

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Diogo Miranda Rocha

Citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas contra células de melanoma humano

Juiz de Fora – MG

2023

Diogo Miranda Rocha

Citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas contra células de melanoma humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Linha de Pesquisa: Avaliação Biológica e Farmacológica de Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvoat

Coorientador: Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

Juiz de Fora – MG

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Miranda Rocha, Diogo.

Citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas contra células de melanoma humano / Diogo Miranda Rocha. -- 2023.

103 p. : il.

Orientadora: Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvocat

Coorientador: José Otávio do Amaral Corrêa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. Melanoma. 2. Produtos Naturais. 3. Lactonas sesquiterpênicas.
I. Chagas de Paula Ladvocat, Ana Cláudia, orient. II. do Amaral Corrêa, José Otávio, coorient. III. Título.

Diogo Miranda Rocha

Citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas contra células de melanoma humano

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de Fora
como requisito parcial
à obtenção do título de
Mestre em Ciências
Farmacêuticas. Área de
concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos
Ativos.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvoat - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. José Otávio do Amaral Correa - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria

Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 02/02/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Claudia Chagas de Paula Ladvoat, Professor(a)**, em 01/03/2023, às 13:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Maria Pinto Vilela, Professor(a)**, em 01/03/2023, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Otavio do Amaral Correa, Professor(a)**, em 03/03/2023, às 08:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria, Usuário Externo**, em 03/03/2023, às 09:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1137202** e o código CRC **66FCA9F0**.

Dedico este trabalho à minha família, aos amigos e a todos os pacientes oncológicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amigos que me acompanharam nesse caminho pela pesquisa e ciência, especialmente Wand e Anelise, com toda a paciência me introduziram no mundo dos estudos *in vitro*. Às minhas queridas amigas do LCTP – Laboratório de Células-Tronco e Parasitologia Celular, Ludmila, Fernanda, Vanessa e Giulia. Obrigado por colorirem meus dias. Admiro cada uma de vocês. Aos amigos que a graduação me proporcionou, Davi, Noemy, Rafaela, Tatá, Ana Carolina e Maíra. Obrigado por me ensinarem que a vida não precisa ser levada tão a sério. Aos queridos amigos do Tarantolato, Mariza, Thaiana, Amélia, Diego, Victor, Lu, Signore, Luzia, Duda, Cecília e Zayon, que me receberam de braços abertos e me mostraram na dança uma outra forma de sorrir para a vida. Aos amigos do Teatro, Fabrício, Ana, Mari e Ju. Obrigado por terem dividido comigo tantas histórias e emoções! Aos meus eternos e amados amigos da vida, Carol, Louise, Jéssica, Thayná, Letícia, Juh, Cyrill e Marcos. Sem cada um de vocês para me motivar eu não teria chegado até aqui.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas Farmacêuticas, Tati, Jéssica, Laura, Lívia, Lorena, Romário e Jucélia por toda a ajuda e momentos divertidos que passamos juntos. À equipe da CENTRALBIO por todo o suporte. Aos professores e alunos do LFQM – Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da Unifal, em especial à professora Dani e sua equipe por disponibilizarem as substâncias TC e TF. À professora Mariza Ionta por disponibilizar as linhagens celulares. Ao professor Gilson e ao Erick do IMUNOCET por todo o suporte. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Sempre defendi que o papel do professor na educação de seus alunos vai bem além do “transmitir informações”. Valores de vida também são passados nessa relação simbiótica, contagiando nossa mente com novas reflexões e perspectivas. É por isso que dedico um agradecimento especial à professora Ana Cláudia, não apenas pela seriedade com que trata a pesquisa, mas também por ter aberto as portas do laboratório para me receber e por ter confiado em meu potencial, validando minhas ideias e puxando a orelha quando preciso.

Agradeço, também, ao meu coorientador, professor José Otávio, que vem me acompanhando desde o TCC e que me mostrou a beleza da Pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Jerusa, da UFAM, e à professora Fernanda, da UFJF, por terem aceitado compor a banca deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de mestrado e à FAPEMIG pelo fomento a REMETTEC - Rede Mineira de Engenharia de Tecidos e Terapia Celular (RED-00570-16).

À Universidade Federal de Juiz de Fora, responsável por minha formação acadêmico-científica desde a graduação, e a todos os pesquisadores e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Vocês continuamente enriquecem a literatura científica e possibilitam que inúmeros trabalhos, como este, sejam feitos.

Por último e não menos importante, agradeço imensamente à minha família, por todo suporte, acolhimento e amor. Amo todos vocês.

“Se quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe, vá acompanhado”.
(Provérbio africano)

RESUMO

O melanoma cutâneo é o câncer de pele de maior malignidade, que pode apresentar um dos piores prognósticos devido à sua alta taxa de mortalidade e características metastáticas invasivas. Apesar dos avanços revolucionários nas estratégias terapêuticas, limitações e desvantagens têm sido relatadas para os medicamentos atualmente disponíveis. Os produtos naturais têm sido uma rica fonte de medicamentos há milênios, e várias evidências demonstram atividades farmacológicas promissoras dos extratos de *Tithonia diversifolia*, dos quais as tagitininas são purificadas, especialmente atribuídas à tagitinina C (TC). Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar as propriedades citotóxicas *in vitro* da lactona sesquiterpênica TC e de seu isômero, tagitinina F (TF), frente a células de melanoma humano das linhagens WM1366 e CHL-1. Para o desenvolvimento experimental deste estudo, foram realizados ensaios de viabilidade celular utilizando o método do MTT e teste de exclusão do azul de tripan; o ensaio de formação de colônias foi realizado por meio da coloração com cristal violeta; a migração celular foi realizada pela técnica de *scratch* e a análise do ciclo celular e tipo de morte celular foram realizadas por citometria de fluxo. TC e TF inibiram o crescimento das células de melanoma de maneira dose-dependente, sendo que a TC apresentou citotoxicidade cerca de 10 vezes maior do que TF. Nas concentrações tóxicas para a linhagem CHL-1, TC e TF não foram tóxicas para os fibroblastos normais da pele, ao passo que TF não apresentou seletividade para WM1366. A migração celular foi suprimida de maneira dependente do tempo, bem como a proliferação celular. As substâncias inibiram a formação de colônias, sendo CHL-1 mais sensível aos efeitos de TC e TF. As tagitininas promoveram parada do ciclo celular e induziram apoptose e necrose. TF promoveu parada do ciclo celular na fase G2/M em 48 h. No entanto, TC impulsionou arraste em G2/M em 24 h de tratamento e a aumento do perfil sub-G1 em 48 h. Ambas as lactonas sesquiterpênicas derivadas de *Tithonia diversifolia* mostraram um efeito citotóxico promissor e com uma atividade de morte seletiva de células tumorais com potencial de interferir negativamente na complexa maquinaria oncogênica.

Palavras-chave: Melanoma. Produtos naturais. Lactonas sesquiterpênicas.

ABSTRACT

Cutaneous melanoma is the greater malignancy skin tumor that can display one of the worse prognoses due to its high mortality rate and invasive metastatic characteristics. Despite breakthrough advances in therapeutic strategies, limitations and disadvantages have been reported to the currently available drugs. Natural products have been a rich source of medicines for millennia, and several evidences have demonstrated promising pharmacological activities of the extracts of *Tithonia diversifolia* from which tagitinins are purified, especially attributed to tagitinin C (TC). Thus, the objective of this work was to check the *in vitro* cytotoxic properties of sesquiterpene lactone TC and its isomer, tagitinin F (TF), against human melanoma cells. For the experimental development of this study, cell viability assays were performed using the MTT and trypan blue exclusion test; the clonogenic assay was performed by violet crystal staining; the cell migration was performed by *scratch* technique and cell cycle and type of cell death analysis were performed by flow cytometer. TC and TF impair the growth of melanoma cells in a dose-dependent manner. TC showed cytotoxicity about 10 times greater than TF. At concentrations toxic to the CHL-1 line, TC and TF were not toxic to normal skin fibroblasts, whereas TF did not showed selectivity for WM1366. Cell migration was suppressed in a time-dependent manner, as well as cell proliferation. The substances inhibited the formation of colonies, which CHL-1 was more sensitive to the effects of TC and TF. Tagitinins promoted cell cycle arrest and induced apoptosis and necrosis. TF promoted cell-cycle arrest in the G2/M phase in 48 h. However, TC boosted arrest in G2/M at 24 h and sub-G1 distribution at 48 h. Both sesquiterpene lactones derived from *Tithonia diversifolia* showed a promising cytotoxic effect and selective tumor cell killing activity with the potential to negatively interfere with the complex oncogenic machinery.

Keywords: Melanoma. Natural products. Sesquiterpene lactones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da estrutura da pele e os tipos celulares que a constituem.....	19
Figura 2 -	Transformação de melanócitos em melanoma pela radiação UV.....	23
Figura 3 -	Esquema resumido da via intrínseca e extrínseca da apoptose, necrose e ciclo celular	27
Figura 4 -	Tipos de melanoma cutâneo.....	28
Figura 5 -	Aplicação da regra ABCDE na dermatoscopia.....	30
Figura 6	Fases e alterações moleculares associadas ao início e progressão do melanoma metastático.....	31
Figura 7 -	Principais vias de sinalização intracelular alvos da terapia direcionada antitumoral.....	36
Figura 8 -	Imagem das partes aéreas da <i>Tithonia diversifolia</i>	43
Figura 9 -	Fórmula estrutural química das tagitininas C (1) e F (2).....	45
Figura 10 -	Fotomicrografias das linhagens tumorais e dos fibroblastos normais da pele.....	55
Figura 11 -	Viabilidade celular após tratamento com TC e TF para as linhagens tumorais.....	56
Figura 12 -	Viabilidade de fibroblastos humanos após tratamento com TC e TF.....	58
Figura 13 -	Ensaio de proliferação celular pela exclusão do azul de tripan.....	60
Figura 14 -	Ensaio de migração celular das linhagens tumorais.....	61
Figura 15 -	Ensaio de formação de colônias das linhagens tumorais.....	63
Figura 16 -	Análise do ciclo celular da CHL-1.....	65
Figura 17 -	Análise do ciclo celular da WM1366.....	66
Figura 18 -	Determinação da morte celular por citometria de fluxo das células CHL-1.....	67
Figura 19 -	Determinação da morte celular por citometria de fluxo das células WM1366.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Terapias aprovadas pelo FDA para o melanoma metastático.....	34
Tabela 2 -	IC ₅₀ dos tratamentos químicos em cada linhagem celular.....	57
Tabela 3 -	Índice de seletividade (SI) das tagitininas para as linhagens tumorais.	58

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ABCDE	Sistema de Classificação de lesões pigmentadas da pele
a.C.	antes de Cristo
AKT	proteína quinase específica de serina-treonina
Bax	proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2	proteína 2 do linfoma de células B
BRAF	homólogo do oncogene viral de sarcoma murino v-raf B1
CCND1	gene da ciclina D1
CDK 4	quinase dependente de ciclina
CDKN2A	inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DTIC	dacarbazina
E2F	família de fatores transcricionais
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IC ₅₀	concentração inibitória de 50%
IL-2	interleucina 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MDM2	proteína inibitória da p53
MEK	quinase MAPK
mTOR	alvo da rampamicina em mamíferos
NF-κB	fator nuclear kappa B
NRAS	homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma
p21	proteína 21 inibidora das CDKs
p27	proteína 27 inibidora das CDKs
p53	proteína do gene supressor tumoral 53
pb	pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase
pRb	proteína retinoblastoma
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina

RGP	fase de crescimento radial do tumor
S	fase de síntese de DNA do ciclo celular
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	tagitinina C
TF	tagitinina F
TNM	Sistema de Classificação do melanoma segundo a AJCC
TP53	gene da proteína 53
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV	ultravioleta
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VGP	fase de crescimento vertical invasivo do tumor
α -MSH	hormônio estimulante de alfa-melanócitos
5-FU	5-fluorouracil

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
\leq	Menor ou igual que
\pm	mais ou menos
R\$	Real
μg	micrograma
μL	microlitro
cm	centímetro
mL	mililitro
mm	milímetro
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
v/v	volume por volume
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
α	<i>alfa</i>
β	<i>beta</i>
γ	<i>gama</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 ASPECTOS GERAIS DA PELE E DOS MELANÓCITOS.....	19
2.1.1 Configuração da pele e função dos melanócitos	19
2.2 O MELANOMA CUTÂNEO.....	21
2.2.1 Epidemiologia e fatores de risco.....	21
2.2.2 Ciclo celular e morte celular na transformação maligna de melanócitos.....	23
2.2.3 Classificação e aspectos clínicos.....	27
2.2.4 Diagnóstico do melanoma.....	29
2.2.5 Melanoma metastático.....	30
2.2.6 Principais terapias preconizadas para o melanoma.....	32
2.2.6.1 Cirurgia e radioterapia.....	32
2.2.6.2 Quimioterapia.....	34
2.2.6.3 Terapia direcionada.....	35
2.2.6.4 Imunoterapia.....	38
2.3 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS NO CÂNCER.....	39
2.4 – BIOATIVIDADE DA <i>Tithonia diversifolia</i> E SEUS COMPOSTOS TC E TF	42
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
4 METODOLOGIA.....	47
4.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	47
4.2 SUBSTÂNCIAS.....	48
4.3 DESENHO DOS EXPERIMENTOS.....	48
4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT.....	49
4.5 EXCLUSÃO POR AZUL DE TRYPAN.....	50
4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR PELA TÉCNICA DE SCRATCH.....	50
4.7 ENSAIO CLONOGÊNICO.....	51
4.8 ANÁLISE DO TIPO DE MORTE CELULAR.....	52
4.9 ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	53

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 TAGITININAS C E F SÃO CITOTÓXICAS PARA CÉLULAS DE MELANOMA.....	55
5.2 TAGITININAS C E F INIBEM A PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	58
5.3 TAGITININAS C E F BLOQUEIAM A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS.....	62
5.4 TAGITININAS C E F PROMOVEM PARADA DO CICLO CELULAR EM G2/M.....	64
5.5 TAGITININAS C E F PROMOVEM MORTE CELULAR POR APOPTOSE E NECROSE.....	66
6 DISCUSSÃO.....	69
7 CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO A: CADASTRO SISGEN <i>Tithonia diversifolia</i>.....	101

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é a forma mais agressiva e resistente de câncer de pele e surge do mau funcionamento dos melanócitos normais da epiderme (SCHADENDORF *et al.*, 2015), especialmente em indivíduos de pele clara. No mundo, embora represente apenas 5% de todos os tipos de neoplasias malignas da pele, é o líder de letalidade (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019), correspondendo a 95% dos óbitos decorrentes de câncer de pele (KHAZAEI *et al.*, 2019; VAZQUEZ *et al.*, 2015). A Organização Mundial da Saúde estimou, em 2018, cento e trinta e dois mil novos casos e aproximadamente 50 mil mortes relacionadas ao melanoma por ano (MATTIA *et al.*, 2018).

O melanoma é uma doença que exige atenção. Mesmo que seja considerado uma doença multifatorial, tendo como causa o histórico familiar (LEONARDI *et al.*, 2018), imunodepressão (VAZQUEZ *et al.*, 2015), idade avançada e múltiplos nevus (lesões pigmentadas), o principal fator que contribui para o seu desenvolvimento é a exposição excessiva à luz ultravioleta, que pode induzir danos ao DNA, especialmente em pessoas com menor proteção solar (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020). Esses danos levam a mutações genéticas, alterando as principais moléculas de sinalização intracelular que culminam em desregulação do ciclo celular e que permitem o crescimento, proliferação e invasão desenfreados da massa tumoral (HAMILTON; INFANTE, 2016).

Para a detecção do melanoma, utiliza-se uma série de abordagens que incluem a avaliação das lesões displásicas da pele pela aplicação da regra do ABCDE (assimetria, bordas irregulares, cores não uniformes, diâmetro maior que 6 mm e evolução) (MARGHOOB; LIOPYRIS; JAIMES, 2019), exame dermatoscópico da pele (JONES, O. T. *et al.*, 2019) e mapeamento corporal total. Técnicas moleculares também são usadas para detectar as principais mutações genéticas, como nos genes *BRAF* e *NRAS* (SCHADENDORF *et al.*, 2015). No entanto, o padrão-ouro continua sendo a avaliação histopatológica de cortes de tecidos de biópsia associada à imuno-histoquímica (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020; SHOO; SAGEBIEL; KASHANI-SABET, 2010).

Os tratamentos atuais que geraram conquistas notáveis no cenário terapêutico do melanoma incluem terapia direcionada e imunoterapia. Contudo, os eventos adversos graves e muitas vezes fatais, além da resistência medicamentosa, continuam sendo um grande desafio clínico, levando a quadros de toxicidade e recidiva em poucos meses

após início da terapia (KOZAR *et al.*, 2019; SCHADENDORF *et al.*, 2015). O melanoma notoriamente apresenta alto potencial metastático, e, na maioria dos casos, já se encontra nesse estágio quando a doença é diagnosticada, tornando muito difícil o seu tratamento (CAMPAGNE *et al.*, 2017). Isso justifica a busca por terapias mais eficazes e toleradas, sendo urgente o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (YI *et al.*, 2020).

Diante dessa problemática, os produtos naturais com propriedade medicinal têm sido uma fonte de medicamentos há milênios. O registro mais antigo, datado de 2.600 a.C., foi encontrado na Mesopotâmia, documentando uma lista de aproximadamente mil ervas medicinais para tratamento de uma gama de doenças e enfermidades. Além disso, as moléculas, principalmente de origem vegetal, microbiológica e, recentemente, de organismos marinhos, são utilizados como ponto de partida para sínteses e semissínteses laboratoriais de novos fármacos (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Inúmeros produtos naturais orgânicos são descritos na literatura como possíveis protótipos para desenvolvimento de terapias alternativas aplicadas no tratamento de melanoma, como alcaloides (HAMSA, THAYELE P.; KUTTAN, 2011), polifenóis (VENZA *et al.*, 2018) e terpenos (CHE *et al.*, 2019), por apresentarem efeitos farmacológicos promissores. Assim, os extratos da *Tithonia diversifolia* e seus compostos purificados, especialmente a TC e TF, têm sido descritos como produtos com propriedades antimicrobianas (CHIANG *et al.*, 2004; GOFFIN *et al.*, 2002; ORSOMANDO *et al.*, 2016a; TOLEDO *et al.*, 2014), antifibróticas (RANTI; WAHYUNINGSIH; WIROHADIDJOJO, 2018) e citotóxicas para diversas linhagens de células cancerígenas humanas (CALDERÓN *et al.*, 2006; CHIANG *et al.*, 2004; FOUCHE *et al.*, 2008; GU *et al.*, 2002; KURODA *et al.*, 2007; LEE, MING YI *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2013; PUSPITASARI *et al.*, 2022; WEI *et al.*, 2021), incluindo trabalhos de triagem evidenciando a citotoxicidade em células de melanoma humano (FOUCHE *et al.*, 2008; ORSOMANDO *et al.*, 2016a).

Dessa forma, fazendo parte do esforço mundial na bioprospecção de moléculas naturais bioativas mais eficientes e considerando a limitação das terapias disponíveis para o melanoma, este estudo tem como objetivo complementar os dados preliminares sobre a potência das tagitininas C e F frente ao modelo *in vitro* de células de melanoma humano primário e metastático.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA PELE E DOS MELANÓCITOS

2.1.1 Configuração da pele e a função dos melanócitos

A pele é um órgão excretor e sensorial que comunica o organismo com o ambiente externo através de percepções táteis e térmicas. Por ser um tecido imunologicamente ativo, é também a primeira linha de defesa contra fatores externos (RAHMATI *et al.*, 2020). Compreende cerca de 16% do peso corporal e divide-se em epiderme, derme e hipoderme (**Figura 1**) (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011). Exposta constantemente a fatores externos como raios ultravioletas (UV), variações de temperaturas (ERNFORS, 2010), microrganismos (MACKINTOSH, 2001; PLONKA *et al.*, 2009) e agentes químicos nocivos, a pele íntegra resiste à maioria deles devido à sua camada externa altamente adaptada, a epiderme (PLONKA *et al.*, 2009).

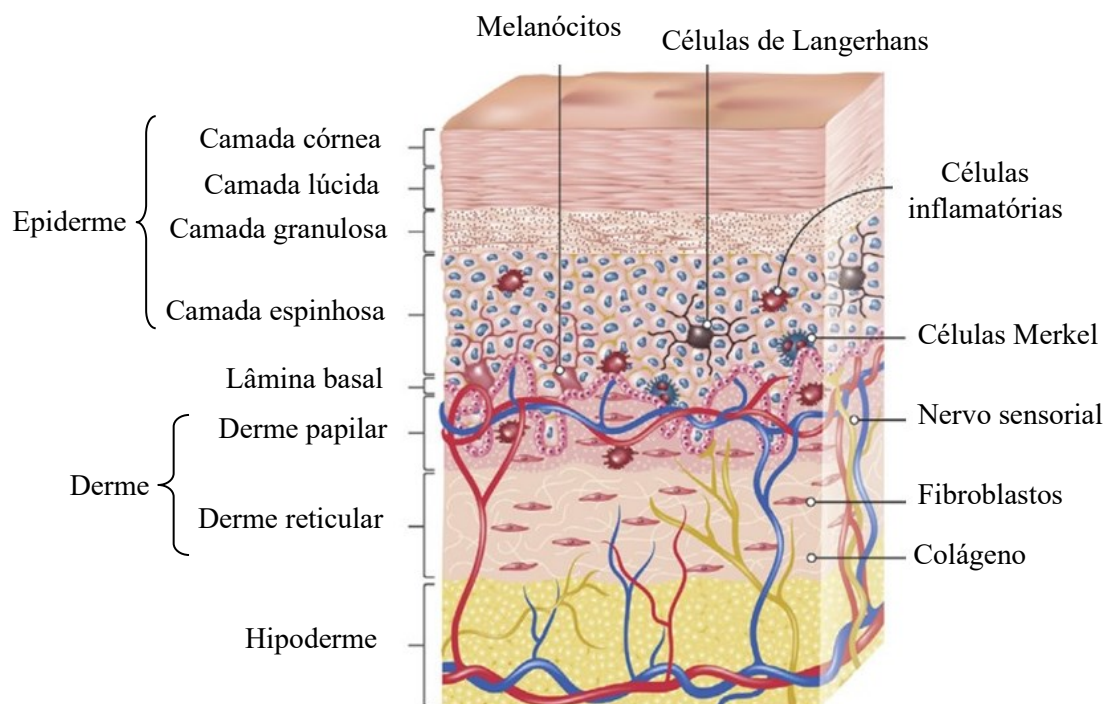


Figura 1. Esquema da estrutura da pele e os tipos celulares que a constituem. Fonte: Adaptado de RAHMATI *et al.* (2020).

