNA, K. Basic methods of cell cycle analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 4, artigo 3674, 2023. DOI: 10.3390/ijms24043674.

LIMAS, J. C.; COOK, J. G. Preparation for DNA replication: the key to a successful S phase. *FEBS Letters*, v. 593, n. 20, p. 2853–2867, 2019. DOI: 10.1002/1873-3468.13619.

LIN, Y.; HAN, C.; XU, Q.; WANG, W.; LI, L.; ZHU, D.; LUO, J.; KONG, L. Integrative countercurrent chromatography for the target isolation of lysine-specific demethylase 1 inhibitors from the roots of *Salvia miltiorrhiza*. *Talanta*, v. 206, artigo 120195, jan. 2020. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120195.

LISSIDINI, G.; MULÈ, A.; SANTORO, A.; PAPA, G.; NICOSIA, L.; CASSANO, E.; et al. Malignant phyllodes tumor of the breast: a systematic review. *Pathologica*, v. 114, n. 2, p. 111-120, abr. 2022. DOI: 10.32074/1591-951X-754.

LIU, Y.; GUAN, X.; WANG, M.; WANG, N.; CHEN, Y.; LI, B.; XU, Z.; FU, F.; ZHENG, Z.; DU, C. Disulfiram/copper induces antitumor activity against gastric cancer via the ROS/MAPK and NPL4 pathways. *Bioengineered*, v. 13, n. 3, p. 6579-6589, mar. 2022. DOI: 10.1080/21655979.2022.2038434.

LIU, Y.; GUO, J.; ZHANG, J.; DENG, Y.; XIONG, G.; FU, J.; WEI, L.; LU, H. Chlorogenic acid alleviates thioacetamide-induced toxicity and promotes liver development in zebrafish (*Danio rerio*) through the Wnt signaling pathway. *Aquatic Toxicology*, v. 242, artigo 106039, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.aquatox.2021.106039.

LIU, J.; ZHANG, C.; LIU, S.; WANG, X.; WU, X.; HAO, J. Tanshinone IIA promotes apoptosis by downregulating BCL2 and upregulating TP53 in triple-negative breast cancer. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 396, n. 2, p. 365–374, 2023. DOI: 10.1007/s00210-022-02316-1.

LUCA, D. C. Update on lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 41, n. 3, p. 405-416, set. 2021. DOI: 10.1016/j.cll.2021.04.003.

MAGGIO, I.; FRANCESCHI, E.; TOSONI, A.; NUNNO, V. D.; GATTO, L.; LODI, R.; BRANDES, A. A. Meningioma: not always a benign tumor. A review of advances in the treatment of meningiomas. *CNS Oncology*, v. 10, n. 2, artigo CNS72, jun. 2021. DOI: 10.2217/cns-2021-0003.

MASENGA, S. K.; KABWE, L. S.; CHAKULYA, M.; KIRABO, A. Mechanisms of oxidative stress in metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 9, artigo 7898, 2023.

MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current cancer epidemiology. *Journal of Epidemiology and Global Health*, v. 9, n. 4, p. 217-222, dez. 2019. DOI: 10.2991/jegh.k.191008.001.

MAXIMOV, P. Y.; FAN, P.; ABDERRAHMAN, B.; CURPAN, R.; JORDAN, V. C. Estrogen receptor complex to trigger or delay estrogen-induced apoptosis in long-term estrogen deprived breast cancer. *Frontiers in Endocrinology*, v. 13, artigo 869562, 2022. DOI: 10.3389/fendo.2022.869562.

MICHAUD, D.; STEWARD, C. R.; MIRLEKAR, B.; PYLAYEVA-GUPTA, Y. Regulatory B cells in cancer. *Immunological Reviews*, v. 299, n. 1, p. 74-92, jan. 2021. DOI: 10.1111/imr.12939.