A epiderme é constituída basicamente por células basais, células de Langerhans (defesa imunológica), Merkel (função sensorial), melanócitos (coloração da pele) e queratinócitos, e subdividi-se em quatro camadas, a lâmina basal (que separa a derme da epiderme), camadas espinhosa e granulosa (compostas por queratinócitos que sintetizam queratina) e camada lúcida e córnea (queratinócitos mortos compactados) (CICHOREK

et al., 2013; RAHMATI *et al.*, 2020; XUE *et al.*, 2010). A epiderme é capaz de conferir proteção ao ambiente externo devido à ausência de vascularização e pela configuração espacial dos queratinócitos, que se agrupam em uma estrutura de “andaime” conectados por proteínas que, somadas a uma matriz rica em lipídios, proporciona diferentes graus de impermeabilidade frente à certas substâncias, em especial às polares (RAHMATI *et al.*, 2020; VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011).

A derme apresenta uma estrutura complexa, formada por tecido conjuntivo que contém poucas células e rica em colágeno, fibras elásticas e proteoglicanas altamente higroscópicas (RAHMATI *et al.*, 2020), sintetizadas pelos fibroblastos, responsável por fornecer firmeza e elasticidade à pele. A região mais externa da derme, a derme papilar, comunica-se com a epiderme e, por outro lado, a derme reticular (mais interna) é delimitada pela gordura subcutânea (hipoderme) (PLONKA *et al.*, 2009; VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011). Vale ressaltar, ainda, que é na derme onde se encontram vasos sanguíneos e linfáticos, e também as estruturas anexas, tais quais glândulas sebáceas e sudoríparas, a origem das unhas e folículo piloso, compostos por queratina, e cujas funções estão relacionados com a proteção e melhoramento da função tátil do órgão (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011).

Na camada basal da pele, nas lesões pigmentares benignas comuns (nevus) e na região protuberante do folículo piloso, encontram-se os melanócitos, constituindo a maior população de células epidérmicas, após os queratinócitos (ERNFORS, 2010; YAMAGUCHI; BRENNER; HEARING, 2007).

Os melanócitos são células dendríticas e produtoras de melanina, um polímero à base de tirosina que pode ser de dois tipos: a eumelanina (mais escura) e a feomelanina (mais clara), proteínas essas que influenciam a cor da pele (MOLAGODA *et al.*, 2020; YAMAGUCHI; BRENNER; HEARING, 2007). A eumelanina exerce um efeito fotoprotetor maior quando comparada à feomelanina (NGUYEN; FISHER, 2019), atuando como um filtro da radiação UV e também neutralizando radicais livres (GUPTA; SHARMA, 2019). A melanina é sintetizada pelos melanócitos por ação da enzima tirosinase, que converte tirosina em dopaquinona pela via de Raper-Mason (D’MELLO *et al.*, 2016; MACKINTOSH, 2001).

Os melanócitos armazenam o pigmento fotoprotetor em uma organela citoplasmática específica (melanosomo) (ANDO *et al.*, 2012). Após estímulos do hormônio estimulante de *alfa*-melanócitos (α -MSH), a melanina produzida é transportada aos queratonócitos adjacentes para limitar a penetração da radiação UV na

pele (WU, XUFENG; HAMMER, 2014). DUTTA *et. al* (2019) observou que um número menor de dendritos e estrutura dendrítica defeituosa nos melanócitos resulta em hipopigmentação e torna-se um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pele, como o melanoma cutâneo (DUTTA *et al.*, 2019).

2.2 O MELANOMA CUTÂNEO

2.2.1 Epidemiologia e fatores de risco

No Brasil, há uma estimativa de aproximadamente 700 mil casos de câncer por ano no triênio 2023-2025. Como consta nos últimos dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), para cada ano do triênio 2020-22, esperava-se um total de diagnóstico no Brasil de 4.200 casos de melanoma em homens e 4.250 casos em mulheres, com um total de óbitos computados, em 2017, de aproximadamente mil em homens e 800 em mulheres. Na Região Sul do Brasil, o melanoma é mais incidente quando comparado com as demais regiões do país, para ambos os sexos (INCA, 2022).

Dentre os tipos de câncer de pele, o melanoma cutâneo é o tumor com maior malignidade, pior prognóstico e alta taxa de mortalidade devido a seu caráter altamente invasivo, metastático e com rápida evolução, o que evidencia sua relevância clínica e o torna um sério problema de saúde pública (NGUYEN; FISHER, 2019). A taxa de sobrevivência dos pacientes acometidos, em cinco anos, é de apenas 15% (YI *et al.*, 2020).

A Sociedade Americana de Câncer estimou, para o ano de 2020, o diagnóstico de aproximadamente 60 mil novos casos de melanoma em homens e 40 mil em mulheres nos Estados Unidos, e a estimativa de morte pela doença foi maior em homens do que nas mulheres, com 4 e 2 mil óbitos, respectivamente (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). Em 2018, o número total de indivíduos com diagnóstico confirmado de melanoma nos Estados Unidos foi de 178 mil, resultando em 9 mil mortes (MARGHOOB; LIOPYRIS; JAIMES, 2019). Para o ano de 2030, prevê-se que o melanoma se torne o segundo câncer mais comumente diagnosticado entre os homens com mais de 85 anos nos Estados Unidos (HOUTS; LENHARD; VARRICCHIO, 2019) e a projeção de aumento dos casos no Reino Unido está acima de 7% para o período entre 2014 e 2035, consequência da exposição aos raios UV (JONES, O. T. *et al.*, 2019). Esses achados refletem as metástases que ocorrem mais rapidamente quando comparado a qualquer outro tipo de câncer de pele (HEO *et al.*, 2018).

Entre os fatores de risco relacionados com o melanoma, destacam-se o histórico pessoal ou familiar da doença, que aumenta em 50% a sua ocorrência (IBRAHIM; HALUSKA, 2009) e características fenotípicas. Dentre as características fenotípicas, destacam-se a pele e olhos claros, idade avançada, presença de múltiplos nevos (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020), imunossupressão (VAZQUEZ *et al.*, 2015) e principalmente exposição à radiação UV, diretamente associada à luz solar e às câmaras de bronzamento artificial (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020).

A frequência de melanoma também varia com a idade e sexo. A maioria dos casos diagnosticados ocorre após os 45 anos, e o número de casos duplica para ambos os sexos após 40 anos (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020). No entanto, as taxas de incidência do melanoma são mais altas nas mulheres do que nos homens antes dos 50 anos, mas após os 50 anos, as taxas nos homens são quase duas vezes mais altas do que nas mulheres e, aos 80 anos, são o triplo. Além disso, as diferenças comportamentais entre idade e sexo frente à exposição ocupacional, recreativa e uso de bronzamento artificial entre mulheres jovens contribuem para a maior incidência nas mulheres antes dos 50 anos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

O melanoma ocorre principalmente em populações brancas com pele clara, onde as taxas mais altas são relatadas na Austrália e Nova Zelândia (60 casos/100 mil habitantes/ano) e Europa (20 casos/100 mil habitantes/ano), e as taxas mais baixas de incidência ocorrem nas populações pigmentadas, como África e Ásia, correspondendo a 1 caso/100 mil habitantes/ano (SCHADENDORF *et al.*, 2015).

A frequência de melanoma também varia com a presença e o aspecto dos nevos existentes (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020). Os nevos são lesões displásicas da pele que podem ter origem na epiderme, derme ou ambas (CARLI; BIGGERI; GIANNOTTI, 1995). Os nevos comuns são quiescentes, ou seja, benignos, apresentando simetria, pigmentação homogênea, borda lisa e regular, sendo geralmente menores que 6 mm (ROESCH, ALEXANDER *et al.*, 2006). Cerca de 25% dos casos de melanoma partem de um nevo pré-existente (LEONARDI *et al.*, 2018), sejam múltiplos nevos benignos (quantidade acima de 50), conferindo um risco 2 a 4 vezes maior para o melanoma (JONES, O. T. *et al.*, 2019; MARGHOOB; LIOPYRIS; JAIMES, 2019), ou atípicos, cujas lesões pigmentadas são adquiridas e se apresentam de forma assimétrica, com bordas irregulares, pigmentação multicolor e diâmetro superior a 6 mm (ROESCH, ALEXANDER *et al.*, 2006).

Cerca de 80-90% das transformações malignas de melanócitos ocorrem por mutações diretas em oncogenes ou transformação de melanócitos em nevos benignos, que abrigam mutações, principalmente na via da proteína homóloga do oncogene viral de sarcoma murino v-raf B1 (BRAF) (POLLOCK *et al.*, 2003; WU, JULIE *et al.*, 2007). Contudo, essas mutações permanecem “adormecidas” por décadas devido à vigilância imunológica. Estudos apontam que melanomas com *BRAF* mutante são mais propensos em pacientes mais jovens e indivíduos com alta contagem de nevos (CURTIN *et al.*, 2005; HACKER *et al.*, 2010)

Apesar da detecção de mutações BRAF na maioria das lesões pigmentares, elas são insuficientes para conferir o potencial maligno. Dessa forma, seu acúmulo ao longo dos anos e as mutações adicionais cooperantes são cruciais para promoverem o fenótipo maligno de melanócitos (CHANG *et al.*, 2004; KANNENGIESSER *et al.*, 2008). Os raios UV são os principais responsáveis pelo conjunto de mutações adicionais, como ilustrado pela **Figura 2** (LEONARDI *et al.*, 2018).

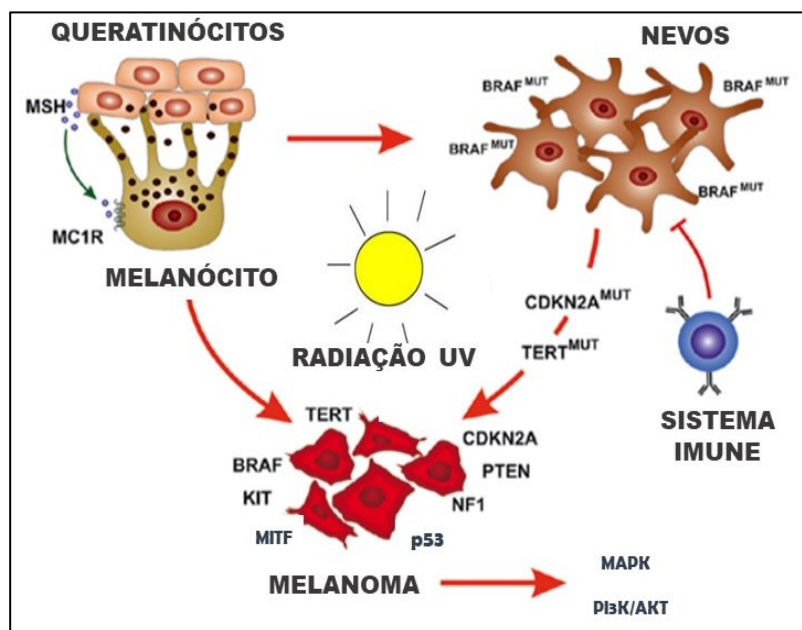


Figura 2. Transformação de melanócitos em melanoma pela radiação UV.
Fonte: Adaptado de LEONARDI *et al.* (2018).

2.2.2 Ciclo celular e morte celular na transformação maligna de melanócitos

A integridade dos melanócitos está diretamente relacionada com a homeostase entre os processos de mitose, correções de erros durante a divisão celular e apoptose (CZAJKOWSKI *et al.*, 2002), uma vez que na ausência de sinalização mitótica, a célula entra em diferenciação, morte programada ou repouso (JOHNSON; WALKER, 1999).

Porém, defeitos nas vias intracelulares, como aqueles induzidos pela radiação UV, podem levar a distúrbios no ciclo celular, culminando em mutações que possibilitam um "escape" do controle mitótico e expressão de fenótipo com proliferação descontrolada, rápida e não programada, resultando em células tumorais (HAMILTON; INFANTE, 2016).

Para entender a transformação maligna de melanócitos é preciso compreender o ciclo celular, que envolve quatro fases: G1 (pré-síntese de DNA), S (síntese de DNA), G2 (pré-divisão) e M (mitose) (JOHNSON; WALKER, 1999), bem como seus pontos de checagem, ou "*checkpoints*" (LI, WEI *et al.*, 2006). A passagem pelas fases do ciclo celular, controlada pelos pontos de checagem, envolve proteínas reguladoras que dificultam que células com material genético danificado progridam na divisão antes dos erros serem reparados ou, quando o reparo é irreversível, a célula possa ser destruída por apoptose (CZAJKOWSKI *et al.*, 2002; FUNK, 2005).

O ciclo celular se inicia por meio de uma cascata de reações intracelulares que estão sujeitas ao controle por duas vias principais e distintas (MALUMBRES; BARBACID, 2009), a via da proteína retinoblastoma (pRb) (SCHADENDORF *et al.*, 2015) e via da proteína 53 (p53) (LI, YUMEI *et al.*, 2020). A cada ciclo celular, as células apresentam potencial para se tornarem tumorais, mas precisam superar esses obstáculos de inibição impostas por essas duas vias reguladoras. A patogenia do melanoma, portanto, leva em consideração alterações nas duas vias, frequentemente associadas a alterações genéticas no gene inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (*CDKN2A*) (YANG, GUANG; RAJADURAI; TSAO, 2005).

As mutações observadas no gene *CDKN2A* levam às alterações de seus produtos proteicos regulatórios, cruciais para a carcinogênese do melanoma, em especial nas proteínas do ponto de checagem da transição G1/S (ponto de restrição), como a p16 (LI, WEI *et al.*, 2006), p14 (OZRETIC *et al.*, 2019) e também alterações no complexo quinase dependente de ciclina (CDK), que constitui a via CDK 4/6/ciclina D/pRb (WANG, HAIZHEN *et al.*, 2017). O ponto de restrição detecta danos genômicos, retardando ou cancelando a divisão celular para impedir a transmissão desses erros às células filhas (LI, WEI *et al.*, 2006).

TUCKER *et al.* (2018), que acompanhou por quarenta anos os fatores de risco familiares para melanoma em 56 famílias, observou que as mutações em *CDKN2A* estavam presentes em 29 famílias e que essas mutações também aumentaram o risco de outros tipos de câncer, como o de pâncreas (TUCKER *et al.*, 2018).

A via da proteína nuclear pRb tem início quando a ciclina D liga-se nas CDK 4 e 6 (HAMILTON; INFANTE, 2016). A ciclina D também é uma proteína nuclear, sintetizada no início da fase G₁ pelo gene *CCND1* (LI, WEI *et al.*, 2006) e geralmente é superexpressa em cânceres humanos (WANG, HAIZHEN *et al.*, 2017), encontrada em superexpressão em 47% dos melanomas primários e em 35% dos metastáticos, estando associada a um prognóstico desfavorável (LI, WEI *et al.*, 2006). O complexo CDK4/6/ciclina D formado é capaz de fosforilar a pRb, liberando a família de fatores transcricionais E2 (E2F) associado e, conseqüentemente, a transcrição de genes promotores chaves para a fase S (SOURA *et al.*, 2016). A superexpressão de pRb hiperfosforilada é uma condição aberrante que leva à atividade livre de E2F, observada em células de melanoma, e garante progressão descontrolada do ciclo celular (LI, WEI *et al.*, 2006).

A perda da expressão da proteína reguladora p16 leva à desregulação da via CDK4/6/ciclina D/pRb (HAMILTON; INFANTE, 2016) presente em cerca de 50% dos melanomas (MOHAMMADPOUR *et al.*, 2019) e contribui para a retomada não programada do ciclo celular. Essa propriedade correlaciona-se com o aumento da espessura do tumor, maior taxa mitótica e maior taxa de proliferação, todos fatores de mau prognóstico em pacientes com melanoma (LI, WEI *et al.*, 2006).

A via oncosupressora da p53, codificada pelo gene *TP53*, também desempenha um papel importante na supressão do melanoma (OZRETIC' *et al.*, 2019), sendo ativada pela proteína regulatória p14 (SOURA *et al.*, 2016), que impede sua ubiquitinação pela MDM2 (JONES, REBECCA *et al.*, 2007) quando danos ao DNA são verificados durante a fase G₁. A ação da p53 ativada é dual, levando à parada do ciclo celular e apoptose. Através de suas proteínas efetoras, como as proteínas da família p21, a via da p53 pode parar o ciclo em G₂/M (LI, WEI *et al.*, 2006). Níveis reduzidos da função da proteína p53, amplamente inativada pelos raios UV no melanoma devido às mutações no gene *TP53* (NAJEM *et al.*, 2017; SCHADENDORF *et al.*, 2015) e a superexpressão de MDM2, contribuem para a agressividade e resistência do melanoma (OZRETIC' *et al.*, 2019).

Ainda, p53 é capaz de modular a expressão gênica relacionada com a indução da via intrínseca da apoptose por meio da ativação de Bax e da caspase-9 (TAYLOR, W R; STARK, 2001), bem como induzir morte celular por necrose (RANJAN; IWAKUMA, 2016). Por outro lado, as vias de sinalização de morte (por exemplo, receptor do fator de necrose tumoral – TNF) modulam a via extrínseca da apoptose (ZHANG, YING *et al.*,

2003). A ativação de caspase-8 pela via extrínseca culmina na ativação da proteína apoptótica Bid, que pode alimentar a via intrínseca da apoptose (MOLONEY; COTTER, 2017). Além disso, a caspase-8 pode bloquear a via de morte celular por necrose (KAISER *et al.*, 2011).

A necrose é uma morte celular não programada, sendo, portanto, um evento accidental desencadeado por uma lesão ou estresse, o que gera falha mitocondrial, depleção total de ATP, inibição da bomba Na^+/K^+ ATPase, tumefação celular e, por fim, ruptura celular com extravasamento de conteúdo citoplasmático (UEDA; FUJITA, 2004). A liberação de conteúdo intracelular é um evento observado apenas na morte por necrose e pode provocar reações inflamatórias (YOO *et al.*, 2019). Inclusive, muitos quimioterápicos, bem como a radioterapia, usam como forma de morte a necrose para a destruição de células tumorais durante o tratamento (MILLER *et al.*, 2006). O quimioterápico cisplatina, por exemplo, induz necrose por ativação do receptor de morte em células de câncer de esôfago (KYSE140 e KYSE410) resistentes à apoptose (XU, YANG *et al.*, 2014). A necrose é iniciada quando, por exemplo, TNF liga-se ao seu receptor de morte, na superfície celular, recrutando uma série de moléculas, como RIPK1 e RIPK3, que promovem a translocação de proteínas até à membrana plasmática para perturbar sua integridade (RANJAN; IWAKUMA, 2016).

A **figura 3** exemplifica as vias de morte celular, bem como o ciclo celular.