MOHANTY, M.; MOHANTY, P. S. Acoplamento molecular em sistemas orgânicos, inorgânicos e híbridos: uma revisão tutorial. *Monatsh Chem*, 2023. DOI: 10.1007/s00706-023-03076-1.

MORANA, O.; WOOD, W.; GREGORY, C. D. The apoptosis paradox in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 3, artigo 1328, jan. 2022. DOI: 10.3390/ijms23031328.

MULLER, P. Y.; MILTON, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 11, n. 10, p. 751-761, out. 2012. DOI: 10.1038/nrd3801.

MUSHEYEV, D.; ALAYEV, A. Endocrine therapy resistance: what we know and future directions. *Exploration of Targeted Anti-Tumor Therapy*, v. 3, n. 4, p. 480–496, 2022. DOI: 10.37349/etat.2022.00096.

NAEEM, A.; HU, P.; YANG, M.; et al. Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives. *Molecules*, v. 27, n. 23, artigo 8367, nov. 2022. DOI: 10.3390/molecules27238367.

NARAYANANKUTTY, A. Inhibitory potential of dietary nutraceuticals on cellular PI3K/Akt signaling: implications in cancer prevention and therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 20, p. 1816-1831, 2021.

NAWROT-HADZIK, I.; MATKOWSKI, A.; FAST, M.; CHOROMASSKA, A. A combinação de vanicosídeos de ação pró-oxidativa e inibidor de GLUT1 (WZB117) exerce um efeito citotóxico sinérgico contra as células do melanoma. *Fitoterapia*, v. 171, artigo 105702, out. 2023. DOI: 10.1016/j.fitote.2023.105702.

NEUPANE, N.; BAWEK, S.; GURUSINGHE, S.; et al. Oral SERD, a novel endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancers*, v. 16, n. 3, artigo 619, 2024. DOI: 10.3390/cancers16030619.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, mar. 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NEWTON, K.; STRASSER, A.; KAYAGAKI, N.; DIXIT, V. M. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Cell*, v. 187, n. 2, p. 235–256, 2024. DOI: 10.1016/j.cell.2023.11.044.

NOTARBARTOLO, M.; POMA, P.; PERRI, D.; DUSONCHET, L.; CERVELLO, M.; D'ALESSANDRO, N. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Letters*, v. 224, n. 1, p. 53–65, 2005. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.10.051.

NYGA, A.; GANGULI, S.; MATTHEWS, H. K.; BAUM, B. The role of RAS oncogenes in controlling epithelial mechanics. *Trends in Cell Biology*, v. 33, n. 1, p. 60-69, jan. 2023. DOI: 10.1016/j.tcb.2022.09.002.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the testing of chemicals: fish embryo acute toxicity (FET). Test nº 236. Paris: OECD, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Relatório sobre saúde global. Genebra: OMS, 2023.

OBEAGU, E. I.; OBEAGU, G. U. Câncer de mama: uma revisão dos fatores de risco e diagnóstico. *Medicine (Baltimore)*, v. 103, n. 3, artigo e36905, jan. 2024. DOI: 10.1097/MD.00000000000036905.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals: a review. *Brazilian Journal of Biology*, v. 81, n. 4, p. 1133–1143, 2021. DOI: 10.1590/1519-6984.228437.

OLUFUNMILAYO, E. O.; GERKE-DUNCAN, M. B.; HOLSINGER, R. D. Oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative disorders. *Antioxidants*, v. 12, n. 2, artigo 517, 2023.

PADHY, I.; PAUL, P.; SHARMA, T.; BANERJEE, S.; MONDAL, A. Molecular mechanisms of action of eugenol in cancer: recent trends and advancement. *Life (Basel)*, v. 12, n. 11, artigo 1795, nov. 2022. DOI: 10.3390/life12111795.

PANICHI, V.; BISSOLI, I.; D'ADAMO, S.; FLAMIGNI, F.; CETRULLO, S.; BORZÌ, R. M. NOTCH1: a novel player in the molecular crosstalk underlying articular chondrocyte protection by oleuropein and hydroxytyrosol. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 6, artigo 5830, mar. 2023. DOI: 10.3390/ijms24065830.

PAREDES, F.; WILLIAMS, H. C.; SAN MARTIN, A. Metabolic adaptation in hypoxia and cancer. *Cancer Letters*, v. 502, p. 133-142, abr. 2021. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.12.020.

PARK, J. H.; PYUN, W. Y.; PARK, H. W. Cancer metabolism: phenotype, signaling and therapeutic targets. *Cells*, v. 9, n. 10, p. 2308, 2020. DOI: 10.3390/cells9102308.

PATIL, A. S.; IBRAHIM, M. K.; SATHAYE, S.; et al. Mitochondriotropic derivative of ethyl ferulate, a dietary phenylpropanoid, exhibits enhanced cytotoxicity in cancer cells via mitochondrial superoxide-mediated activation of JNK and AKT signalling. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 195, p. 2057–2076, 2023.

PEDDI, P. F. Triple negative breast cancer: any closer to cracking the code? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, v. 34, n. 1, p. 52-55, fev. 2022. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000769.

PIEZZO, M.; COCCO, S.; CAPUTO, R.; et al. Targeting cell cycle in breast cancer: CDK4/6 inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 18, artigo 6479, 2020. DOI: 10.3390/ijms21186479.

RAHEEM, F.; KARIKALAN, S. A.; BATALINI, F.; EL MASRY, A.; MINA, L. Metastatic ER+ breast cancer: mechanisms of resistance and future therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 22, artigo 16198, nov. 2023. DOI: 10.3390/ijms242216198.

RASHIDI ALAVIJEH, M.; ETESAMI, H.; DEHGHAN, A.; et al. The cytotoxicity of 27-hydroxycholesterol in MCF-7 and MDA-MB-231. *Advances in Biomedical Research*, v. 12, artigo 246, out. 2023. DOI: 10.4103/abr.abr_13_23.

RAY, S. K.; JAYASHANKAR, E.; KOTNIS, A.; MUKHERJEE, S. Oxidative versus reductive stress in breast cancer development and cellular mechanism of alleviation: a current perspective with anti-breast cancer drug resistance. *Current Molecular Medicine*, v. 24, n. 2, p. 205-216, 2024.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, v. 1, p. 79–98, 2017.

RIGGIO, A. I.; VARLEY, K. E.; WELM, A. L. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. *British Journal of Cancer*, v. 124, p. 13–26, 2021. DOI: 10.1038/s41416-020-01161-4.

ROBATI, A. K.; SHAHSAVARI, Z.; VAEZI, M. A.; et al. Caffeic acid stimulates breast cancer death through reactive oxygen species (ROS) formation, caspase activation and mitochondrial membrane potential depletion. *Acta Biochimica Iranica*, v. 1, n. 4, p. 176-182, 2024.

ROWELL, M. C.; DESCHÊNES-SIMARD, X.; LOPES-PACIENCI, S.; et al. Targeting ribosome biogenesis reinforces ERK-dependent senescence in pancreatic cancer. *Cell Cycle*, v. 22, n. 19, p. 2172–2193, 2023. DOI: 10.1080/15384101.2023.2278945.

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

RUSCETTI, M.; MORRIS, J. P.; MEZZADRA, R.; et al. Senescence-induced vascular remodeling creates therapeutic vulnerabilities in pancreas cancer. *Cell*, v. 181, n. 2, p. 424-441.e21, abr. 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.03.008.

RYU, M.; SUNG, C. K.; IM, Y. J.; CHUN, C. Ativação de JNK e p38 em células MCF-7 e a atividade anti-câncer introdutiva do extrato de *Alnus hirsuta*. *Molecules*, v. 25, artigo 1073, 2020. DOI: 10.3390/molecules25051073.