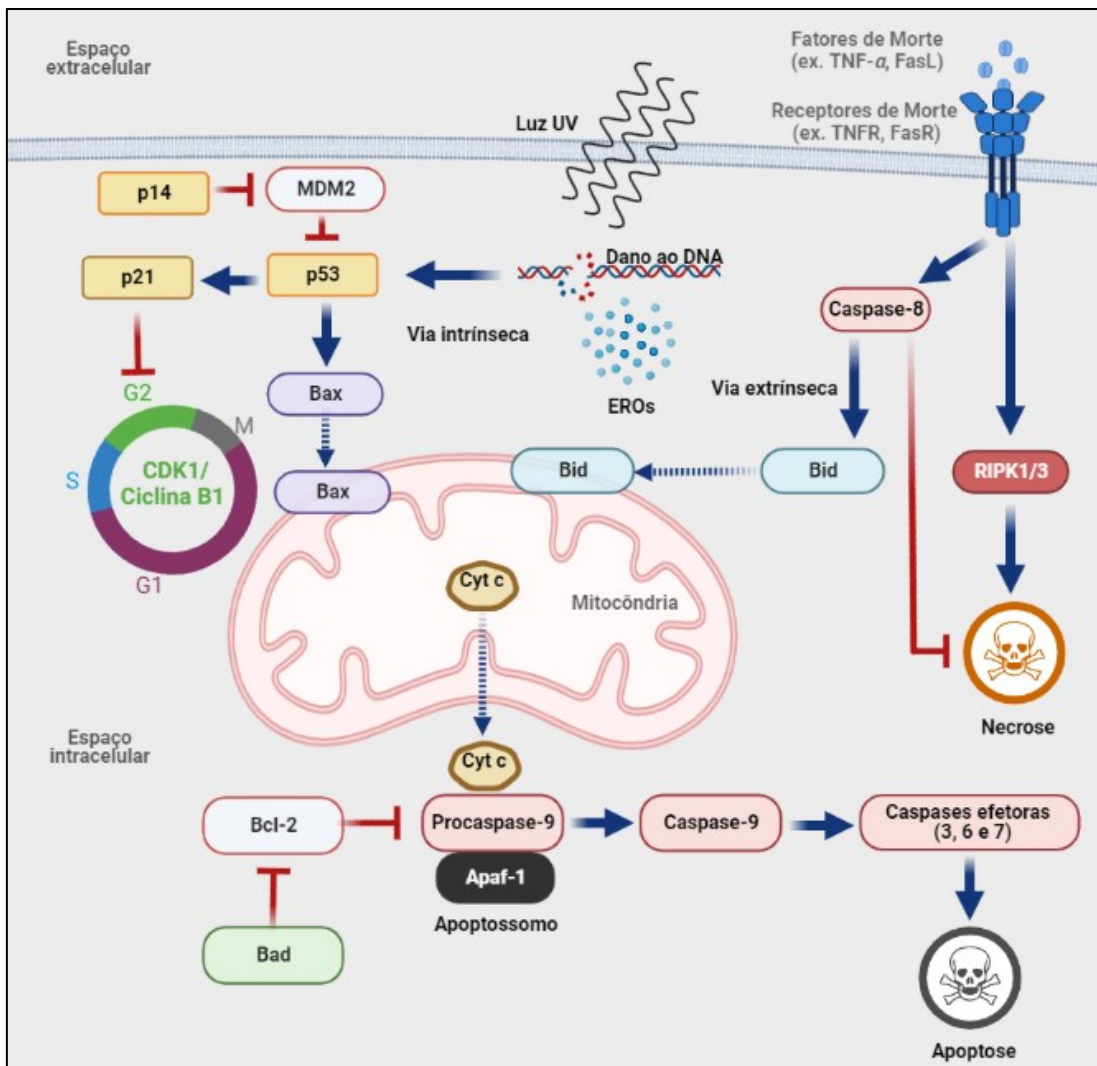


Figura 3. Esquema resumido da via intrínseca e extrínseca da apoptose, necrose e ciclo celular. A via intrínseca da apoptose tem início quando danos ao DNA são detectados, o que ativa a proteína p53. Sua ação dual leva à ativação de Bax que, após uma cascata de reações, ativa as caspases efetoras, e também ativa p21, que inibe o ciclo celular na fase G2/M. A via extrínseca da apoptose é ativada por mensageiros químicos, como citocinas inflamatórias, que estimulam receptores de superfície a ativarem a caspase-8, que cruza com a via intrínseca após ativação de Bid. Ainda, receptores de morte podem ativar necrose em baixas concentrações de caspase-8. Fonte: elaborado pelo próprio autor via [BioRender](#).

2.2.3 Classificação e aspectos clínicos

O melanoma se origina nos melanócitos a partir da pele clinicamente normal (*de novo*) ou com presença prévia de lesões pigmentadas (nevo melanocítico) (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020) e pode ser classificado clinicamente em quatro grupos principais, sendo eles o melanoma de espalhamento superficial, lentiginoso maligno, lentiginoso acral e melanoma nodular (BASTIAN, 2014; MELIS *et al.*, 2017). Os sinais de alerta da doença incluem tamanho, forma e cor de um nevo ou outra lesão na pele, e feridas que não cicatrizam (REZZE; LEON; DUPRAT, 2010; TUCKER *et al.*, 1997). A **figura 4** mostra os principais tipos de melanoma.

O melanoma de espalhamento superficial (**Figura 4A**) é o tipo histopatológico mais prevalente (70% dos casos), acometendo pacientes mais jovens. É marcado pela fase de crescimento radial (RGP) que antecede a fase de crescimento vertical (VGP) invasivo do tumor (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020), em que os melanócitos estão dispostos em ninhos ou unidades solitárias, sendo facilmente identificado pela inspeção visual (SCHADENDORF *et al.*, 2015). O melanoma lentiginoso maligno (**Figura 4B**) representa de 4 a 10% dos melanomas (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020). Sua maior frequência é observada em pacientes idosos com histórico de exposição solar acumulada em áreas como cabeça, pescoço e mãos (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020). O melanoma lentiginoso acral (**Figura 4C**) é o menos incidente de todos os tipos, representando menos de 5% dos casos, sendo mais presente em pacientes pigmentados e sua ocorrência menos associada à radiação UV (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020). O melanoma nodular (**Figura 4D**) representa 30% dos melanomas, com lesões que aumentam rapidamente, geralmente azuis ou pretas, e exibem uma VGP rápida, o que apresenta uma barreira significativa à detecção precoce e contribui para os melanomas profundamente invasivos com prognóstico ruim (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020; SCHADENDORF *et al.*, 2015).

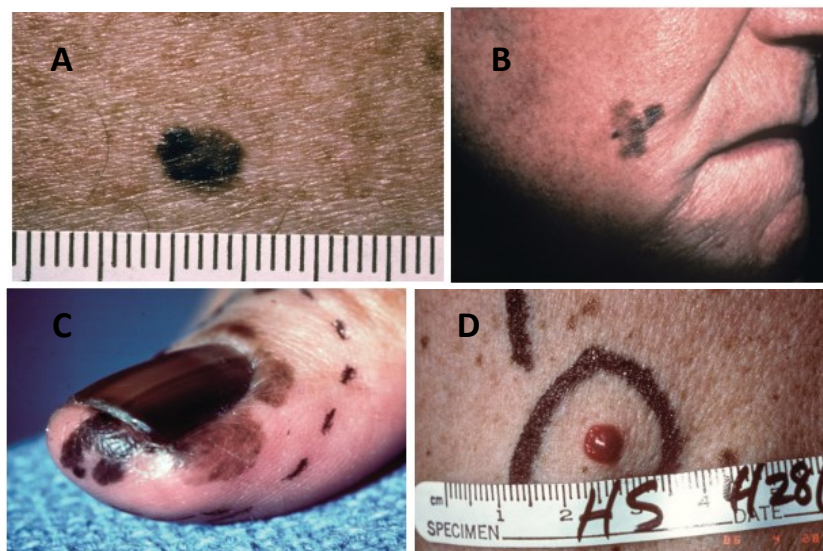


Figura 4. Tipos de melanoma cutâneo. (A) espalhamento superficial; (B) lentiginoso maligno; (C) lentiginoso acral e (D) nodular. Fonte: adaptado de MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER (2020).

A oitava edição do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) integrou diversas características clínicas e histopatológicas do melanoma a fim de contribuir para sua classificação, diagnóstico e guiar o tratamento. O protocolo terapêutico engloba o sistema TNM, que leva em consideração o índice de Breslow (T - espessura tumoral)

(BRESLOW A, 1970), características de invasão de linfonodos (N) e doença metastática (M) (GERSHENWALD *et al.*, 2017; SCOLYER *et al.*, 2020).

2.2.4 Diagnóstico do melanoma

O melanoma pode ser diagnosticado em estágios, inclusive por autoexames corporais, uma vez que grande parte dos casos ocorrem como lesões pigmentadas *de novo* na superfície da pele clinicamente normal (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020; SCHADENDORF *et al.*, 2015). Quando detectado precocemente, diagnosticado com precisão e tratado adequadamente, o melanoma está associado a um excelente prognóstico (SCOLYER *et al.*, 2020).

A regra ABCDE (**Figura 5**) foi criada pela dificuldade em se diferenciar as lesões melanocíticas benignas das lesões de melanoma (FRIEDMAN; RIGEL; KOPF, 1985). As lesões displásicas são fatores de risco para melanoma quando apresentam assimetria em relação à forma (A), bordas irregulares (B), cores não uniformes (C), diâmetro maior que 6 mm (D) e evolução (E), que significa mudança na aparência com o tempo (ROESCH, ALEXANDER *et al.*, 2006). Contudo, a ausência de critérios objetivos e reprodutíveis (SHOO; SAGEBIEL; KASHANI-SABET, 2010) atrelada às lesões malignas assintomáticas, geram dúvidas quanto à suspeita clínica e dificultam o diagnóstico (MARGHOOB; LIOPYRIS; JAIMES, 2019).

O teste dermatoscópico foi introduzido na clínica para otimizar as observações da regra ABCDE. Trata-se de uma técnica não invasiva e de fácil logística por ser portátil, onde se aplica uma lente de aumento e uma fonte de luz que incide sobre a pele, possibilitando uma análise mais detalhada das características morfológicas abaixo da camada córnea (ABBASI *et al.*, 2004; JONES, O. T. *et al.*, 2019; MARGHOOB; LIOPYRIS; JAIMES, 2019).



Figura 5. Aplicação da regra ABCDE na dermatoscopia. Fonte: adaptado de CARR; SMITH; WERNBERG (2020).

O mapeamento corporal total através da técnica dermatoscópica é importante para o monitoramento de lesões pigmentadas *de novo* ou em mudanças. Contudo, existem características dermatoscópicas associadas com o melanoma cutâneo que dependem da experiência do observador (SCHADENDORF *et al.*, 2015).

O padrão ouro para o diagnóstico do melanoma, portanto, é a avaliação histopatológica das biópsias da lesão cutânea, combinadas com o contexto clínico do paciente e com a técnica imuno-histoquímica (SCHADENDORF *et al.*, 2015; SHOO; SAGEBIEL; KASHANI-SABET, 2010). Um dos marcadores imuno-histoquímicos é o Mel-CAM, mas outros marcadores, como enzimáticos (tirosinaquinases) e genéticos (*CDNK2A* e *TP53*) também podem ser investigados (FIGUEIREDO *et al.*, 2003).

2.2.5 Melanoma metastático

O melanoma possui alta capacidade de formar metástases (CAMPAGNE *et al.*, 2017), afetando praticamente qualquer órgão do corpo (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020), e pacientes diagnosticados com a doença metastática apresentam um prognóstico ruim, com uma sobrevida de menos de 15% em 5 anos (CHENG, YABIN; ZHANG; LI, 2013; VOLPE *et al.*, 2017).

A capacidade de um tumor se tornar metastático depende da sobrevivência das células disseminadoras, do estado imunológico do indivíduo, da reação frente ao estresse exógeno, do microambiente tumoral e dos fatores genéticos e fenotípicos, como presença de proteínas antiapoptóticas (SCHADENDORF *et al.*, 2015). Os melanomas

com *BRAF* do tipo selvagem apresentam maior tendência de metástase sistêmicas, enquanto *BRAF* mutado para os linfonodos regionais (MELIS *et al.*, 2017).

Para que o melanoma possa adquirir capacidade metastática, como mostra a **figura 6**, os melanócitos malignos devem apresentar VGP, onde adquirem a capacidade de invadir a membrana basal, entrando em outros tecidos, que precisa ser cuidadosamente identificada por meio de microscopia óptica. Em contrapartida, os melanomas com RGP, ou seja, proliferação horizontal na epiderme, apresentam poder microinvasivo e, assim, carecem de capacidade metastática, podendo ser curados por simples excisão local completa, na maioria dos casos (ALQATHAMA; PRIETO, 2015; CROWSON; MAGRO; MIHM, 2006; ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008). Após a remoção cirúrgica completa do tumor primário, no entanto, aproximadamente 4% a 6% dos pacientes apresentam metástases locorregionais, podendo a doença apresentar recidivas (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020).

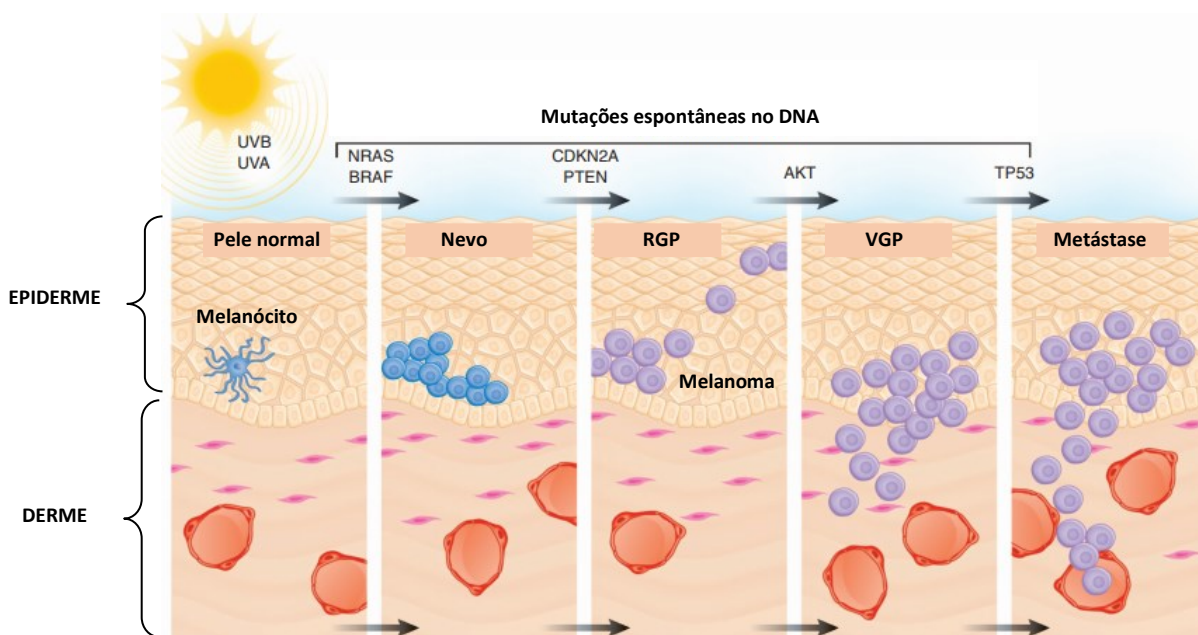


Figura 6. Fases e alterações moleculares associadas ao início e progressão do melanoma metastático. Legenda: fase de crescimento radial (RGP); fase de crescimento vertical (VGP). Fonte: adaptado de ZAIDI; DAY; MERLINO (2008).

Invasões pulmonares são o tipo mais comum de metástase decorrentes do melanoma, compreendendo 15% a 40% da doença metastática, seguido pelas metástases na pele, tecido subcutâneo, músculo e linfonodos distantes, representando aproximadamente 20%. O melanoma pode se espalhar também para o fígado (15 a 20%) e para outros locais mais incomuns, como pâncreas, ossos, adrenais e baço. Para o trato gastrointestinal, embora acometa apenas 2% a 4% dos casos, aproximadamente 50% dos pacientes que morrem de melanoma metastático têm envolvimento com esse tipo de

metástase (ENOMOTO *et al.*, 2020). A frequência das metástases aumenta com o aumento da espessura do tumor (GERSHENWALD; SCOLYER, 2018). No caso dos linfonodos regionais clinicamente ocultos, o risco de metástase é de aproximadamente 50% com melanomas ulcerados cuja espessura esteja acima de 4 mm (SCHADENDORF *et al.*, 2015).

Os biomarcadores para o melanoma metastático incluem alteração genética, proteína ou imagem e são importantes para auxiliar o diagnóstico e identificar o seu grau de malignidade, além de contribuir para a escolha das melhores terapias e monitoramento da resposta do paciente. Por exemplo, no melanoma metastático, os níveis de LDH é um indicador de invasão hepática recorrente em 12,5% dos pacientes, cujos níveis elevados indicam pior prognóstico, com menor sobrevida e baixa resposta à terapia (BUCHBINDER; FLAHERTY, 2016). As mutações nos genes *TP53* e na fosfatase PTEN, por exemplo, também estão associadas a um fenótipo mais agressivo de melanoma (DANIOTTI *et al.*, 2004).

2.2.6 Principais terapias preconizadas para o melanoma

Como no câncer o diagnóstico em estágios tardios e a terapia não responsiva são os principais contribuintes para a mortalidade, o cenário científico atual é desafiado para o desenvolvimento e descobertas de novos fármacos que sejam mais específicos e seletivos para o complexo ambiente dinâmico da massa tumoral e menos tóxicos para as células sadias. Dessa forma, a descoberta de agentes anticâncer mais eficazes contra o melanoma é uma meta urgente do setor farmacêutico (SHARIFI-RAD *et al.*, 2019).

2.2.6.1 Cirurgia e radioterapia

A excisão cirúrgica completa do tumor primário continua sendo o tratamento padrão ouro para melanoma primário confinado à pele com metástases em linfonodos sentinelas e sistêmicas clinicamente negativas (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020). A retirada completa do tumor ocorre em conjunto com a remoção de uma ampla e profunda margem de segurança da pele, aparentemente saudável, ao redor da lesão (1 a 2 cm, a depender da espessura do tumor) e até atingir o nível subcutâneo, a fim de diminuir o risco de recorrências locais devido a possíveis metástases satélites. Embora o risco seja baixo, quando presentes, as recorrências podem indicar doença sistêmica e a excisão cirúrgica dessas metástases isoladas

promove sobrevida dos pacientes, em 5 anos, de apenas 5-20% (KOZAR *et al.*, 2019; SCHADENDORF *et al.*, 2015; SWETTER *et al.*, 2019).

A radioterapia é mais indicada para o tratamento paliativo de doença metastática sintomática nos ossos, em outros pontos da pele, tecido subcutâneo e medula espinhal (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020); também para os casos de metástases cerebrais, sangramentos e obstrução do trato gastrointestinal decorrentes das metástases e qualquer outra metástase que resulte problemas locais (SCHADENDORF *et al.*, 2015). Além disso, quando a excisão cirúrgica completa da lesão não é possível, a radioterapia é indicada. A radioterapia é capaz de fornecer controle local, no entanto, sem nenhum efeito no desenvolvimento de metástases à distância, além das células normais também serem afetadas por essa radiação. Contudo, a radioterapia pode ser desfavorável, uma vez que a radiação pode aumentar a quantidade de microvasos sanguíneos dentro do tumor e, dessa forma, aumentar a invasão celular (PRATHEESHKUMAR; KUTTAN, 2011b)

Quanto ao melanoma metastático, ao contrário da doença localizada, a excisão cirúrgica das metástases isoladas, quando possível, não é a melhor opção de tratamento, uma vez que resulta em baixa chance de cura (SCHADENDORF *et al.*, 2015). Diversas abordagens terapêuticas adjuvantes e individualizadas devem ser incluídas na prática clínica quando diagnosticada doença metastática, como a terapia direcionada a determinado alvo molecular (como BRAF, por exemplo), imunoterapia e quimioterapia (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020).

A **Tabela 1** resume as principais terapias aprovadas para o tratamento do melanoma metastático discutidos nessa sessão.

Tabela 1. Terapias medicamentosas aprovadas pelo FDA para o melanoma metastático.

	BRAF mutado	BRAF tipo selvagem	
1ª linha de tratamento	Vemurafenibe	-	Terapia direcionada
	Dabrafenibe	-	
	Trametinibe	-	
	Dabrafenibe + Trametinibe	-	
	Vemurafenibe + Cobimetinibe	-	
	Cobimetinibe + Binimetinibe	-	
	Nivolumabe	Nivolumabe	Imunoterapia
	Pembrolizumabe	Pembrolizumabe	
	Ipilimumabe	Ipilimumabe	
	Nivolumabe + Ipilimumabe	Nivolumabe + Ipilimumabe	
2ª linha de tratamento	Dacarbazina	Dacarbazina	Quimioterapia
	Temozolomida	Temozolomida	

Fonte: adaptado de KOZAR *et al.* (2019).

2.2.6.2 Quimioterapia

A quimioterapia foi a terapia convencional mais comumente utilizada para tratar melanoma metastático antes do desenvolvimento da terapia direcionada e imunoterapia (CHEN, JIEZHONG *et al.*, 2013). Os medicamentos quimioterápicos incluem o agente alquilante dacarbazina (DTIC), o único agente aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), em 1975. A DTIC era a terapia padrão para o melanoma metastático. O princípio ativo exerce atividade antitumoral principalmente por alquilação do DNA, que causa interrupção do crescimento e, conseqüentemente, morte celular. O tratamento com DTIC, no entanto, não é eficaz para a maioria dos pacientes (85-90%) (EGGERMONT; KIRKWOOD, 2004). Dessa forma, novos quimioterápicos foram desenvolvidos, como a temozolomida, um análogo oral da DTIC, mas com eficácia inferior à ela; os agentes inibidores dos microtúbulos mitóticos (vimblastina e paclitaxel); cisplatina e carboplatina e, por fim, os agentes alquilantes carmustina, lomustina e fotemustina (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009).

Os agentes quimioterápicos, seja em monoterapia ou em terapia combinada (cisplatina, vimblastina e dacarbazina) (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009) são utilizados comumente em ensaios clínicos ou após o insucesso da imunoterapia e terapia direcionada (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020), ou ainda após excisões cirúrgicas (HONORS; KRUGER; ABRAHAMSE, 2018). Os regimes terapêuticos conseguem atingir taxas de sobrevida muito baixas, em torno de 8 meses para pacientes com melanoma em estágio avançado (PLITZKO; KAWEEESA; LOESGEN, 2017). Isso se deve a uma série de efeitos tóxicos associados e a baixa eficácia, como a falta de especificidade em destruir apenas células tumorais, sendo tóxicas também para as células saudáveis (CHEN, JIEZHONG *et al.*, 2013). Além disso, uma das principais desvantagens da quimioterapia é a supressão do sistema imunológico (EHRKE, 2003).

2.2.6.3 Terapia direcionada

As terapias direcionadas se tornaram uma importante estratégia terapêutica para o tratamento da doença com mutação *BRAF* (ZHAO, XIANDA; SUBRAMANIAN, 2017). Como o processo etiológico do tumor é facilitado por algumas vias de sinalização, as moléculas terapêuticas projetadas são capazes de bloquear proteínas aberrantes e controlar o crescimento das células malignas (VOLPE *et al.*, 2017), sendo as vias fisiológicas da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), os principais alvos terapêuticos para os agentes antitumorais da terapia direcionada (MEIER *et al.*, 2005). A **figura 7** mostra, de forma simplificada, as principais vias de sinalização intracelular alvos da terapia direcionada no melanoma.