SAATCI, O.; HUYNH-DAM, K. T.; SAHIN, O. Endocrine resistance in breast cancer: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*, v. 99, n. 12, p. 1691-1710, dez. 2021. DOI: 10.1007/s00109-021-02136-5.

SEGAWA, K.; SUZUKI, J.; NAGATA, S. Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 48, p. 19246–19251, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1114799108.

SHANG, L.; WANG, Y.; LI, J.; et al. Mechanism of Sijunzi Decoction in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 302, artigo 115876, fev. 2023. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115876.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 70, n. 1, p. 7-30, jan. 2020. DOI: 10.3322/caac.21590.

SILVA, R. L. D. S.; LINS, T. L. B. G.; MONTE, A. P. O. D.; et al. Protective effect of gallic acid on doxorubicin-induced ovarian toxicity in mouse. *Reproductive Toxicology*, v. 115, p. 147-156, jan. 2023. DOI: 10.1016/j.reprotox.2022.12.008.

SOUZA, C. A.; SIMÕES, R.; BORGES, K. B. G.; et al. Arterial stiffness use for early monitoring of cardiovascular adverse events due to anthracycline chemotherapy in breast cancer patients: a pilot study. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 111, n. 5, p. 721-728, nov. 2018. DOI: 10.5935/abc.20180168.

SRINIVAS, U. S.; TAN, B. W. Q.; VELLAYAPPAN, B. A.; JEYASEKHARAN, A. D. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, v. 25, artigo 101084, jul. 2019. DOI: 10.1016/j.redox.2018.101084.

STALLAERT, W.; KEDZIORA, K. M.; TAYLOR, C. D.; et al. The structure of the human cell cycle. *Cell Systems*, v. 13, n. 3, p. 230–240.e3, 2022. DOI: 10.1016/j.cels.2021.10.007.

STOCKWELL, S. Classics in oncology: George Thomas Beatson, M.D. (1848-1933). *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 33, n. 2, p. 105–121, 1983. DOI: 10.3322/canjclin.33.2.105.

SU, T.; YANG, B.; GAO, T.; LIU, T.; LI, J. Polymer nanoparticle-assisted chemotherapy of pancreatic cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, v. 12, artigo 1758835920915978, maio 2020. DOI: 10.1177/1758835920915978.

SUN, Y.; LIU, Y.; MA, X.; HU, H. The influence of cell cycle regulation on chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, artigo 6923, jun. 2021. DOI: 10.3390/ijms22136923.

SUN, Y.; ZHANG, N.; WANG, C.; et al. The biosynthesis of camptothecin derivatives by *Camptotheca acuminata* seedlings. *Natural Product Research*, v. 35, n. 14, p. 2403–2407, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2019.1678616.

SUZUKI, J.; DENNING, D. P.; IMANISHI, E.; et al. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science*, v. 341, p. 403–406, 2013. DOI: 10.1126/science.1236758.

TANG, D.; KANG, R.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P.; KROEMER, G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, v. 29, n. 5, p. 347–364, 2019. DOI: 10.1038/s41422-019-0164-5.

TAO, Y.; DU, C.; DUAN, B.; et al. Eugenol exposure inhibits embryonic development and swim bladder formation in zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 268, artigo 109602, 2023. DOI: 10.1016/j.cbpc.2022.109602.

TOKUNAGA, Y.; OTSUYAMA, K. I.; HAYASHIDA, N. Cell cycle regulation by heat shock transcription factors. *Cells*, v. 11, n. 2, artigo 203, 2022. DOI: 10.3390/cells11020203.

TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. Classificação molecular do câncer de mama. *Advances in Anatomic Pathology*, v. 27, n. 1, p. 27–35, jan. 2020. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000232.

TURNER, N.; OLIVEIRA, M.; HOWELL, S. J.; et al. Capivasertib and fulvestrant for patients with aromatase inhibitor-resistant hormone receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer: results from the Phase III CAPitello-291 trial. *Cancer Research*, v. 83, n. 5_Supplement, GS3-04, 2023.

ULLAH, R.; ALQAHTANI, A. S.; SHAHAT, A. A.; et al. The antiproliferative effects of *Marrubium vulgare* and toxicity screening in zebrafish embryos. *Journal of King Saud University-Science*, v. 36, n. 7, artigo 103241, 2024.

VAGHARI-TABARI, M.; FERNS, G. A.; QUJEQ, D.; et al. Signaling, metabolism, and cancer: an important relationship for therapeutic intervention. *Journal of Cellular Physiology*, v. 236, p. 5512–5532, 2021. DOI: 10.1002/jcp.30276.

WANG, W.; LI, C.; CHEN, Z.; et al. Novel diosgenin-amino acid-benzoic acid mustard trihybrids exert antitumor effects via cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 216, artigo 106038, fev. 2022. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2021.106038.

WANG, Z. Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling. *Cells*, v. 10, n. 12, artigo 3327, 2021. DOI: 10.3390/cells10123327.

WANG, Z. Cell cycle progression and synchronization: an overview. *Methods in Molecular Biology*, v. 2579, p. 3–23, 2022. DOI: 10.1007/978-1-0716-2736-5_1.

WILKINSON, L.; GATHANI, T. Understanding breast cancer as a global health concern. *British Journal of Radiology*, v. 95, n. 1130, artigo 20211033, fev. 2022. DOI: 10.1259/bjr.20211033.

WILL, M.; LIANG, J.; METCALFE, C.; CHANDARLAPATY, S. Therapeutic resistance to anti-oestrogen therapy in breast cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 23, n. 10, p. 673–685, out. 2023. DOI: 10.1038/s41568-023-00604-3.

WU, H.; CHEN, L.; ZHU, F.; et al. The cytotoxicity effect of resveratrol: cell cycle arrest and induced apoptosis of breast cancer 4T1 cells. *Toxins (Basel)*, v. 11, n. 12, artigo 731, dez. 2019. DOI: 10.3390/toxins11120731.

WU, S. J.; NG, L. T.; LIN, C. C. Cinnamaldehyde-induced apoptosis in human PLC/PRF/5 cells through activation of the proapoptotic Bcl-2 family proteins and MAPK pathway. *Life Sciences*, v. 77, n. 8, p. 938–951, 2005. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.02.005.

XIAO, Y.; REN, Q.; WU, L. The pharmacokinetic property and pharmacological activity of acteoside: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 153, artigo 113296, set. 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113296.

YANG, M.; JIANG, P.; HOFFMAN, R. M. Early reporting of apoptosis by real-time imaging of cancer cells labeled with green fluorescent protein in the nucleus and red fluorescent protein in the cytoplasm. *Anticancer Research*, v. 35, p. 2539–2544, 2015.

YI, P. C.; ZHUO, L.; LIN, J.; et al. Impacto do processamento PBMC atrasado em ensaios funcionais e genômicos. *Journal of Immunological Methods*, v. 519, artigo 113514, ago. 2023. DOI: 10.1016/j.jim.2023.113514.

YOON, J. H.; PHAM, T. H.; LEE, J.; et al. Methyl linderone suppresses TPA-stimulated IL-8 and MMP-9 expression via the ERK/STAT3 pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 3, p. 325–332, 2020. DOI: 10.4014/jmb.1911.11068.

YOSHIDA, K. I.; YOSHIDA, A. Sarcoma of the lung and mediastinum. *Surgical Pathology Clinics*, v. 17, n. 2, p. 243–255, jun. 2024. DOI: 10.1016/j.path.2023.11.008.

YOSHIKAWA, T.; YOU, F. Oxidative stress and bio-regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 6, artigo 3360, 2024. DOI: 10.3390/ijms25063360.

YUE, J.; LÓPEZ, J. M. Entendendo MAPK signaling pathways em apoptose. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, artigo 2346, jan. 2020. DOI: 10.3390/ijms21072346.