No entanto, embora os agentes utilizados mostrem melhora na sobrevida dos pacientes, cada terapia se associa a uma série de limitações que incluem resposta terapêutica de pouca duração, efeitos adversos e resistência medicamentosa, com progressão da doença no sexto a sétimo mês de tratamento (CHEN, JIEZHONG *et al.*, 2013; MELIS *et al.*, 2017). Em adição, a terapia direcionada exige também a elucidação e melhor entendimento dos alvos moleculares que sejam satisfatórios em desempenhar funções-chave no crescimento e sobrevivência das células cancerígenas (SHARIFI-RAD *et al.*, 2019).

A resistência medicamentosa se dá através de mecanismos adquiridos e intrínsecos. Na resistência intrínseca, após a administração de um inibidor de BRAF, ocorre reajustes nas vias de sinalização para que a célula continue se proliferando e garantindo sua sobrevivência, enquanto na resistência adquirida, as células malignas reativam as vias de sinalização através da amplificação de BRAF, superexpressão de fatores de transcrição e mutações nas moléculas à jusante da via MAPK (MELIS et al., 2017). Pacientes que respondem aos tratamentos com vemurafenibe podem apresentar recaída nas primeiras semanas após o uso (BOLLAG et al., 2012).

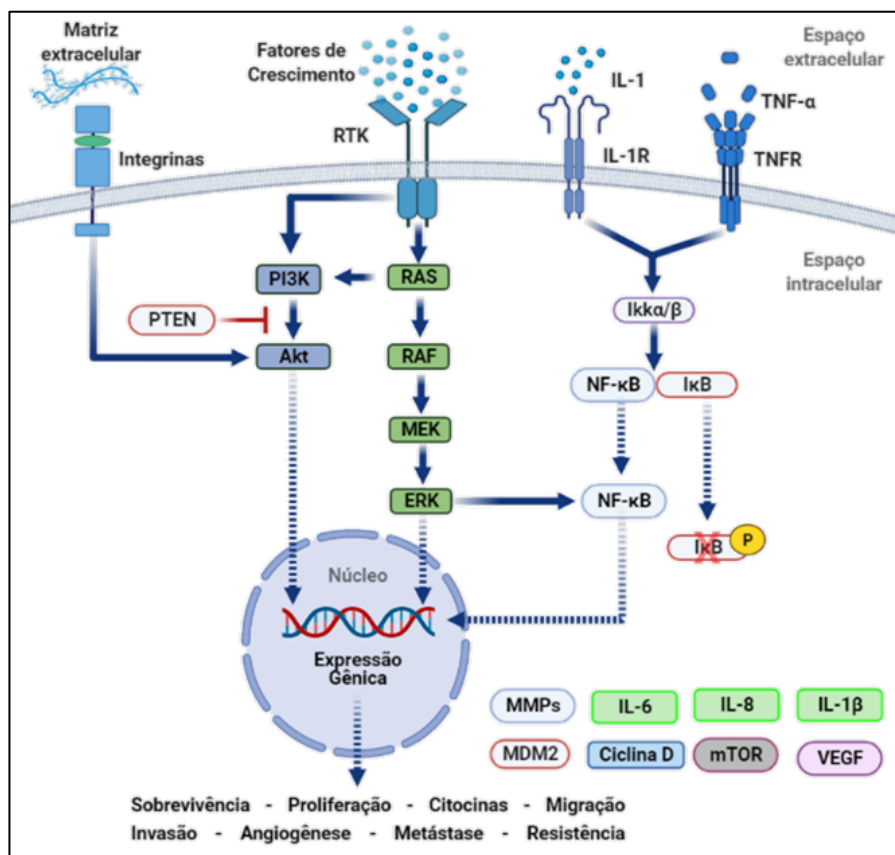


Figura 7. Principais vias de sinalização intracelular alvos da terapia direcionada antitumoral.

Fonte: elaborado pelo próprio autor via [BioRender](#).

Mutações com perda da função PTEN regulam positivamente a via PI3K e também são responsáveis por impulsionarem a proliferação das células de melanoma. Uma estratégia para contornar essa situação é fazer uso de terapia combinada visando bloquear a MAPK e a via PI3K ao mesmo tempo, com aplicação de regimes que incluem medicamentos direcionados ao mTOR, em associação com inibidores de BRAF e MEK (CHEN, JIEZHONG *et al.*, 2013; CHENG, LIANG *et al.*, 2017).

Mais de 90% dos pacientes em uso de monoterapia direcionada à inibição de BRAF desenvolvem complicações dermatológicas (SWETTER *et al.*, 2019), efeitos

hepáticos deletérios, artralgia, alterações da função gastrointestinal, entre outros (MELIS *et al.*, 2017; VOLPE *et al.*, 2017). O risco de desenvolver outros tipos de câncer de pele também está presente, sendo detectado em 25% dos pacientes em tratamento (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020) e geralmente aparecem nos primeiros meses de terapia. Além disso, o desenvolvimento de melanomas primários também são observados em 2 a 5% dos pacientes submetidos à terapia com inibidores de BRAF (SCHADENDORF *et al.*, 2015).

O uso de inibidores da MEK em terapia única, embora também reduzam a proliferação celular no melanoma com BRAF mutado, apresentam ampla gama de efeitos adversos, além de baixa eficácia terapêutica ao se comparar com o tratamento com os inibidores da BRAF em monoterapia (DEVITT *et al.*, 2011; SCHADENDORF *et al.*, 2015). Os efeitos mais comumente observados com o uso de agentes anti-MEK incluem as toxicidades oftálmicas, gastrointestinais, cardíacos e complicações dermatológicas (MELIS *et al.*, 2017; VOLPE *et al.*, 2017).

A restauração dos pontos de checagem do ciclo celular desativado pelas alterações, principalmente na via da CDK4/6/ciclina D/pRb e nas proteínas inibitórias p16 e p14, induzidas pela radiação UV, surge como uma importante estratégia de terapia direcionada no tratamento do melanoma. O uso de imunobiológicos são utilizados para a restauração desses pontos de checagem (HAMILTON; INFANTE, 2016; SCHADENDORF *et al.*, 2015).

No Brasil, a terapia direcionada, quando comparada à administração de quimioterapia com DTIC em pacientes com melanoma avançado e BRAF mutado, implica em aumento expressivo de gastos, e esse impacto orçamentário desfavorece sua incorporação no sistema. Sob a perspectiva do Sistema Único de Saúde (SUS), o uso de terapia combinada representa 0,70 a 1,53% de todos os gastos anuais com medicamentos, sendo a terapia combinada vemurafenibe + cobimetinibe a mais dispendiosa, com um custo anual estimado, de 2018 a 2020, de R\$ 393.291,81/paciente contra um custo anual de R\$ 375.631,20/paciente para a terapia combinada dabrafenibe + trametinibe. Para a monoterapia, o custo chega a R\$ 257.673,60/paciente com verumafenibe e R\$ 238.528,80/paciente para dabrafenibe, ao passo que a quimioterapia (dacarbazina) representa R\$ 13.212,60/paciente (CORRÊA *et al.*, 2019).

2.2.6.4 Imunoterapia

As células malignas não são as únicas que compõem o complexo ambiente do tumor. Componentes não celulares e células estromais também participam de sua estrutura biológica, como os linfócitos T infiltradores de tumores. A perda da imunidade mediada por células T citotóxicas ou Th4 favorecem um rápido crescimento tumoral (KOEDEL et al., 2007). Muitos produtos naturais com efeito imunomodulador já foram descritos para o melanoma (MANU, K. A.; KUTTAN, 2007) (THEJASS; KUTTAN, 2007) (MANU, K. A.; KUTTAN, 2008). Compostos capazes de modular linfócitos TCD8⁺ infiltradores de tumores, bem como outros localizados no tecido peritumoral, correlacionam-se com um prognóstico favorável em pacientes acometidos por melanoma (AZIMI et al., 2012; ROSSI et al., 2015). Os linfócitos TCD8⁺ reconhecem antígenos tumorais, produzem interferon- γ e induzem parada do ciclo celular, morte, atividade antitumoral de macrófagos no microambiente tumoral e inibição da angiogênese (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; SMYTH; DUNN; SCHREIBER, 2006).

Ainda, para tornar imunossupressor o microambiente tumoral, as células de melanoma também são capazes de (1) “educar” fibroblastos e células de Langerhans para adquirirem funções protumorigênicas, que passam a produzir substâncias com o intuito de favorecer o nicho tumoral, como fatores angiogênicos e de crescimento e (2) produzir citocinas derivadas de tumores, como o fator de crescimento transformador *beta* (TGF- β), capazes de mobilizar células imunossupressoras que se infiltram e proliferam no nicho tumoral para anular ataques imunológicos (SCHADENDORF *et al.*, 2015). Esse bloqueio se dá principalmente por ativação da proteína 1 de morte celular programada (PD-1) e antígeno 4 citotóxico associado a linfócitos T (CTLA-4), responsáveis por anular a atividade de células T (MELIS *et al.*, 2017), o que explica como o melanoma é capaz de contornar, de forma bem sucedida, a imunidade antitumoral e desenvolver tolerância imunológica (GRIEWANK, 2016; VOLPE *et al.*, 2017).

Com a compreensão da imunologia do câncer, uma importante estratégia terapêutica é a imunoterapia (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020), cujo papel central não está mais direcionada para as células malignas, mas sim reservada para os linfócitos T citotóxicos, inativados no tecido tumoral. Com a imunoterapia, a resposta imune é aprimorada no microambiente imunossupressor do

tumor para controlar a proliferação celular maligna (MELIS *et al.*, 2017), além de suprir as falhas observadas tanto na terapia direcionada quanto na quimioterapia (VOLPE *et al.*, 2017).

A imunoterapia utiliza anticorpos monoclonais, os “mAbs”, como medicamentos biológicos visando bloquear os pontos de verificação imune expressos na superfície de linfócitos T como uma de suas estratégias terapêuticas (ZHAO, XIANDA; SUBRAMANIAN, 2017). A aprovação desses inibidores revolucionou a terapia sistêmica da doença metastática (ROMANSKI *et al.*, 2020).

Contudo, as reações adversas imunomediadas, no entanto, estão presentes e ocorrem devido à ativação e proliferação dos linfócitos T (MITCHELL; KARAKOUSIS; SCHUCHTER, 2020). Aproximadamente 40% dos pacientes desenvolvem reações inespecíficas (SWETTER *et al.*, 2019). As reações imunes, que podem se estender até mesmo após a descontinuação do tratamento, podem ser graves, como hepatites, endocrinopatias, neuropatias e doenças autoimunes, e até fulminantes, e geralmente ocorrem após a primeira administração. Tais condições exigem monitoramento clínico e intervenções precoces com farmacologia profilática a fim de amenizar os efeitos tóxicos e trazer melhoras na qualidade de vida dos pacientes com melanoma (VOLPE *et al.*, 2017).

Associações com inibidores de BRAF e imunoterapia parecem promissoras (CHENG, LIANG *et al.*, 2017), visto que a ativação constitutiva da via MAPK promove a supressão de antígenos tumorais favorecendo, assim, o escape do melanoma do sistema imune. Os inibidores de BRAF ou MEK são capazes de aumentar a expressão desses antígenos para o reconhecimento imunológico (CHEN, JIEZHONG *et al.*, 2013; HU-LIESKOVAN *et al.*, 2014).

Apesar da cura potencial inerente à cada modalidade de tratamento do melanoma, a terapêutica ainda continua falha em trazer resultados significativamente benéficos na sobrevivência dos pacientes (SCHADENDORF *et al.*, 2015). Em adição, ao evoluir para doença metastática, o melanoma se torna muito difícil de tratar, justificando a busca crescente de novas terapias mais eficientes e toleradas (MIRZAEI *et al.*, 2016).

2.3 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS NO CÂNCER

Os compostos naturais podem atuar como agentes quimio-preventivos e como fatores que aumentam a eficácia terapêutica dos medicamentos existentes, superando a resistência das células cancerígenas aos medicamentos, que é o principal fator

determinante do insucesso na quimioterapia convencional (CATALANI et al., 2016). Por exemplo, estudos já demonstraram benefícios com o uso do alcaloide colchicina para tratar os efeitos adversos da terapia direcionada com dabrafenibe e tramatinibe no melanoma metastático (VERA et al., 2019).

Em particular, as plantas apresentam potencial bioativo para diversos sistemas terapêuticos, sendo os mais conhecidos a chinesa, greco-romana, egípcia e o sistema ayurvédico. O registro mais antigo foi encontrado na Mesopotâmia, datado de cerca de 2.600 a.C., documentando uma lista de aproximadamente mil ervas medicinais usados até os dias atuais para tratar diversos sintomas. Além dos produtos naturais atuarem como ponto de partida para a síntese de diversas substâncias melhoradas laboratorialmente. É o caso, por exemplo, da papaverina, extraída da *Papaver somniferum* que, a partir de estudos etnofarmacológicos, foi usada como molde para a síntese do antiarrítmico verapamil (CRAGG; NEWMAN, 2013).

O uso de medicamentos tradicionais derivados de ervas medicinais estiveram presentes diretamente como cuidados primários de saúde em aproximadamente 65% da população mundial (FARNSWORTH et al., 1985). Entre os anos de 1981 e 2014, metade de todos os produtos farmacêuticos desenvolvidos foram baseados em moléculas de origem natural ou seus derivados (PLITZKO; KAWEEESA; LOESGEN, 2017) e mais de 60% de todos os fármacos sintéticos são derivados de fontes naturais (SHARIFI-RAD et al., 2019).

Esses produtos são responsáveis pela produção de pelo menos 75% de todos os medicamentos antitumorais comercializados, evidenciando sua força no campo das pesquisas científicas (YANG, SHUPING et al., 2018). Sendo assim, muitos produtos derivados de plantas são candidatos em potencial para novas terapias para tratamento do câncer, principalmente do melanoma em estágios mais avançados (KIM, HAK SU et al., 2012).

Apesar da existência de diversas modalidades terapêuticas aprovadas para o melanoma, elas ainda apresentam uma série de limitações como efeitos adversos graves, alta toxicidade e resistência medicamentosa, que geralmente as tornam ineficazes (KIM, SUNG HYUN et al., 2019). Diante dessa dificuldade de se encontrar e estabelecer protocolos terapêuticos mais eficazes e livres de eventos adversos graves, existe uma urgente necessidade de se desenvolver novos fármacos (YI et al., 2020). Além disso, opções de tratamento com base em produtos naturais poderiam ser usadas em terapias

combinadas para superar a toxicidade e resistência observadas durante o tratamento do melanoma (PLITZKO; KAWEESA; LOESGEN, 2017).

Inúmeros produtos naturais orgânicos, a maioria derivado de plantas, são descritos nos estudos como possíveis terapias alternativas para melanoma por apresentarem efeitos farmacológicos promissores. Por exemplo, muitos alcaloides apresentam atividade pró-apoptótica e antimetastática, como a harmina (B16F10) (HAMSA, THAYELE P.; KUTTAN, 2011) e a α -solanina (A375 e A2058) (LU, MING KUN *et al.*, 2010), respectivamente. A berberina, outro alcaloide natural, demonstrou capacidade de inibir metástases pulmonares das células de melanoma B16F10 em modelo *in vivo* de roedores e a migração em modelos *in vitro* com células humanas A375 (KIM, HAK SU *et al.*, 2012).

Além dos alcaloides, os polifenóis também são uma classe de metabólitos secundários com efeitos promissores, como o composto encontrado na *Genista tinctoria*, a genisteína, que interfere no desenvolvimento e crescimento de um painel de células de melanoma (G361, WM115, OCM-1, CM-3, 92.1, GR-M, MMel-1, MMel-2) por inibição da ação da prostaglantina E2 (VENZA *et al.*, 2018); as antocianinas, que são capazes de inibir o crescimento do tumor, a metástase pulmonar e também a angiogênese por interferirem nas vias MAPK e PI3K e em seus efetores em células de melanoma de roedores B16-F1 (SU, CHING CHUAN *et al.*, 2018); e a capsaicina, largamente utilizada na culinária, capaz de ativar mecanismos autofágicos e proteínas pró-apoptóticas em células de melanoma humano A375 (CHU; LI; WANG, 2019) e de roedores B16F10 (JUN *et al.*, 2007).

A apigenina é outro agente polifenólico descrito com efeito antimetastático no melanoma (A375, G361 e B16F10) (CAO *et al.*, 2016). Um estudo demonstrou sua capacidade de induzir parada do ciclo celular e apoptose, além de modular o sistema imunológico tornando as células malignas (A375, A2058 e RPMI-7951) mais sensíveis à morte mediada por células T (XU, LU *et al.*, 2018). A galangina é um flavonoide presente em altas concentrações na *Alpinia officinarum* que apresenta atividade no metabolismo mitocondrial das células de melanoma (B16F10), sendo capaz de induzir apoptose (ZHANG, WENJING *et al.*, 2013). A quercetina, além de sua ação quimioprotetora, antioxidante e antiangiogênica, é outro agente quimioterapêutico em potencial, que interfere na bioenergética mitocondrial de células de melanoma de roedor (B164A5) (STURZA *et al.*, 2018), aumentando a expressão de Bax e diminuindo a

expressão de fatores antiapoptóticos Bcl-2 em células de melanoma humano (A375SM e A375P) (KIM, SUNG HYUN *et al.*, 2019).

O resveratrol, presente principalmente em legumes e uvas, apresenta atividade antitumoral por regular o ciclo celular, crescimento e apoptose no melanoma (MV3 e A375), sendo observado modulação positiva da proteína p53 (HSIEH *et al.*, 2005; ZHAO, HAILONG *et al.*, 2018), aumento de Bax e diminuição de Bcl-2, além de aumentar os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo das células malignas (A375SM) (HEO *et al.*, 2018).

Já os terpenos, principalmente as lactonas sesquiterpênicas, também são descritas na literatura científica como potenciais agentes antimelanoma (LESIK et al., 2010). O partenolídeo demonstrou efeito promissor no combate à quimiorresistência de células de melanoma (A375 e linhagens primárias) previamente tratadas com DTIC. Ele foi capaz de diminuir a expressão de moléculas angiogênicas induzidas pelo quimioterápico (KOPROWSKA *et al.*, 2013). Outro estudo demonstrou que o partenolídeo diminui a viabilidade das células de melanoma (C918 e SP6.5) e induzem parada do ciclo celular e apoptose, sem afetar as células normais (CHE *et al.*, 2019). Esse composto também pode ser usado na profilaxia pós-cirúrgica de melanoma primário e para prevenção de metástases (A375, 1205Lu e WM793) (CZYZ *et al.*, 2010a).

A artemisinina é conhecida por ser um agente antimalárico extraído das folhas da planta *Artemisia annua*, descoberta em 1971 através de estudos etnofarmacológicos (CRAGG; NEWMAN, 2013). Esse composto é capaz de inibir o crescimento e afetar a viabilidade das células de melanoma (A375P e A375M). Além disso, consegue reduzir os níveis de proteínas responsáveis pela capacidade migratória das células (BUOMMINO *et al.*, 2008).

Como observado, a caracterização das inúmeras atividades biológicas significativas dos produtos naturais movimenta a bioprospecção de novas moléculas bioativas que atuam como agentes terapêuticos antitumorais, seja de forma isolada ou em combinação com medicamentos convencionais (SHARIFI-RAD *et al.*, 2019).

2.4 BIOATIVIDADE DA *Tithonia diversifolia* E SEUS COMPOSTOS TC E TF

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray (**figura 8**) é uma planta herbácea que pode ser anual ou perene a depender de sua localização geográfica. É uma planta nativa da América Central e das Índias Orientais, comumente encontrada em campos, terrenos

baldios e estradas, mas que se estendeu por vários países como espécie introduzida na África, Austrália, América do Norte e Brasil. Pertencente à família Asteraceae, o arbusto é conhecido popularmente como margaridão, cravo-de-defunto, arnica mexicana, entre outros, sendo muito apreciado no paisagismo e para fins ornamentais devido às suas exuberantes flores amarelas (GARCÍA; DELGADO; JOSEPH, 2006; LEE, MING YI *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 1997; WANZALA *et al.*, 2016).

Seu uso ultrapassa a decoração e atinge a agricultura pelo seu potente efeito fertilizante e inseticida, e também a medicina, uma vez que suas partes aéreas, especialmente as folhas em decocto ou infundidas, têm demonstrado propriedades etnofarmacológicas interessantes no tratamento da febre, hematomas, dor menstrual, distúrbios hepáticos e gastrointestinais, como constipação, dores de estômago e indigestão (SUT *et al.*, 2018; WANZALA *et al.*, 2016). Também apresenta efeitos metabólicos hipoglicemiantes, cicatrizantes (LEE, MING YI *et al.*, 2011), anti-inflamatórios (CHAGAS-PAULA, DANIELA APARECIDA *et al.*, 2011; OWOYELE *et al.*, 2004) e analgésicos (OWOYELE *et al.*, 2004). Dentre as famílias vegetais, a Asteraceae é a que apresenta maior atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais, incluindo o melanoma (FOUCHE *et al.*, 2008).



Figura 8. Imagem das partes aéreas da *Tithonia diversifolia*. Fonte: fotografada por CHAGAS-PAULA, DA.

Extratos alcoólicos das partes aéreas da *T. diversifolia* apresentaram propriedades antiplasmódicas (GOFFIN *et al.*, 2002) e extratos etanólicos das folhas mostrou citotóxica para células de câncer de pulmão (H-40), mama (MCF-7) e sistema

nervoso central (SF-268). Já os seus extratos metanol/diclorometano obtidos das folhas também apresentaram citotoxicidade para células tumorais de mama (MCF-7) e para células de câncer renal (TK10) e, inclusive, melanoma (UACC62) (FOUCHE *et al.*, 2008). O óleo obtido de seus capítulos florais demonstrou atividade antibacteriana (ORSOMANDO *et al.*, 2016) e o extrato aquoso da planta inteira, propriedades antivirais e citotóxicas contra um painel de células de leucemia (K562, L1210, P3HR1, Raji e U937) (CHIANG *et al.*, 2004). Inclusive, trabalhos de screening mostraram que o óleo das flores da *T. diversifolia* apresentou citotoxicidade contra um painel células de câncer, incluindo melanoma humano da linhagem A375 (ORSOMANDO *et al.*, 2016). Um recente estudo mostrou que o extrato etanólico das folhas de *T. diversifolia* atua como agente antiproliferativo e citotóxico para células de câncer cervical (HeLa) (PUSPITASARI *et al.*, 2022).

As espécies de *Tithonia* produzem uma complexa matriz biológica rica em uma série de classes de metabólitos secundários diferentes, incluindo sesquiterpenos, diterpenos, flavonoides, cumarinas, ceramidas, cromones, xantanos e fitoesteróis (CHAGAS-PAULA, DANIELA A. *et al.*, 2012). SUT *et al.* (2018) demonstrou que o extrato de suas folhas contém sesquiterpenos, fenilpropanoides e derivados de flavonoides como constituintes principais (SUT *et al.*, 2018). Outro estudo com o óleo essencial extraído de suas partes aéreas, realizado por WANZALA e colaboradores (2016), mostrou uma complexa mistura de monoterpenos (54%) e sesquiterpenos (46%), com cerca de 50 compostos presentes. Muitos desses compostos apresentam poder de repelência, dentre os quais o α -pineno (63,64%) esteve em maior quantidade (WANZALA *et al.*, 2016) e apresenta, também, atividade antiproliferativa *in vitro* contra linhagens de células tumorais de melanoma maligno (UACC-257) e adenocarcinoma de mama (MDA-MB-468, MDA-MB-231 e MCF-7) (BANSAL *et al.*, 2007).

Um total de seis lactonas sesquiterpênicas (A-F) foram encontradas no extrato alcoólico da *T. diversifolia* (BARUAH *et al.*, 1979), mas atualmente três novas substâncias foram isoladas e identificadas (G-I) (ZHAO, GUIJUN *et al.*, 2012), estando as tagitininas A, C e F presentes nos tricomas glandulares de suas folhas (AMBRÓSIO *et al.*, 2008). A tagitinina A apresenta propriedades inseticidas (SARMA *et al.*, 1987) e antidiabéticas (LIN, 2012), enquanto a tagitinina F (TF) apresenta propriedade anti-inflamatória em modelos *in vitro* de neutrófilos humanos (ABE *et al.*, 2015) e efeitos citotóxicos para *Leishmania braziliensis* (TOLEDO *et al.*, 2014). A tagitinina C (TC),

por sua vez, pode ser facilmente convertida em TF por reação fotoquímica, seja na forma purificada ou presente nos extratos. Portanto, TC é fotoinstável e precisa ser mantida ao abrigo da luz para que suas propriedades farmacológicas sejam preservadas (FERNANDES *et al.*, 2019). A fórmula estrutural das tagitininas C e F podem ser observadas na **figura 9**.

A TC é a lactona sesquiterpênica em maior quantidade no extrato metanólico da *T. diversifolia* (65%) (LIAO *et al.*, 2011), sendo a mais estudada de todas, e a literatura aponta propriedades farmacológicas interessantes. A pronunciada atividade antimalárica da *T. diversifolia* contra o protozoário *Plasmodium falciparum* é atribuída a TC (GOFFIN *et al.*, 2003). Também apresenta efeitos sinérgicos antiparasitários contra o *Trypanosoma cruzi* quando combinada com o benznidazol, além de propriedades imunomoduladoras e cardioprotetoras (GONÇALVES-SANTOS *et al.*, 2019). SÁNCHEZ-MENDOZA e colaboradores (2011) mostrou que o extrato de diclorometano da *T. diversifolia* obteve atividade gastroprotetora em um modelo experimental *in vivo* de úlcera gástrica, e esse efeito estava ligado à TC, sendo o agente gastroprotetor ativo (SÁNCHEZ-MENDOZA *et al.*, 2011). TC também atua como agente antifibrótico e contra tumores benignos fibroproliferativos (RANTI; WAHYUNINGSIH; WIROHADIDJOJO, 2018).

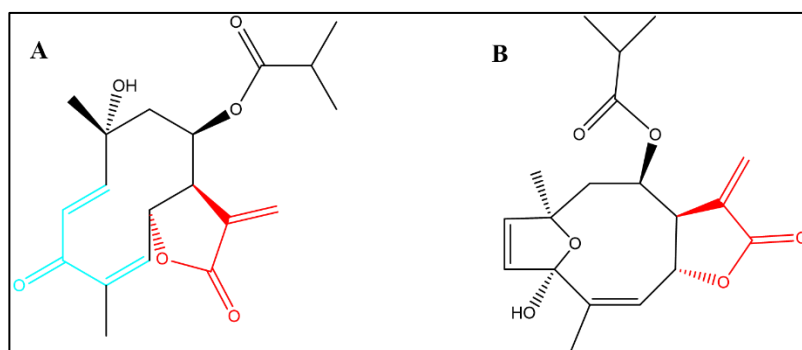


Figura 9. Fórmula estrutural química das tagitininas C (A) e F (B). O grupo vermelho destacado indica a porção α -metileno- γ -lactona e o azul indica as porções carbonila α - β -insaturada (enona), essenciais para os efeitos citotóxicos das lactonas sesquiterpênicas. Fonte: elaborado pelo próprio autor via ChemDraw Ultra versão 12.0.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo investigar a atividade citotóxica de duas lactonas sesquiterpênicas, tagitininas C e seu isômero, tagitinina F, contra células de melanoma humano WM1366 e CHL-1 das linhagens primária e metastático, respectivamente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Cultivar células de melanoma humano (CHL-1 e WM1366) e células não-tumorais (fibroblastos humanos da linhagem CCD1059Sk).

B) Avaliar a citotoxicidade das tagitininas C e F frente às células de melanoma e a fibroblastos.

C) Avaliar o efeito antiproliferativo das tagitininas C e F.

D) Investigar o potencial de inibição da migração celular promovido pelas tagitininas C e F.

E) Verificar se as tagitininas C e F bloqueiam a formação de colônias das células tumorais.

F) Caracterizar o tipo de morte celular induzida pelas tagitininas C e F.

G) Avaliar a influência das tagitininas no ciclo celular.

H) Contribuir para o reconhecimento de novas moléculas antitumorais.

4 METODOLOGIA

4.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Neste estudo foram usadas células de melanoma humano proveniente de metástase pulmonar (CHL-1) e melanoma cutâneo primário de pele de antebraço (WM1366), e células normais de fibroblasto humano (CCD1059Sk). O cultivo celular foi realizado utilizando-se meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) - *high* glicose com 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio (Êxodo Científica), 100 U/mL de penicilina e 0,10 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich), pH entre 7,2-7,4 ajustado em pHmetro (Hanna HI 2221). O meio de cultura preparado foi filtrado utilizando-se filtro Millipore de 0,22 µm (Sigma-Aldrich) acoplado a aparato filtrante submetido a vácuo. O filtrado foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Cultilab). Até o início do experimento, as células foram mantidas congeladas em tubo criogênico em ultrafreezer a -80° C (INDREL Scientific), e o meio de congelamento foi preparado contendo 95% de DMEM 10% SFB e crio-protegidas com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

Para iniciar o cultivo das células, cada tipo celular foi descongelado em banho-maria mantido a 37° C (Kacil BM-02) e o conteúdo de cada tubo criogênico foi transferido para um tubo Falcon contendo meio de cultura DMEM 10% SFB. Procedeu-se a centrifugação (Fanem Excelsa II 206 BL) dos tubos à 2.000 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante do tubo e ressuspendeu-se o pellet de células formado, com 1 mL de DMEM 10% SFB. A suspensão de células foi novamente centrifugada, nas mesmas condições, com a finalidade de eliminar totalmente o meio de congelamento contendo 5% de DMSO. O pellet formado foi, então, ressuspendido com 1 mL de DMEM 10% SFB e transferido para garrafa de cultivo celular de 25 cm² de crescimento (Sarstedt), e o volume foi completado para 5 mL.

As células foram incubadas e cultivadas a 37° C em atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de umidade (incubadora VWR® Air Jacketed CO₂). O meio de cultura foi renovado três vezes por semana. As células foram mantidas em crescimento exponencial na confluência de 80%, confirmada por microscópio óptico invertido trinocular (Physis), e, ao atingir essa confluência, o meio era retirado, as células lavadas duas vezes com 3 mL de tampão fosfato (*Phosphate Buffered Saline* – PBS), preparado

com 2,17 mg/mL de fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄; Êxodo Científica), 0,2 mg/mL de fosfato de sódio bibásico heptahidratado (Na₂HPO₄.7H₂O; Dinâmica Química Contemporânea), 0,2 mg/mL de cloreto de potássio (KCl; ACS Científica) e 8 mg/mL de cloreto e sódio (NaCl; Neon) em água miliQ, filtrado utilizando-se filtro Millipore de 0,22 µm e pH ajustado para 7,2-7,4. As células foram tratadas com 500 µL de tripsina 0,05% EDTA (Sigma-Aldrich) por até 5 minutos. A ação da tripsina foi inativada com 500 µL de DMEM 10% SFB. As células foram centrifugadas, ressuspensas em 1 mL de DMEM 10% SFB e contadas no microscópio óptico por meio de um hemocitômetro. Cada linhagem foi plaqueada em quantidades especificadas para a execução dos experimentos.

4.2 SUBSTÂNCIAS

Ambos princípios ativos TC e TF foram obtidos do extrato das folhas lavadas com acetona da *T. diversifolia*, que foram submetidas à cromatografia flash, e as substâncias purificadas por HPLC realizado na Universidade Federal de Alfenas (Minas Gerais, Brasil). Também, a TF foi obtida a partir da fotociclização de TC sob radiação de 250 nm. Toda a etapa de extração e purificação das substâncias está descrito previamente (FERNANDES *et al.*, 2019). O acesso ao Patrimônio Genético/CTA da *T. diversifolia* foi cadastrado no SisGen nº A913C3F (ANEXO A) em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 (BRASIL, 2015) e seus regulamentos.

As tagitininas foram liofilizadas e ressuspensas em 0,1% de DMSO em água miliQ na concentração de 3,6 mM. A solução obtida foi filtrada com filtro de seringa 0,22 µm e armazenadas em freezer a -20° C. Foram preparados estoques de TC e TF, na concentração de 100 µM em água miliQ, para se obter as concentrações-testes para a realização dos ensaios propostos neste estudo.

4.3 DESENHO DOS EXPERIMENTOS

Para cada experimento realizado, as células foram divididas em grupos: (I) grupo-teste (que recebeu tratamentos com TC ou TF) e (II) controle-negativo (que recebeu apenas DMEM 10% SFB); para os ensaios de viabilidade celular, ciclo celular e tipo de morte celular (III) o princípio ativo de referência utilizado foi o quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) (Sigma Aldrich) (KONISHI *et al.*, 2002; MUHAMMAD *et al.*, 2003).

4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT

O efeito citotóxico *in vitro*, após tratamento com TC e TF, foi avaliado quantitativamente pelo ensaio colorimétrico do MTT. Resumidamente, o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio, solúvel em água, serve de substrato para desidrogenases mitocondriais as quais estão ativas apenas em células viáveis, e pode ser reduzido após a clivagem de seu anel tetrazólio a um composto azul escuro, conhecido como formazan, insolúvel em água, porém solúvel em isopropanol acidificado. Dessa forma, a produção dos cristais de formazan retrata o estado metabólico mitocondrial ativo das células, após tratamento, por meio da detecção de sua absorbância a 570 e 645 nm, que é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células de melanoma CHL-1 e WM1366 e fibroblasto CCD1059Sk foram contadas em um hemocítômetro e plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt), na densidade de 5×10^3 células/poço com 150 μL de meio DMEM 10% SFB. Incubou-se por 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO_2 , para adesão. Transcorrido este período, foi verificada a morfologia e confluência celular no microscópio óptico (Physis), e as células foram tratadas com diferentes concentrações de TC (12,5 μM – 6,25 μM – 3,12 μM – 1,56 μM – 0,78 μM – 0,39 μM e 0,19 μM), TF e 5-FU (50 μM – 25 μM – 12,5 μM – 6,25 μM , – 3,12 μM – 1,56 μM e 0,78 μM) preparadas em DMEM 10% SFB com a finalidade de verificar a viabilidade das células e calcular a concentração que inviabiliza 50% das células (IC_{50}). O controle-positivo (morte celular) utilizado foi o DMSO 2%. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO_2 por 48 h.

Decorridos 48 h de tratamento, o meio foi descartado e 100 μL de solução de MTT preparado em DMEM 10% SFB foi adicionado em cada poço, na concentração de 5 mg/mL. Em seguida, incubou-se as células a 37°C e 5% CO_2 , por 4 h e, após o tempo, a formação dos cristais de formazan foi confirmada por microscopia óptica. Os cristais foram, então, dissolvidos, descartando-se o meio e adicionando 100 μL de solução de isopropanol 0,05 M acidificado, sob agitação, por 30 minutos até completa dissolução dos cristais. Por fim, a leitura das amostras foi realizada a 570 nm e 645 nm, no espectrofotômetro com leitor de placas (Epoch BioTek). Todo o procedimento foi performado em condições de baixa luminosidade, devido a fotoinstabilidade do MTT e da TC.

Os resultados da viabilidade celular foram apresentados como valores de IC₅₀, calculados da seguinte forma:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = [(Abs. teste - Abs. branco) \times 100] \div (Abs. controle - Abs. branco)$$

O IC₅₀ foi calculado a partir de regressão linear e expressa como média ± desvio padrão.

O valor do índice de seletividade (DA'I *et al.*, 2019) foi calculado da seguinte forma:

$$SI = \text{valor da IC}_{50} \text{ das células normais} \div \text{valor da IC}_{50} \text{ das células tumorais}$$

4.5 EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPAN

A proliferação celular foi avaliada pela coloração com Azul de Tripán. Para esse ensaio, as células de melanoma foram plaqueadas em uma densidade de 2×10^4 células/poço, em placas de 24 poços (Sarstedt), com DMEM 10% SFB. Após a adesão celular, conferida por microscopia óptica, os poços foram tratados com TC (1 e 2 μ M) e TF (10 e 20 μ M), durante os intervalos de 24, 48 e 72 h. Após essa etapa, as células dos poços foram desaderidas por ação da tripsina 0,05% e coletadas em um microtubo de 1,5 mL. Posteriormente, adicionou-se 0,4% do corante Azul de Tripán diluído em PBS (pH 7,4) na proporção de 1:1 volume/volume (v/v). As células foram contadas no hemocítmetro, sendo consideradas não viáveis quando apresentaram em seu interior a coração azul (MCGAHON *et al.*, 1995) e os resultados foram obtidos pelo cálculo:

$$\text{Proliferação celular} = [\text{células não coradas} \div (\text{células coradas} + \text{não coradas})] \times 100.$$

4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR PELA TÉCNICA DE SCRATCH

Para o ensaio de migração celular, foi utilizado o método *Scratch*, que se baseia na interrupção da continuidade de uma monocamada celular através de uma ranhura artificial e o posterior acompanhamento do fechamento dessa ranhura por microscopia óptica, uma vez que as células se multiplicam para reestabelecerem as interações intercelulares (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Foram plaqueadas 5×10^5 células/poço em uma placa de 6 poços (Sarstedt) e incubou-se por 24 h em estufa umidificada a 37° C e 5% CO₂ para se obter uma confluência próxima de 100%, em monocamada. Após o período de incubação, a

monocamada confluyente foi confirmada por microscopia óptica (Physis). O meio de cultura de cada poço foi removido e lavado duas vezes com PBS 1x. Em seguida, foi realizada uma ranhura em cada poço da placa, ou seja, uma “ferida artificial” em linha reta com o auxílio de uma ponteira de 200 µL e uma régua. Logo após a ranhura, os poços foram cuidadosamente lavados duas vezes com PBS 1x para remoção das células em suspensão. As células, então, foram tratadas com as concentrações-testes de TC (1 µM para CHL-1 e 2 µM para WM1366), TF (10 µM para CHL-1 e 20 µM WM1366) e foi utilizado DMSO 2% como controle positivo. A placa foi incubada novamente nas mesmas condições.

Cada poço da placa foi fotografado utilizando um microscópio óptico invertido (Physis) acoplado a uma câmera anatômica (Opton 5150) nos tempos de tratamento 0, 24, 48 e 72 h. A área de ranhura (entre as duas margens de células) foi medida utilizando o programa *Image J* em todos os tempos capturados. A taxa de migração foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Fechamento da ranhura (\%)} = \left[\frac{(\text{área da ranhura no tempo } 0 \text{ h} - \text{área da ranhura nos tempos de tratamento})}{\text{área da ranhura no tempo } 0 \text{ h}} \right] \times 100.$$

4.7 ENSAIO CLONOGÊNICO

As células de melanoma CHL-1 e WM1366, em crescimento exponencial, foram semeadas na densidade de 1.000 células/poço em placas de 6 poços (Sarstedt) e incubadas em estufa umidificada a 37° C, 5% de CO₂ por 24 h até a adesão completa. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de TC (2,0 – 0,5 – 0,1 – 0,01 e 0,004 µM) e TF (20 – 10 – 1 – 0,1 e 0,01 µM), durante o período de 48 h. Após o tratamento, o meio foi substituído por DMEM 10% SFB e as células foram mantidas em cultura por 14 dias. Transcorrido o tempo de formação de colônias, o meio foi removido e as placas foram cuidadosamente lavadas duas vezes com PBS 1x. As colônias foram fixadas com 1 mL de paraformaldeído 10% (CRQ) por 30 minutos, lavadas com PBS 1x duas vezes, e o fixador foi substituído por 1 mL de solução de cristal violeta 0,5% (preparada com 20 g de cristal violeta, 200 mL de etanol 95% e 8 g de oxalato de amônio em 800 mL de água destilada). As placas foram fotografadas (Sony Alpha 7III) para posterior comparação e quantificação das colônias nos diferentes tipos de tratamento em relação ao controle, utilizando-se o software

Image J (EUA). Considerou-se colônias viáveis aquelas que continham mais de 50 células, que é o mínimo a ser contado (FRANKEN *et al.*, 2006).

4.8 ANÁLISE DO TIPO DE MORTE CELULAR

O tipo de morte celular foi analisado pela técnica de coloração com AnexinaV e iodeto de propídio (PI) (BORGES *et al.*, 2013; SATZGER *et al.*, 2010; TROUSIL *et al.*, 2017), utilizando o kit comercial *Alexa Fluor® 488 annexin V/PI* (Invitrogen). A coloração foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante e o número de células anexina-V+ e PI+ foram mensuradas através de citometria de fluxo.

O princípio da técnica se baseia na característica das células apoptóticas em translocar moléculas de fosfatidilserina para a porção externa da membrana plasmática. Com isso, a proteína de ligação a fosfolipídios, AnexinaV, liga-se às células com fosfatidilserina exposta externamente. Essa marcação sugere apoptose, enquanto a coloração dupla com PI ocorre apenas após a perda da integridade da membrana, indicando necrose. Portanto a coloração distingue células viáveis (não marcadas), células apoptóticas (AnexinaV+) e células em necrose (AnexinaV+/PI+) (NEGRÍN *et al.*, 2010a; ROZENBLAT *et al.*, 2008).

As células de melanoma CHL-1 e WM1366 foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/poço, em placas de 24 poços (Sarstedt) e incubadas a 37° C, 5% de CO₂, por 24 h. Em seguida, o meio foi substituído pelo tratamento com as concentrações de TC (1 µM para CHL-1 e 2 µM para WM1366), TF (10 µM para CHL-1 e 20 µM WM1366) e 5-FU (10 µM). O controle negativo recebeu somente meio de cultura DMEM 10% SFB. Decorrido o tempo de tratamento (48 h), o meio de cultura foi reservado em microtubo e as células foram lavadas com 500 µL de PBS 1x e desaderidas por ação da tripsina, transferidas para o microtubo reservado e centrifugadas. O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de DMEM. Após contagem no hemocitômetro, o volume necessário para uma densidade de 1×10^5 células/mL foi adicionado em placa de 96 poços (Sarstedt) e novamente centrifugado em centrífuga de placas (Jouan CR 312). O sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspensas em 300 µL de PBS 1x e centrifugado para remoção completa do meio de cultura. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensas em 300 µL tampão de coloração previamente preparado, seguindo as recomendações do kit. As células marcadas foram incubadas por

15 minutos em temperatura ambiente e depois analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II) com excitação de 488 nm para ambos fluorocromos e leitura a 530 e 575 nm. Foram lidos 10.000 eventos e os resultados foram analisados no software FlowJo v9.