ZAINOL ABIDIN, I. Z.; FAZRY, S.; JAMAR, N. H.; et al. Os efeitos de extratos aquosos de *Piper sarmentosum* sobre embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) e regeneração do tecido caudal da barbatana. *Scientific Reports*, v. 10, artigo 14165, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-70962-7.

ZATULOVSKIY, E.; ZHANG, S.; BERENSON, D. F.; et al. Cell growth dilutes the cell cycle inhibitor Rb to trigger cell division. *Science*, v. 369, n. 6502, p. 466–471, 2020. DOI: 10.1126/science.aaz6213.

ZHANG, F.; JIA, Z.; DENG, Z.; et al. Modulação in vitro da atividade da telomerase, comprimento dos telômeros e ciclo celular em células MKN45 por verbascoside. *Planta Medica*, v. 68, n. 2, p. 115–118, fev. 2002. DOI: 10.1055/s-2002-20255.

ZHAO, H.; WU, L.; YAN, G.; et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, n. 1, artigo 263, jul. 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00658-5.

ZHU, L.; LIN, M. The synthesis of nano-doxorubicin and its anticancer effect. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 18, p. 2466–2477, 2021. DOI: 10.2174/1871520621666201229115612.

ZILBERTER, Y.; TABUENA, D. R.; ZILBERTER, M. NOX-induced oxidative stress is a primary trigger of major neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, v. 231, artigo 102539, 2023. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2023.102539.

ZINCZUK, J.; MACIEJCZYK, M.; ZAREBA, K.; et al. Antioxidant barrier, redox status, and oxidative damage to biomolecules in patients with colorectal cancer. *Biomolecules*, v. 9, artigo 637, 2019.

ZRAIK, I. M.; HEß-BUSCH, Y. Management von Nebenwirkungen der Chemotherapie und deren Langzeitfolgen. *Urologe A*, v. 60, n. 7, p. 862–871, jul. 2021. DOI: 10.1007/s00120-021-01569-7.

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

Prof. 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 aceito para publicação 17/01/2025

Reference#: BMS-CPD-2024-974

Submission Title: "New Phenylpropanoid from Croton Velutinus (Euphorbiaceae) as Potential Anticancer Natural Product Targeting MAPKs: mini-review with docking approach"

Dear Dr. Luciana Scotti,

On behalf of Bentham Science, I am pleased to inform you that your article titled ""**New Phenylpropanoid from Croton Velutinus (Euphorbiaceae) as Potential Anticancer Natural Product Targeting MAPKs: mini-review with docking approach**"" with Reference No. "BMS-CPD-2024-974" has been found generally acceptable for publication, following an independent peer review.

Certain aspects of your submission relating to the quality of language, plagiarism/ similarity, figures and use of AI tools (if any) may require additional scrutiny by our Quality Assurance Department before final acceptance and publication.

Attached is your digitally signed copyright letter for your records.

We appreciate your valuable contribution to "Current Pharmaceutical Design" and look forward to successful collaboration in the future.

ANEXO 4– Artigos publicados durante a vigência do doutorado



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 Abranches 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
Abranches, 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 Abranches¹,
Ana Paula G. Moura¹, Rafael C. Ferreira¹,
Reinaldo N. de Almeida¹, Renan M. Braga¹,
Fagner Carvalho Leite¹, Karina C. de P. Medeiros²,
Misael 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 5– Artigos publicados durante a vigência do doutorado

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. Manguiera¹ · Tatyanna K. G. de Sousa¹ · Rafael C. Ferreira¹ · Ana Paula G. Moura¹ · Lucas S. Abreu¹ · Adriano F. Alves² · Eudes S. Vellozo³ · 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@ltf.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 6 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado

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 Abrantes^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@lftf.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 7 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado

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 Kevia Gomes de Sousa¹ · Vivianne Mendes Manguiera¹ · 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