4.9 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

As células de melanoma CHL-1 e WM1366 foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/poço em placas de 24 poços (Sarstedt) e incubadas a 37° C, 5% de CO₂, por 24 h. Em seguida, o meio foi substituído pelo tratamento com TC (1 µM para CHL-1 e 2 µM para WM1366), TF (10 µM para CHL-1 e 20 µM WM1366) e 5-FU (10 µM) por 48 h. Após o tratamento, as células foram lavadas com 500 µL de PBS 1x e centrifugadas. O pellet formado foi, então, ressuscitado em 1 mL de DMEM e as células foram contadas com o auxílio do hemocítmetro. A densidade de 1×10^5 células/mL foi transferida para uma placa de 96 poços (Sarstedt) e adicionou-se 100 µL de PBS 1x seguido de centrifugação (Jouan CR 312) com a finalidade de lavar todo o meio de cultura das células. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez e, então, o sobrenadante foi removido e o pellet de células ressuscitado em 25 µL de PBS 1x gelado e 230 µL de etanol absoluto. A placa foi incubada com a tampa fechada por 20 minutos a 4° C e, depois, centrifugada. Para remover todo o resquício de álcool das amostras, retirou-se o sobrenadante e os poços foram lavados com 300 µL de PBS 1x e centrifugado novamente. Após o descarte do sobrenadante, o pellet de células foi ressuscitado em solução tampão do ciclo celular (30 µg/mL de PI + 100 µg/mL de RNase livre de DNase em PBS) e a placa foi incubada por 45 minutos em temperatura ambiente, na ausência de luz. Transcorrido o tempo, a placa foi analisada por citometria de fluxo com excitação de 480 nm e leitura a 570 nm. Ao menos 10.000 eventos foram lidos.

O conteúdo de DNA das células marcado com PI permite diferenciar as fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) (HUANG *et al.*, 2021).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados com um $n = 3$. A significância foi determinada pela análise de variância *two-way* ou *one-way* (ANOVA) e os dados foram expressos como a média \pm o desvio padrão (DP). Os resultados foram considerados significantes com um p -valor $\leq 0,05$ e foram simbolizados com um único asterisco.

Duplos, triplos ou quádruplos asteriscos foram utilizados para os p -valores $\leq 0,01$, $0,001$ ou $0,0001$, respectivamente. Os gráficos apresentados neste estudo foram desenhados por meio do programa GraphPad PRISM InStat versão 9.0 para Windows.

5 RESULTADOS

5.1 TAGITININAS C E F SÃO CITOTÓXICAS PARA CÉLULAS DE MELANOMA

As células de melanoma, WM1366 e CHL-1, e as de fibroblasto humano, CCD1059Sk, foram cultivadas e fotomicrografias foram obtidas a fim de avaliar a confluência e morfologia de cada linhagem. Como pode ser observado na **figura 10**, a linhagem CHL-1 apresenta morfologia fusiforme, tal qual CCD1059Sk, ao passo que a linhagem WM1366 apresenta morfologia esférica.

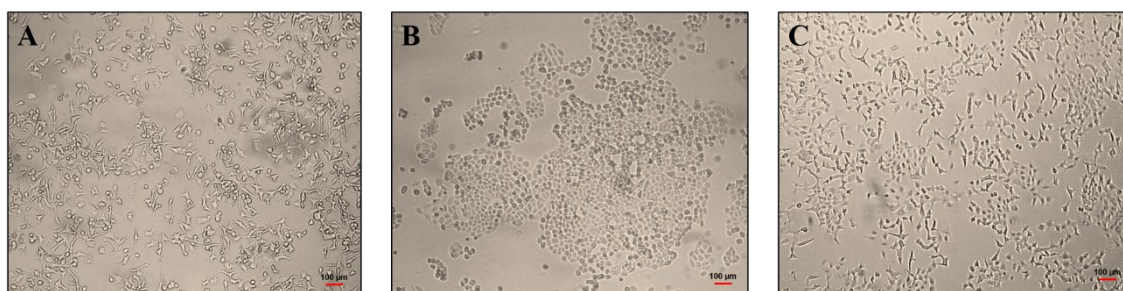


Figura 10. Fotomicrografias das linhagens tumorais e dos fibroblastos normais da pele. Fotos obtidas em câmera anatômica (Opton 5150) acoplada a um microscópio óptico (Physis) das linhagens tumorais, CHL-1 (A) e WM1366 (B), e do fibroblasto humano CCD1059Sk (C), no aumento de 4x e escala 1:100 µm. Fonte: fotografadas pelo próprio autor.

A citotoxicidade de TC e TF foi avaliada pela técnica do MTT, nas linhagens tumorais e nos fibroblastos normais da pele, com a finalidade de verificar a toxicidade e se elas eram seletivas apenas para as células cancerígenas. Por não existirem estudos prévios com essas duas lactonas sesquiterpênicas contra células de melanoma, foi necessário determinar o IC_{50} para cada composto (**tabela 2**), bem como seu índice de seletividade (**tabela 3**).

Para o tratamento com TC no intervalo de 12,5 a 1,56 µM foi possível verificar uma elevada citotoxicidade, inviabilizando 95,0 a 72,9% das células CHL-1, respectivamente e 93,5 a 52,2% as células WM1366, respectivamente ($p \leq 0,0001$). Para o tratamento com TF, o intervalo de 50 a 12,5 µM mostrou-se o mais efetivo, inviabilizando 93,2 a 53,1% das células CHL-1, respectivamente, e 86,0 a 38,6% das células WM1366, respectivamente ($p \leq 0,0001$). Os valores de citotoxicidade do fármaco de referência 5-FU ($p \leq 0,0001$) foram menores do que os das tagitinininas, com concentrações de 50 µM promovendo inibição de 76,7% da CHL-1 e 73,3% da WM1366, enquanto 6,25 µM promoveu inibição de 38,5% da CHL-1 e 24,1% da WM1366 (**figura 11**).

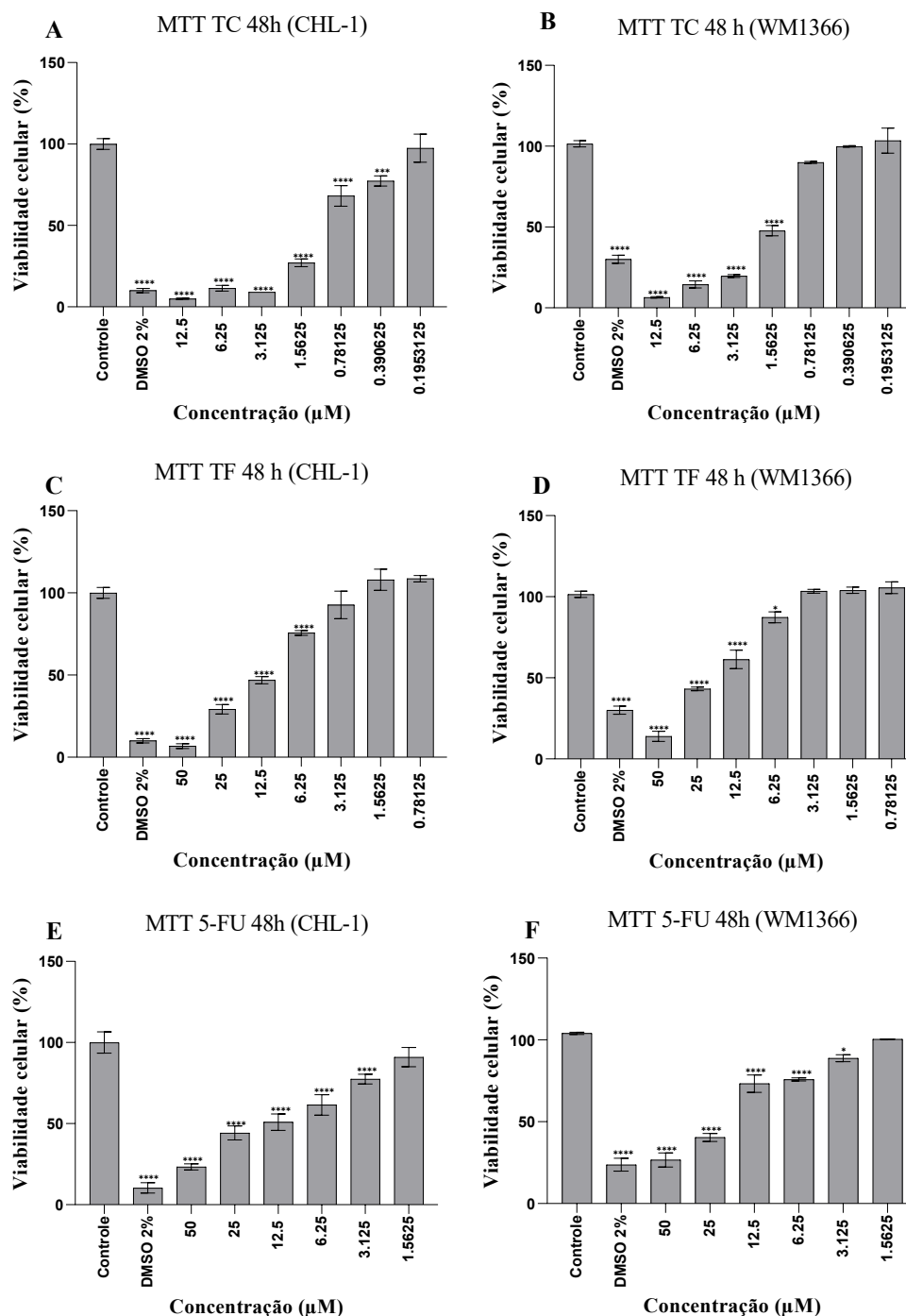


Figura 11. Viabilidade celular após tratamento com TC e TF para as linhagens tumorais. A substância de referência utilizada foi a 5-FU. As células da linhagem tumoral CHL-1 (A, C e E) e WM1366 (B, D e F) foram tratadas com diferentes concentrações das tagitininas C e F e 5-FU, por 48 h. DMSO 2% foi utilizado como controle positivo. A diferença significativa entre controle e tratamentos foi determinada pelo teste estatístico ANOVA *two-way*; n = 3, média \pm DP. **** p < 0,0001; *** p < 0,001 e * p < 0,05. Legenda: TC = tagitininina C, TF = tagitininina F, 5-FU = 5- Fluorouracil, DMSO = dimetilsulfóxido.

A partir das curvas de citotoxicidade geradas pelo ensaio de MTT com as diferentes concentrações dos tratamentos e linhagem, foi possível calcular a IC_{50} de cada composto (**tabela 2**). O IC_{50} da TC foi de $1,5697 \mu\text{M} \pm 0,07101$ para células WM1366 e $1,0337 \mu\text{M} \pm 0,03659$ para CHL-1. Enquanto o IC_{50} da TF foi de $18,6745$

$\mu\text{M} \pm 1,0526$ para WM1366 e $11,7255 \mu\text{M} \pm 1,2176$ para CHL-1. A droga de referência 5-FU apresenta um IC_{50} $20,4796 \mu\text{M} \pm 0,5871$ para WM1366 e $11,8577 \mu\text{M} \pm 0,3024$ para CHL-1.

Tabela 2. IC_{50} dos tratamentos químicos em cada linhagem celular.

Linhagem celular	TC (μM)	TF (μM)	5-FU (μM)
WM1366	$1,5697 \pm 0,07101$	$18,6745 \pm 1,0526$	$20,4796 \pm 0,5871$
CHL-1	$1,0337 \pm 0,03659$	$11,7255 \pm 1,2176$	$11,8577 \pm 0,3024$
CCD1059Sk	$23,3675 \pm 0,2197$	$48,7024 \pm 0,3593$	-

O tratamento com TC apresentou maior toxicidade, sendo aproximadamente 10 vezes mais tóxica que o tratamento com TF, para todas as linhagens tumorais utilizadas neste estudo. Tanto TF quanto a droga de referência 5-FU apresentaram toxicidades similares para a linhagem metastática CHL-1. A citotoxicidade das tagitinas, para ambas as linhagens tumorais, apresentou um perfil dose-resposta.

Também foi investigado o perfil citotóxico da TC e TF em células normais de fibroblastos humanos (**figura 12**), o tratamento com TC na concentração de $12,5 \mu\text{M}$ inviabilizou apenas 25,7% das células, enquanto a TF inviabilizou 49,5% na concentração de $50 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,0001$). O IC_{50} da TC foi de $23,3675 \mu\text{M} \pm 0,2197$ e o IC_{50} da TF foi de $48,7024 \mu\text{M} \pm 0,3593$ para a CCD1059Sk (**tabela 2**).

O índice de seletividade (**tabela 3**) revelou que tanto TC quanto TF são seletivas para as células tumorais CHL-1 (22,6 para TC e 4,15 para TF), enquanto apenas a TC é seletiva para a linhagem tumoral WM1366 (14,9 para TC e 2,61 para TF). Em adição, comparando-se as IC_{50} dos compostos (**tabela 2**), a TC foi aproximadamente 15 vezes menos tóxica quando comparada à linhagem WM1366 e 23 vezes quando comparada a CHL-1. Para a TF, a toxicidade nos fibroblastos foi cerca de 2,5 vezes menos tóxica do que WM1366 e 4 vezes do que a CHL-1. Diante dos resultados, TC apresentou toxicidade seletiva para as células tumorais, e TF foi seletiva para CHL-1.

Tabela 3. Índice de seletividade (SI) das tagitininas para as linhagens tumorais.

Compostos	CHL-1	WM1366
Tagitinina C	22,6 ^a	14,9 ^a
Tagitinina F	4,15 ^a	2,61 ^b

a: seletivo para células tumorais (SI > 3).

b: não seletivo para células tumorais (SI < 3).

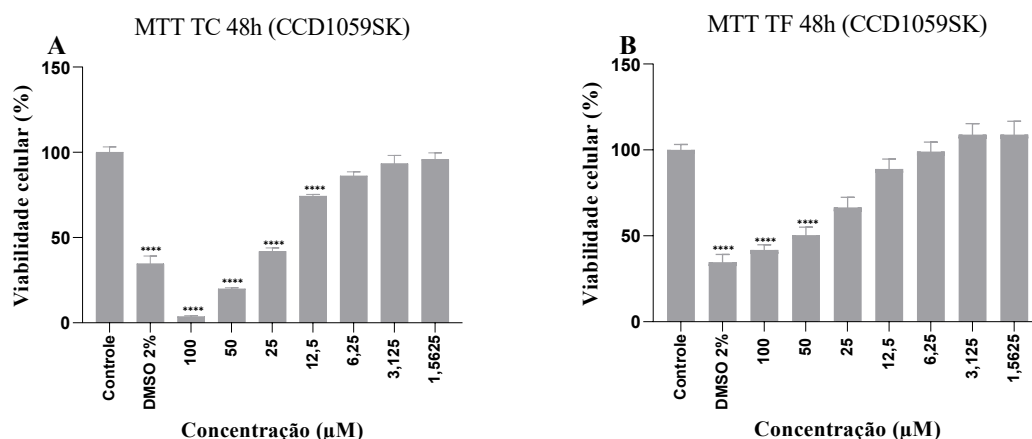


Figura 12. Viabilidade de fibroblastos humanos após tratamento com TC e TF. Ensaio de MTT realizado em células CCD1059Sk após tratamento com TC (A) e TF (B) por 48 h. DMSO 2% foi utilizado como controle positivo. A diferença significativa entre controle e tratamentos foi determinada pelo teste estatístico ANOVA *two-way*; n = 3, média ± DP. **** p < 0,0001. Legenda: TC = tagitinina C, TF = tagitinina F e DMSO = dimetilsulfóxido.

5.2 TAGITININAS C E F INIBEM A PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS

Após o ensaio de viabilidade celular, foi realizado também o ensaio de exclusão do azul de tripan, que visa verificar o efeito antiproliferativo dos tratamentos. Na **figura 13** é possível observar a curva de viabilidade das células tumorais expostas a diferentes concentrações de TC e TF ao longo do tempo.

Inicialmente a densidade das células foi de $2,0 \times 10^4$ células/tratamento, 24 h depois, no dia 0 h de tratamento, a densidade da linhagem de melanoma primário WM1366 ($4,3 \times 10^4$ células) foi maior que a linhagem metastática CHL-1 ($2,9 \times 10^4$ células). Essa diferença entre as linhagens foi observada durante todos os tempos de tratamento analisados (0, 24, 48 e 72 h). Para os tempos de 24, 48 e 72 h de tratamento, o grupo controle-negativo da linhagem CHL-1 apresentou uma taxa de proliferação de 27,6% ($3,7 \times 10^4$ células), 55,2% ($4,5 \times 10^4$ células) e 107% ($6,0 \times 10^4$ células), respectivamente. Para a linhagem WM1366 (controle-negativo), a proliferação, nos

mesmos tempos de tratamento, foram, respectivamente, 62,8% ($7,0 \times 10^4$ células), 121% de crescimento ($9,5 \times 10^4$ células) e 181,4% ($12,1 \times 10^4$ células).

As tagitininas foram capazes de inibir a proliferação das células tumorais de maneira tempo e concentração-dependente a partir das primeiras 24 h de tratamento ($p \leq 0,0001$). O grupo tratado com TC 2 μM e TF 20 μM foram os que apresentaram maior efeito antiproliferativo nas primeiras 24 h de tratamento, para ambas as linhagens tumorais.

Para CHL-1 tratado com 2 μM de TC, o decaimento foi de 48,3% ($1,5 \times 10^4$ células) em 24 h, 63,8% ($1,05 \times 10^4$ células) em 48 h e 75,9% ($0,7 \times 10^4$ células) em 72 h. O tratamento com 1 μM de TC nos tempos de 24, 48 e 72 h, a densidade celular decaiu 13,8% ($2,5 \times 10^4$ células), 51,7% ($1,4 \times 10^4$ células) e 67,2% ($0,95 \times 10^4$ células), respectivamente. Em 72 h de tratamento, ambas concentrações de TC testadas não mostraram diferença estatística, apenas em 24 h ($p \leq 0,0001$) e 48 h ($p \leq 0,05$).

Para a linhagem de melanoma primário WM1366, os valores de inibição da proliferação celular após tratamento com 1 μM de TC foram de 14% ($3,7 \times 10^4$ células), 46,5% ($2,3 \times 10^4$ células) e 62,8% ($1,6 \times 10^4$ células) e com 2 μM foram de 44,2% ($2,4 \times 10^4$ células), 58,1% ($1,8 \times 10^4$ células) e 70% ($1,3 \times 10^4$ células) nos tempos de 24, 48 e 72 h, respectivamente. As diferenças estatísticas entre as concentrações de TC só foram observadas em 24 h de tratamento ($p \leq 0,0001$).

Para a TF na concentração de 20 μM , o efeito antiproliferativo na CHL-1 resultou uma inibição de 44,9% ($1,6 \times 10^4$ células), 55,2% ($1,3 \times 10^4$ células) e 67,2% ($0,95 \times 10^4$ células) para os tempos de tratamento de 24, 78 e 72 h, respectivamente. Já para a concentração de 10 μM de TF, o efeito foi de 13,8% ($2,5 \times 10^4$ células), 38% ($1,8 \times 10^4$ células) e 50% ($1,45 \times 10^4$ células) para os mesmos tempos de tratamento, respectivamente. As concentrações testadas mostraram diferença estatística em todos os tempos de tratamento ($p \leq 0,0001$ em 24 h e $p \leq 0,001$ em 48 e 72 h).

O tratamento com TF para a linhagem WM1366 resultou em uma inibição de 7% ($4,0 \times 10^4$ células), 42% ($2,5 \times 10^4$ células) e 60,2% ($1,7 \times 10^4$ células) para a concentração de 10 μM e 44,2% ($2,4 \times 10^4$ células), 56% ($1,9 \times 10^4$ células) e 65,1% ($1,5 \times 10^4$ células) para a concentração de 20 μM , nos tempos de 24, 48 e 72 h, respectivamente. As diferenças estatísticas entre as concentrações de TF só foram observadas em 24 h de tratamento ($p \leq 0,0001$).

Comparando-se as duas linhagens tumorais, TC a 1 μM ($p \leq 0,0001$ em 24 h, $p \leq 0,001$ em 48 e $p \leq 0,01$ em 72 h) e 2 μM ($p \leq 0,0001$ em 24 h e $p \leq 0,001$ em 48 e 72 h) foram estatisticamente diferentes. As diferenças entre TF 10 μM foram observadas nos primeiros dois tempos de tratamento ($p \leq 0,0001$ em 24 h e $p \leq 0,01$ em 48 h) e em todos os tempos para a concentração de 20 μM ($p \leq 0,0001$ em 24 h, $p \leq 0,001$ em 48 h e $p \leq 0,01$ em 72 h). Além disso, houve diferença quando se comparou as concentrações de TC e TF, em todos os tempos de tratamento, exceto entre TF a 10 μM e TC a 1 μM em 72 h para ambas as linhagens tumorais.

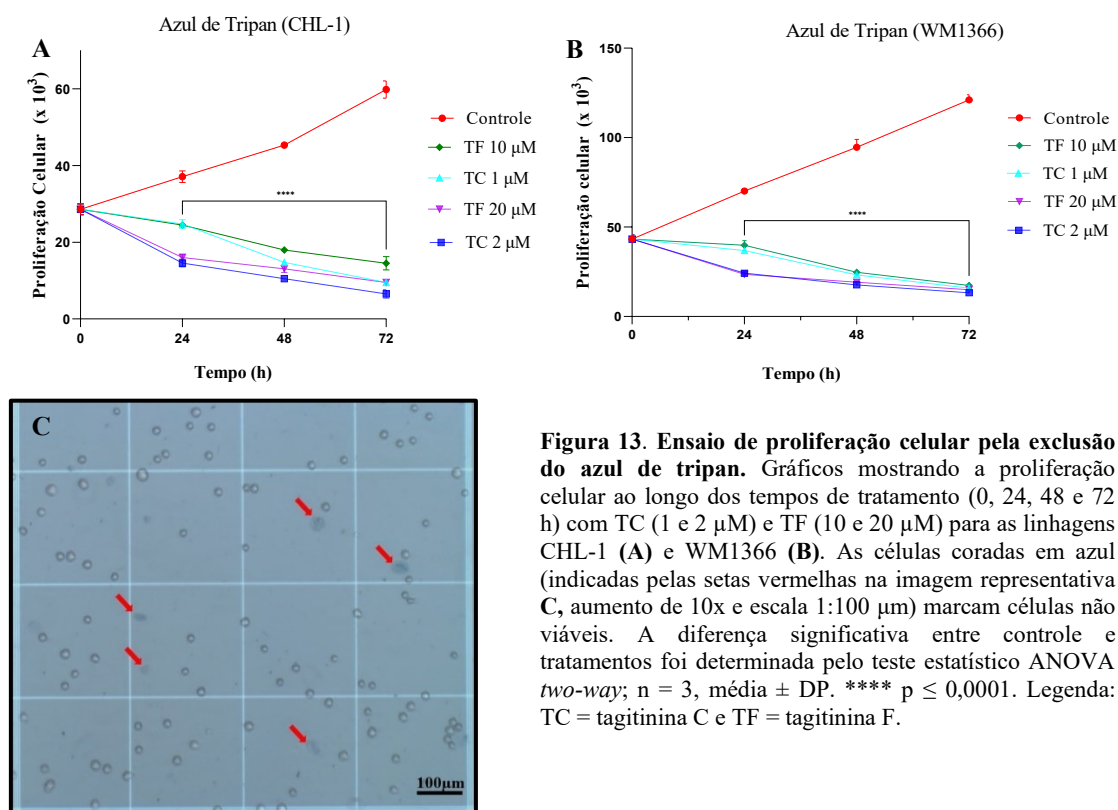


Figura 13. Ensaio de proliferação celular pela exclusão do azul de tripan. Gráficos mostrando a proliferação celular ao longo dos tempos de tratamento (0, 24, 48 e 72 h) com TC (1 e 2 μM) e TF (10 e 20 μM) para as linhagens CHL-1 (A) e WM1366 (B). As células coradas em azul (indicadas pelas setas vermelhas na imagem representativa C, aumento de 10x e escala 1:100 μm) marcam células não viáveis. A diferença significativa entre controle e tratamentos foi determinada pelo teste estatístico ANOVA *two-way*; $n = 3$, média \pm DP. **** $p \leq 0,0001$. Legenda: TC = tagitinina C e TF = tagitinina F.

No ensaio de *scratch* verificou-se a diminuição da migração das células tratadas com TC (1 para CHL-1 e 2 μM para WM1366) e TF (10 para CHL-1 e 20 μM para WM1366) (figura 14). O resultado refletiu-se na área de fechamento dos tratamentos em relação ao controle, uma vez que, nos períodos de tratamento de 48 a 72 h, as células não conseguiram reestabelecer as interações intercelulares, mantendo uma porcentagem de migração celular menor em relação ao controle, para todas as concentrações testadas ($p \leq 0,0001$). Para o tempo de 72 h, a porcentagem de fechamento foi de 34,4% e 45,6% (TC), 26,6% e 54,6% (TF), 57,45 e 58,4% (DMSO 2%) e 90,3% e 95,0% (grupos-controles), para as linhagens WM1633 e CHL-1, respectivamente.

Para ambas as linhagens, tanto TC quanto TF foram eficazes, diminuindo a migração em uma linhagem metastática CHL-1 (a partir de 24 h) e em uma linhagem primária WM1366 (a partir de 48 h).

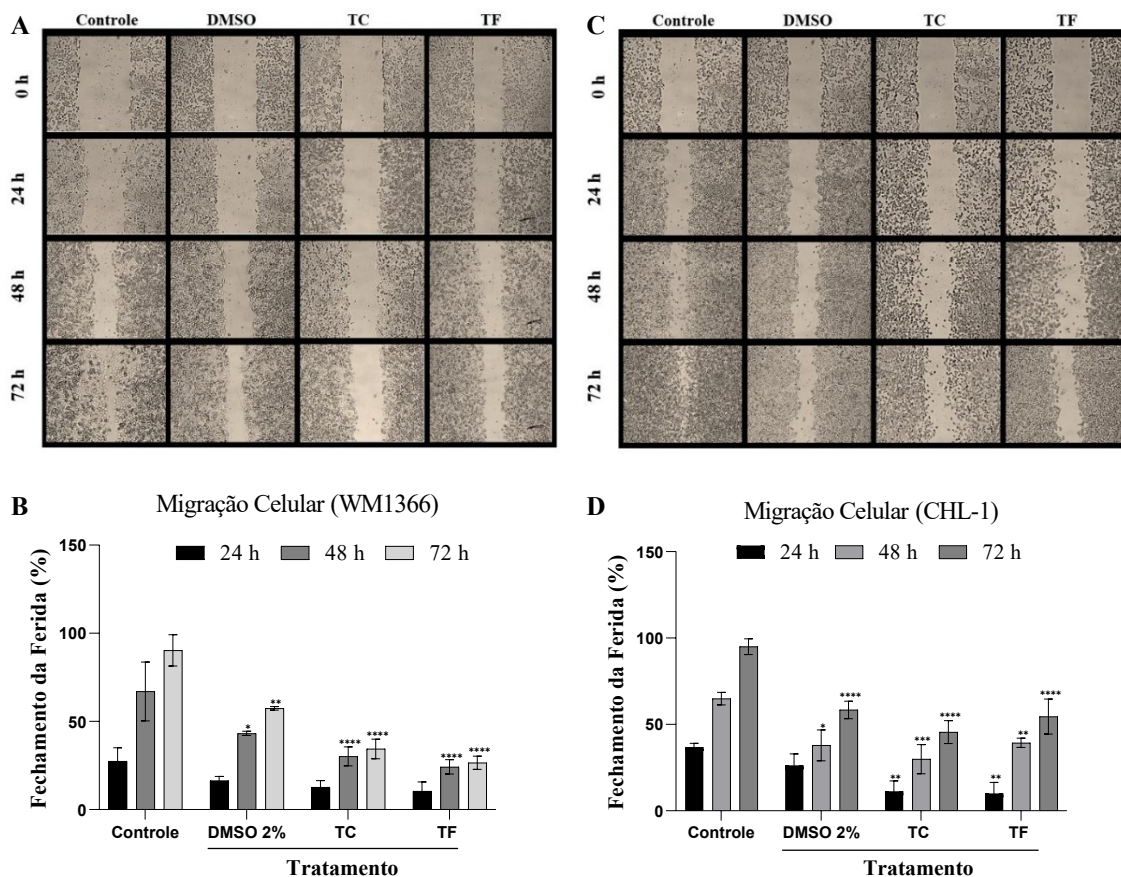


Figura 14. Ensaio de migração celular das linhagens tumorais. Imagens representativas mostrando a migração celular e gráficos evidenciando o fechamento da ranhura (em pixels) realizada nas monocamadas das linhagens tumorais WM1366 (A e B) e CHL-1 (C e D) após tratamento com TC (1 μ M para CHL-1 e 2 μ M para WM1366), TF (10 μ M para CHL-1 e 20 μ M para WM1366) e DMSO 2% nos tempos de tratamento 0, 24, 48 e 72 h. A diferença significativa entre controle e tratamentos foi determinada pelo teste estatístico ANOVA *two-way*, n = 3, média \pm DP. **** p \leq 0,0001; *** p \leq 0,001; ** p \leq 0,01% e * p \leq 0,05. Legenda: TC = tagitina C, TF = tagitina F, DMSO = dimetil sulfoxido.

Tratando-se da mesma linhagem, não houve diferença estatística entre os tratamentos com TC e TF. Contudo, um resultado interessante foi observado no efeito das tagitinininas entre a WM1366 e CHL-1. Houve diferença estatística no tempo de tratamento de 72 h entre as diferentes linhagens tumorais, sendo os grupos WM1366-TF e CHL1-TF ($p \leq 0,01$) e WM1366-TC e CHL1-TF ($p \leq 0,05$). A TF interfere de forma mais eficiente na linhagem WM1366 que, embora seja oriunda de melanoma primário, apresenta potencial metastático devido à VGP. Embora CHL-1 seja uma linhagem de melanoma metastático, as culturas não tratadas não apresentaram diferença estatística quanto à migração quando comparadas às culturas não tratadas da WM1366. Ainda para

a linhagem CHL-1, após 24 h com as tagitininas, foi observado diferença estatística quando comparado ao controle-negativo ($p \leq 0,01$), evidenciando que as substâncias são capazes de reduzir a migração de células metastáticas já nas primeiras horas. Além disso, a TC mostrou-se mais tóxica que a TF nas diferentes linhagens no tempo de 72 h.

5.3 TAGITININAS C E F BLOQUEIAM A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

As linhagens de melanoma na densidade de 1.000 células/poço foram tratadas por 48 horas com diferentes concentrações de tagitininas e mantidas em cultura por 14 dias em meio isento de TC e TF para verificar as interferências dos compostos na formação de colônias (**figura 15**).

No grupo não tratado é possível evidenciar que ambas as linhagens de melanoma apresentam capacidade de formar colônias (média de 139 colônias para CHL-1 e 289 colônias para WM1366), e as tagitininas atuaram bloqueando essa característica tumoral. Nos valores de 2 μM (TC) e 20 μM (TF), ambas as tagitininas foram tóxicas para as linhagens tumorais, inibindo 100% a formação de colônias. Vale ressaltar que concentrações subtóxicas de TC (0,5 μM) e TF (10 μM) também se mostraram capazes de inibir totalmente a formação de colônias, para ambas as linhagens. As colônias só cresceram a partir das concentrações de 0,1 μM para TC e 1,0 μM para TF. Contudo, o número de colônias nessas concentrações diminuiu para ambas as linhagens quando comparado com o grupo não tratado, sendo a linhagem CHL-1 mais sensível (14 colônias para TC e 57 colônias para TF, $p \leq 0,0001$) do que a linhagem WM1633 (194 colônias para TC e 195 colônias para TF).

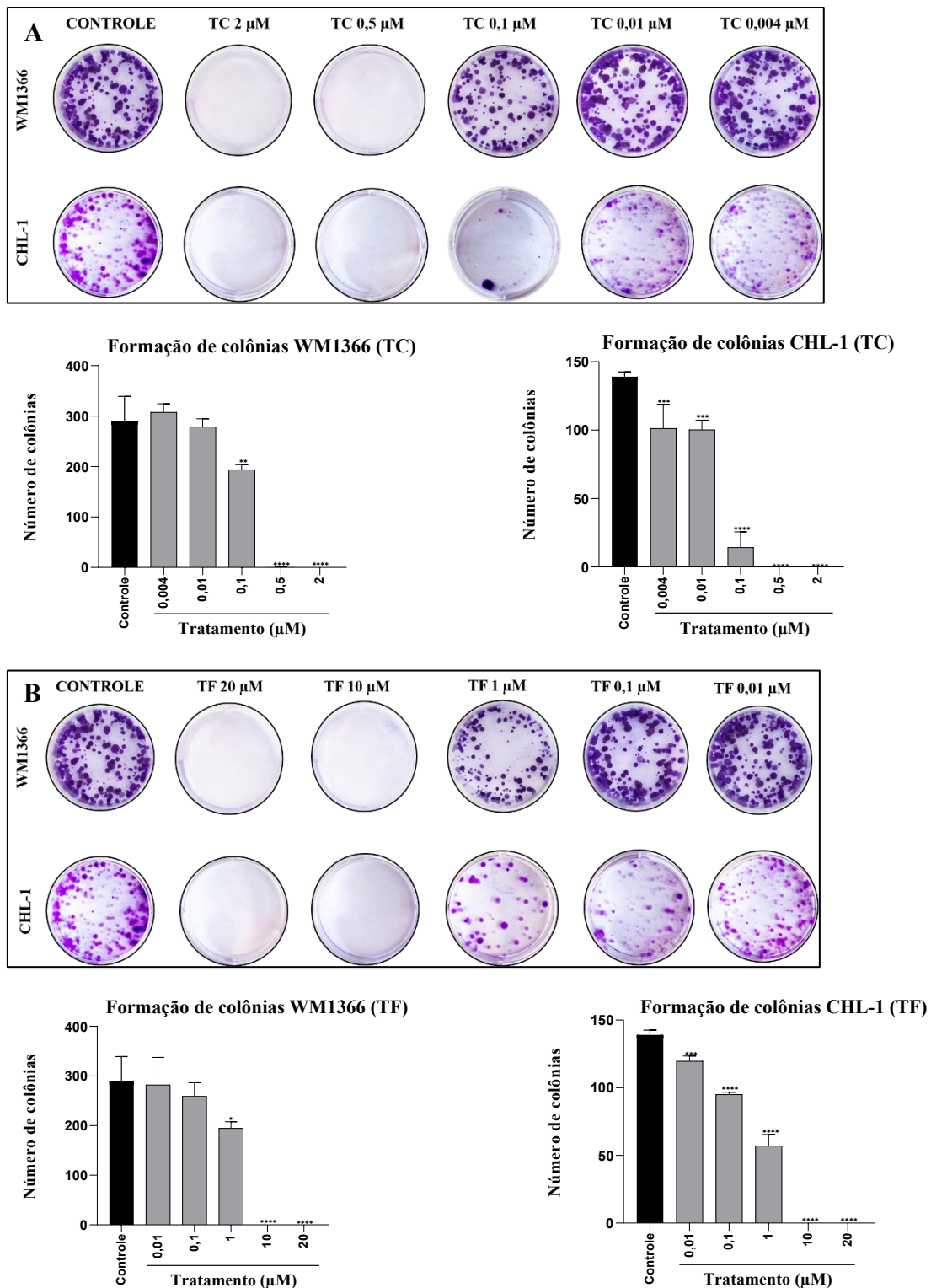


Figura 15. Ensaio de formação de colônias das linhagens tumorais. Imagens representativas da capacidade clonogênica e análise quantitativa (número de colônias) das células de melanoma 14 dias após receberem tratamento com TC (A) e TF (B) por 48 h. A diferença significativa entre controle e tratamentos foi determinada pelo teste estatístico ANOVA *one-way*; $n = 3$, média \pm DP. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. Legenda: TC = tagitinina C e TF = tagitinina F.

Para a linhagem CHL-1, houve diferença estatística entre todos os grupos de tratamento ($p \leq 0,0001$), exceto entre as concentrações 0,004/0,01 μM e 0,1/0,5/2 μM de TC, e 10/20 μM de TF. Para a WM1366, apenas as concentrações 0,004/0,01 μM e 0,5/2 μM de TC, e 0,01/0,1 e 10/20 μM de TF não apresentaram diferenças entre si. Para ambas as linhagens, apenas os grupos 0,004 e 0,01 μM de TC, e 0,01 e 0,1 μM de TF não apresentaram diferenças quando comparado ao grupo não tratado. Em adição, como pode ser visualizado na **figura 15**, a morfologia das colônias entre as células tumorais é visualmente diferente, sendo as colônias da linhagem WM1366 maiores do que as da linhagem CHL-1. Os resultados, portanto, indicam o efeito anticlonogênico das tagitininas em ambas as células de melanoma humano estudadas.

5.4 TAGITININAS C E F PROMOVEM PARADA DO CICLO CELULAR EM G2/M

Para analisar os efeitos de TC (1 μM para CHL-1 e 2 μM para WM1366), TF (10 μM para CHL-1 e 20 μM para WM1366) e 5-FU (10 μM) nesse evento após tratamento das linhagens tumorais, o DNA das células foi marcado com PI e quantificado por citometria de fluxo (**figuras 16 e 17**).

A porcentagem de células nas fases do ciclo celular apontou que tanto TC quanto TF induzem parada do ciclo celular em G2/M, porém em tempos de tratamento diferentes. Como foi demonstrado uma toxicidade maior para TC, a população de células se encontrou na maior parte em sub-G1 (56% para CHL1 e 78,03% para WM1366, $p \leq 0,0001$) em 48 h, diminuição da fase G0/G1 e um leve aumento da fase G2/M na linhagem metastática CHL-1. Em 24 h de tratamento, a TC foi capaz de induzir a parada do ciclo celular em G2/M, em ambas as linhagens tumorais, sendo maior na linhagem de melanoma primário (35,5% para CHL-1, $p \leq 0,001$, e 43,89% para WM1366, $p \leq 0,0001$).

Para a TF, foi possível observar diminuição de G0/G1 (52,10% para CHL-1 e 36,10% para WM1366, $p \leq 0,0001$), aumento em sub-G1 (48,9% para CHL-1 e 51,7% para WM1366, $p \leq 0,0001$) e predominância em G2/M em 48 h para ambas as linhagens (36,5% para CHL-1 e 54,57% para WM1366, $p \leq 0,0001$). A substância de referência 5-FU apresentou parada em S para a linhagem metastática CHL-1 (19,10%, $p \leq 0,0001$) e predominância em sub-G1 para a linhagem primária WM1366 (49,93%, $p \leq 0,0001$).

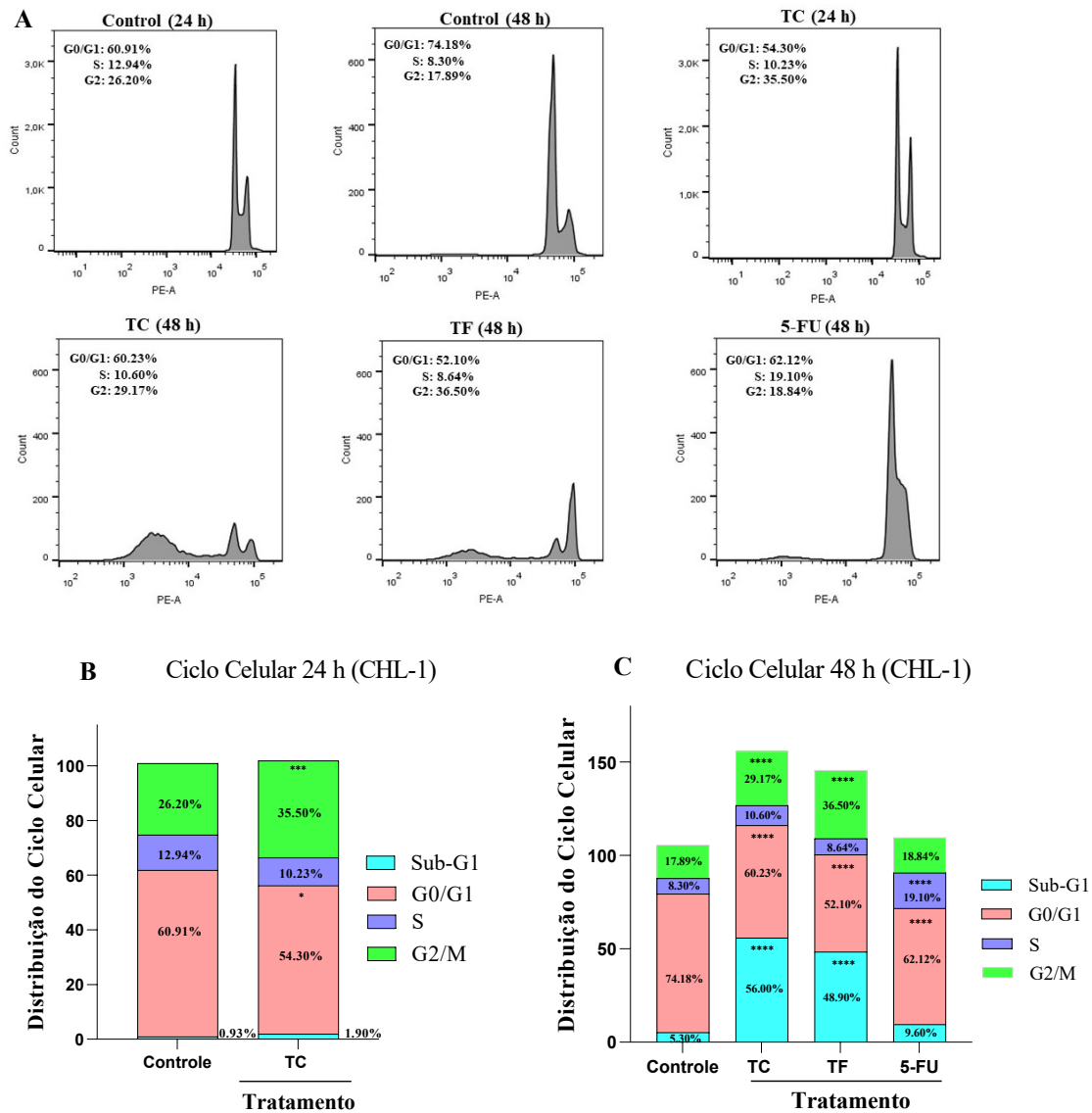


Figura 16. Análise do ciclo celular da CHL-1. Histograma representativo mostrando as populações celulares distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular (A), após tratamentos com TC (1 μ M), TF (10 μ M) e 5-FU (10 μ M) por 24 h (B) e 48 h (C). A diferença significativa entre controle e tratamentos foi determinada pelo teste estatístico ANOVA *two-way*; n = 3, média \pm DP. **** p \leq 0,01%; *** p \leq 0,1%; ** p \leq 1% e * p \leq 5%). Legenda: TC = tagitinina C, TF = tagitinina F, e 5-FU = 5-Fluorouracil.

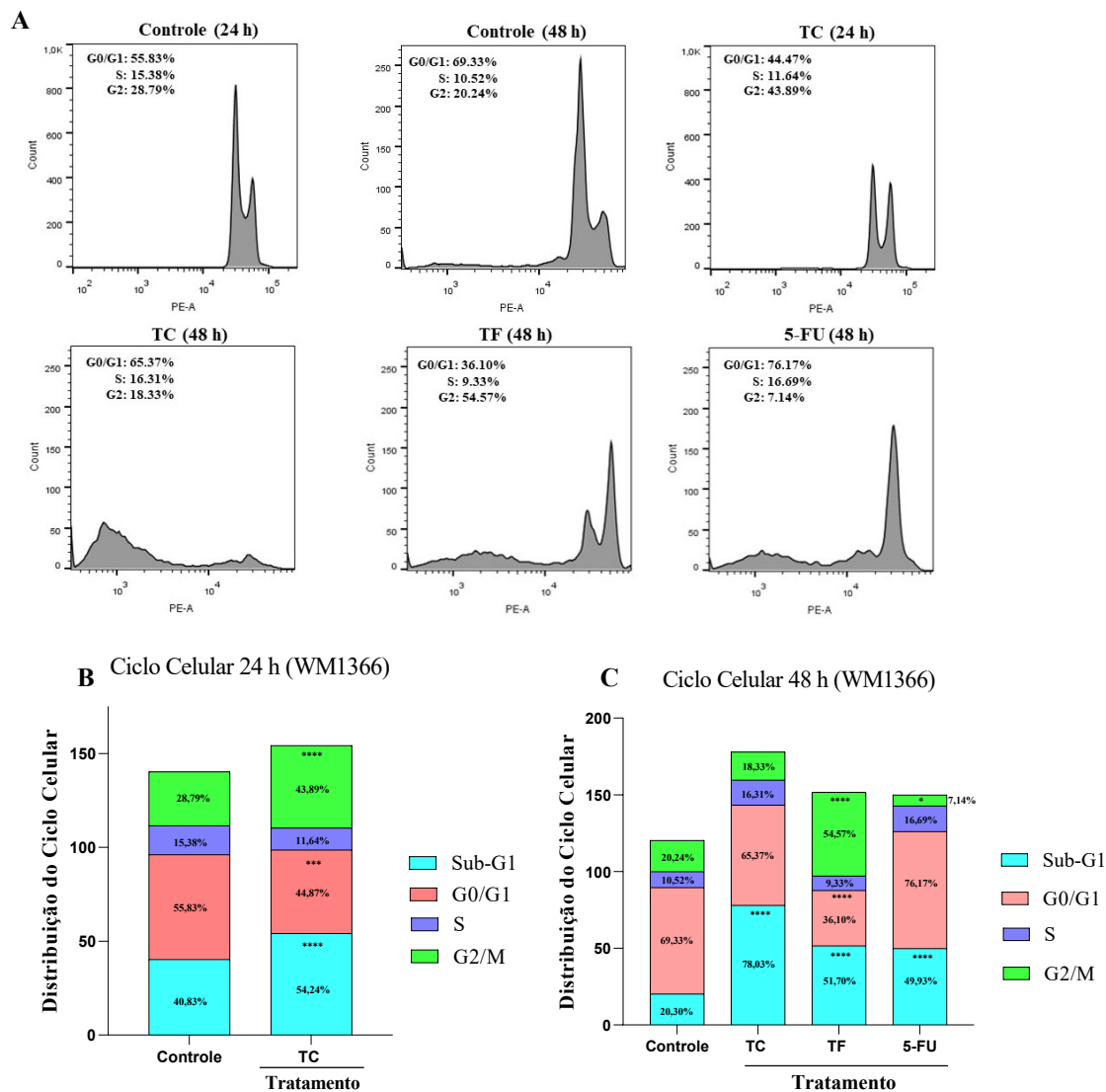


Figura 17. Análise do ciclo celular da WM1366. Histograma representativo mostrando as populações celulares distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular (A), após tratamentos com TC (2 μ M), TF (20 μ M) e 5-FU (10 μ M) por 24 h (B) e 48 h (C). A diferença significativa entre controle e tratamentos foi determinada pelo teste estatístico ANOVA *two-way*; n = 3, média \pm DP. **** p \leq 0,01%; *** p \leq 0,1%; ** p \leq 1% e * p \leq 5%. Legenda: TC = tagitina C, TF = tagitina F, e 5-FU = 5-Fluorouracil.

5.5 TAGITININAS C E F PROMOVEM MORTE CELULAR POR APOPTOSE E NECROSE

As células foram marcadas com AnexinaV/PI e analisadas por citometria de fluxo após tratamento com TC (1 μ M para CHL-1 e 2 μ M para WM1366), TF (10 μ M para CHL-1 e 20 μ M para WM1366) e 5-FU (10 μ M) por 48 h. As tagitinas foram capazes de aumentar significativamente o percentual de morte celular para as linhagens CHL-1 (**figura 18**) e WM1366 (**figura 19**). Os histogramas sugerem que TC induz tanto apoptose em CHL-1 (29,7% de células AnexinaV+, $p \leq 0,0001$) quanto necrose (19,9% de células AnexinaV+/PI+, $p \leq 0,01$), da mesma forma que TF (18,1% de células AnexinaV+ e 22% de células AnexinaV+/PI+, $p \leq 0,001$). Não houve diferença

estatística entre TC e TF nas células AnnexinaV+/PI+, porém houve diferença entre as células AnnexinaV+ ($p \leq 0,0001$). Tanto TC ($p \leq 0,0001$) quanto TF ($p \leq 0,001$) foram mais eficientes que 5-FU na indução de necrose (AnnexinaV+/PI+) e apoptose (AnnexinaV+).

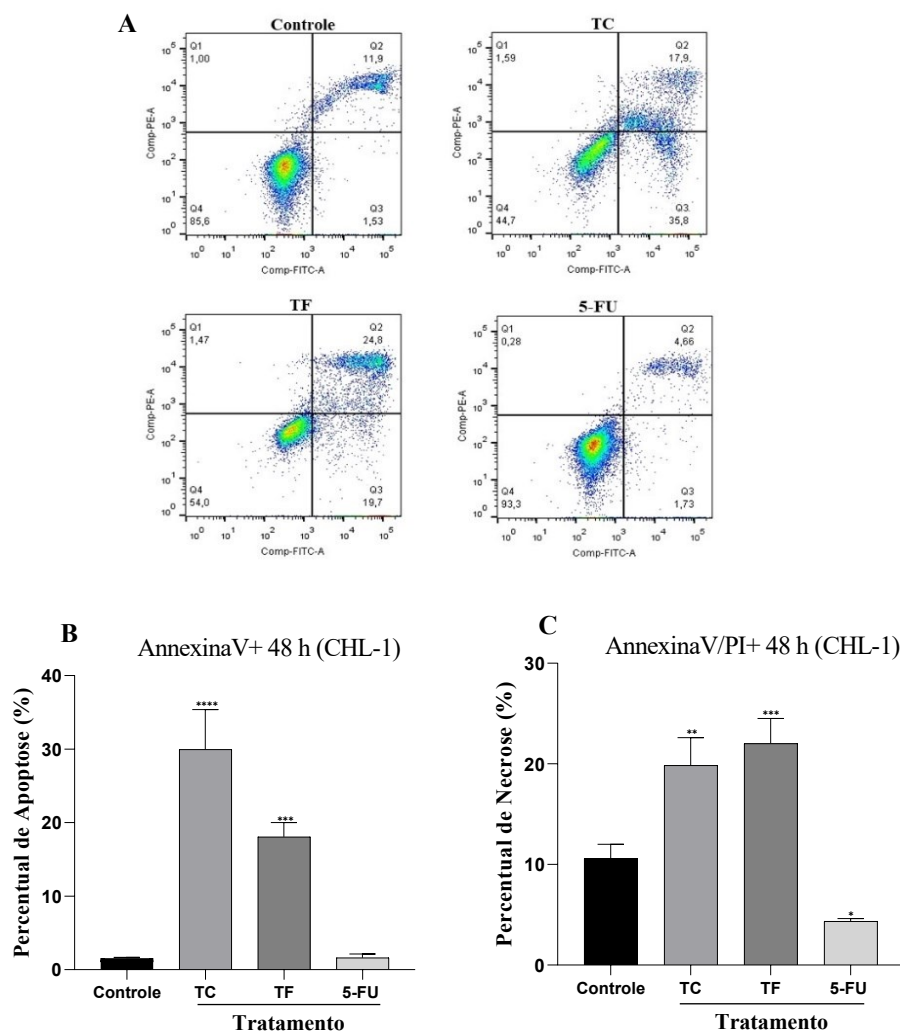


Figura 18. Determinação da morte celular por citometria de fluxo das células CHL-1. Ensaio de Annexina V-iodeto de protídeo. Histogramas representativos da distribuição das células após os tratamentos com TC (1 μ M), TF (10 μ M) e 5-FU (10 μ M) por 48 h (A). 5-FU (10 μ M) foi usado como controle positivo. Gráfico representando a porcentagem de células AnnexinaV+ (B) e AnnexinaV+/PI+ (C). A diferença significativa entre controle e tratamentos foi determinada pelo teste estatístico ANOVA *one-way*; $n = 3$, média \pm DP. **** $p \leq 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$. Legenda: TC = tagitinina C, TF = tagitinina F, e 5-FU = 5-Fluorouracil.

Na linhagem WM1366 (**Figura 19**), TC (20,1%, $p \leq 0,01$), TF (17,6%, $p \leq 0,01$) e 5-FU (18,1% $p \leq 0,01$) foram capazes de induzir necrose (AnnexinaV+/PI+), porém não houve diferença entre os compostos testados. TC (29%, $p \leq 0,0001$) e 5-FU (16,3%, $p \leq 0,001$) também promoveram apoptose (AnnexinaV+), contudo TF não apresentou diferença estatística com o grupo não tratado. Houve diferença entre TC com as outras

substâncias testadas, 5-FU ($p \leq 0,001$) e TF ($p \leq 0,0001$). 5-FU também foi estatisticamente diferente de TF ($p \leq 0,01$) para as células em apoptose (AnexinaV+).

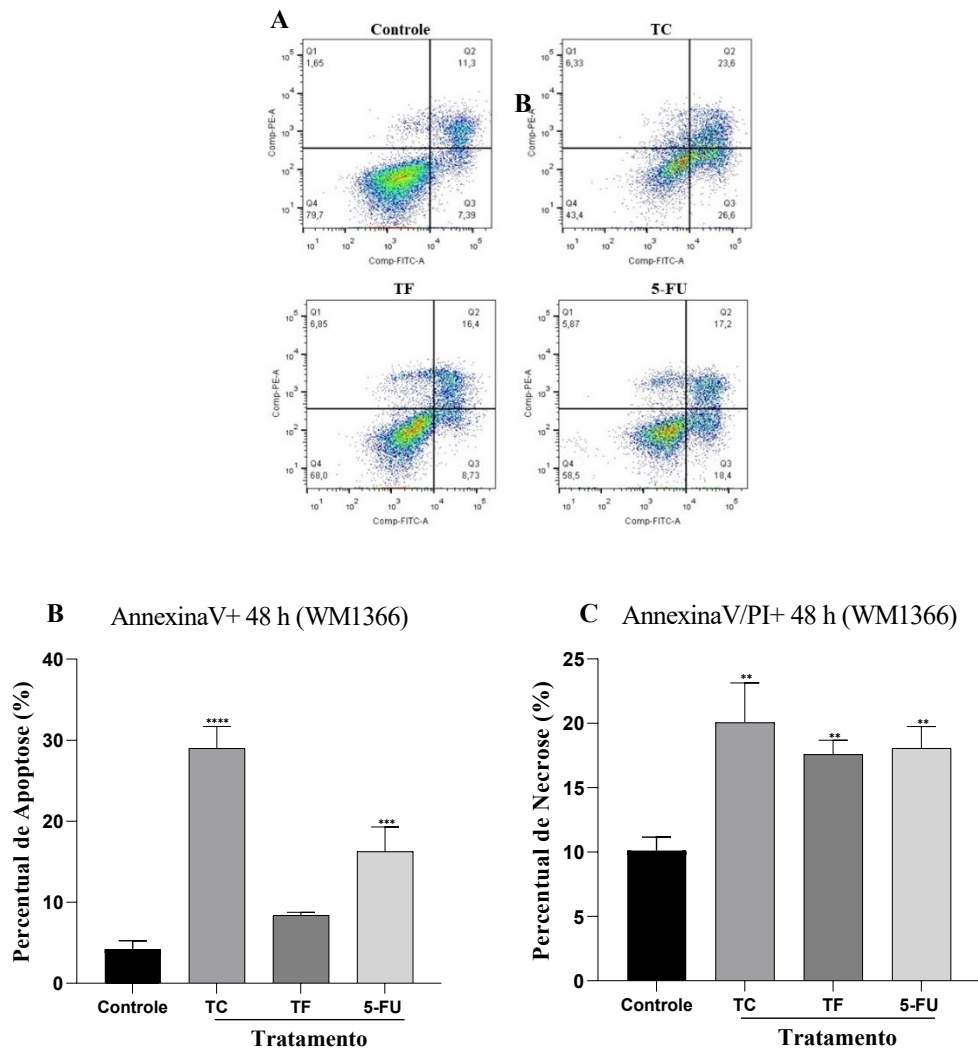


Figura 19. Determinação da morte celular por citometria de fluxo das células WM1366. Ensaio de Anexina V-iodeto de protídeo. Histogramas representativos da distribuição das células após os tratamentos com TC (2 μ M), TF (20 μ M) e 5-FU (10 μ M) por 48 h (A). 5-FU (10 μ M) foi usado como controle positivo. Gráfico representando a porcentagem de células AnexinaV+ (B) e AnexinaV+/PI+ (C). A diferença significativa entre controle e tratamentos foi determinada pelo teste estatístico ANOVA *one-way*; $n = 3$, média \pm DP. **** $p \leq 0,0001$; *** $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,01$. Legenda: TC = tagitinina C, TF = tagitinina F, e 5-FU = 5-Fluorouracil.

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos realizados ao longo do tempo evidenciam a busca constante por novos produtos naturais bioativos com efeito em células tumorais com repercussão até os dias de hoje (HAMSA, T. P.; KUTTAN, 2010; LIU, JIA FANG et al., 2018; LU, MING KUN et al., 2010; PRADEEP; KUTTAN, 2004; VENZA et al., 2018; YI et al., 2020; ZHAO, GUANGMING et al., 2017). A configuração estrutural única desses compostos naturais permite sua ligação a alvos moleculares específicos e interações moleculares que culminam em modificações fisiológicas interessantes do ponto de vista farmacológico (SHARIFI-RAD *et al.*, 2019).

Apesar dos avanços nas terapias antimelanoma trazerem benefícios aos pacientes, a grande maioria dos acometidos com a doença avançada apresenta resistência intrínseca ou desenvolve tal resistência após as primeiras doses das terapias direcionadas e imunoterapias. Essa falha nas terapias é uma forte justificativa para a busca crescente de novos produtos com potencial citotóxico, com menos efeitos adversos e que aumente a adesão terapêutica (ROESCH, A., 2015; SHTIVELMAN et al., 2014).

Nesse cenário, os produtos naturais têm sido uma fonte confiável para o desenvolvimento de medicamentos (YI *et al.*, 2020). Desde os primórdios da humanidade, os diferentes povos culturais buscam na natureza recursos para atender às suas necessidades básicas, formulando produtos naturais com apelo medicinal para o tratamento de um amplo espectro de doenças, incluindo o câncer. A descoberta de potentes agentes terapêuticos instigou o homem a pesquisar diferentes espécies vegetais, fontes primárias de substâncias altamente eficazes e que apresentam uma promissora biodiversidade com metabólitos em potencias (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Como os extratos de plantas geralmente apresentam menos toxicidade quando comparados aos compostos sintéticos, embora também não estejam livres de efeitos adversos, elas têm sido objeto de crescente interesse de pesquisa, particularmente no tratamento do câncer e de suas complicações (MIRZAEI *et al.*, 2016).

O primeiro passo para a descoberta de um novo princípio ativo promissor é verificar se o efeito farmacológico se restringe apenas às células tumorais, com nenhuma ou pouca citotoxicidade inespecífica, como interferências em células normais (ROZENBLAT *et al.*, 2008).

Para responder a essa pergunta, verificou-se inicialmente neste estudo a viabilidade das células tumorais e normais por meio do ensaio de MTT, e o IC₅₀ foi determinado para as linhagens de melanoma primário (WM1366) e metastática (CHL-1), bem como o índice de seletividade. O índice de seletividade calculado mostrou que TC (22,6 para CHL-1 e 14,9 para WM1366) é seletiva para as células tumorais, enquanto TF (4,15 para CHL-1 e 2,61 para WM1366) é seletiva apenas para as células metastáticas da linhagem CHL-1. Estudos anteriores mostram que, para um composto apresentar citotoxicidade altamente seletiva para células tumorais, o valor do índice de seletividade deve ser numericamente maior do que 3, enquanto um valor abaixo de 3 representa baixa seletividade (DA'I *et al.*, 2019).

TC foi citotóxica para as linhagens tumorais de melanoma, com IC₅₀ de 1,5697 $\mu\text{M} \pm 0,0710$ para WM1366 e 1,0337 $\mu\text{M} \pm 0,0366$ para CHL-1, e com baixa citotoxicidade para fibroblastos normais da linhagem CCD1059Sk (IC₅₀ = 23,3675 $\mu\text{M} \pm 0,2197$). TF, por sua vez, embora não tenha sido seletiva para a linhagem WM1366, também se mostrou citotóxica, apresentando IC₅₀ de 18,6745 $\mu\text{M} \pm 1,0526$ para WM1366 e 11,7255 $\mu\text{M} \pm 1,2176$ para a linhagem CHL-1, com baixa citotoxicidade para a linhagem CCD1059Sk (IC₅₀ = 48,7024 $\mu\text{M} \pm 0,3593$). TC foi aproximadamente dez vezes mais tóxica que TF para ambas as linhagens tumorais e as tagitinininas se mostraram mais tóxicas para a célula metastática CHL-1.

Informações da literatura científica acerca da estrutura-atividade das lactonas sesquiterpênicas, discutidas a seguir, ajudam a compreender as diferenças encontradas neste estudo entre os efeitos da TC e TF.

Há décadas as lactonas sesquiterpênicas vem atraindo atenção da área farmacêutica devido sua ampla gama de atividade biológica uma vez que esses metabólitos secundários interferem positiva ou negativamente em diversos processos biológicos cruciais para a manutenção da homeostase do organismo e que servem como base molecular para diversos alvos farmacológicas, como nos mecanismos de morte celular (ZHANG, SIYUAN *et al.*, 2005). As lactonas sesquiterpênicas apresentam efeitos citotóxicos e são candidatos quimioterápicos promissores no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o melanoma. De todos os compostos isolados do extrato das partes aéreas da *T. diversifolia* e testados contra células humanas de câncer de cólon (Col2), TC foi o que apresentou maior citotoxicidade (GU *et al.*, 2002). Outro estudo também demonstrou uma maior citotoxicidade de TC entre 15 compostos isolados e identificados da *T. diversifolia*, dentre eles sesquiterpenos e flavonoides, contra

células de leucemia humana (HL-60) (KURODA *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2012). TC obtida do extrato metanólico de *T. diversifolia* mostrou citotoxicidade seletiva para células de glioblastoma (U373) e indução de morte independente de apoptose (autofagia) (LEE, MING YI *et al.*, 2011).

A fração α -metileno- γ -lactona, presente na estrutura química de certas lactonas sesquiterpênicas, é essencial para justificar os efeitos desses compostos naturais, uma vez que atuam como acceptor de regiões nucleofílicas, como grupos sulfidríla e amino livres presentes em certas moléculas biológicas, por exemplo, e são um fator importante para a citotoxicidade desses terpenos. Em adição, o grupo carbonila α,β -insaturada (enona), também atua como sítio acceptor de regiões nucleofílicas, sendo uma porção adicional para os efeitos citotóxicos (SCOTTI *et al.*, 2007; ZHANG, SIYUAN *et al.*, 2005).

Já foi demonstrado que grupos adicionais à porção α -metileno- γ -lactona também contribuem para a modulação da bioatividade de certas lactonas sesquiterpênicas. Recentemente, De Cicco e colaboradores (2020) comparou a cinaropicrina e a centaurea lactona, extraídas da *Centaurea drabifolia*, descrevendo uma maior citotoxicidade frente a células de melanoma para a cinaropicrina, cuja diferença no arcabouço sesquiterpênico para com a centaurea lactona é apenas um grupo acila adicional. Além disso, as demais lactonas sesquiterpênicas isoladas e que não apresentaram o grupo α -metileno- γ -lactona na estrutura química foram inativos ou com IC₅₀ extremamente elevados (DE CICCICO *et al.*, 2020).

O grupo α -metileno- γ -lactona, que apresenta uma dupla ligação exocíclica conjugada extremamente eletrofílica, favorece a alquilação de nucleófilos biológicos por meio da adição do tipo Michael, considerada o mecanismo geral de ação das lactonas sesquiterpênicas, o que leva a uma perturbação na função de proteínas (BEEKMAN *et al.*, 1997; SCHMIDT, 1997). O próprio DNA também é um alvo para a alquilação da porção α -metileno- γ -lactona, representando uma base molecular potencial para a citotoxicidade desses metabólitos secundários vegetais (ROZENBLAT *et al.*, 2008). Já foi relatado que esse fragmento estrutural é eficaz para atividades antibacterianas (FISCHER *et al.*, 1998), anti-inflamatórias (KWOK *et al.*, 2001), antitumorais (GHANTOUS *et al.*, 2010) e anti-HIV (RASHID; GUSTAFSON; BOYD, 2000).

O conhecimento das atividades biológicas do centro alquilante α -metileno- γ -lactona inclui diversos estudos de relação estrutura-atividade das lactonas

sesquiterpênicas no melanoma. Muhammad e colaboradores (2003) verificou o efeito citotóxico de uma série de lactonas sesquiterpênicas isoladas das partes aéreas de *Centaurothamnus maximus*. O estudo concluiu que o único metabólito secundário que não apresentou atividade citotóxica contra diversas linhagens de células malignas, incluindo melanoma, foi justamente aquele que não apresentava o grupo farmacofórico α -metileno- γ -lactona, enquanto as demais lactonas sesquiterpênicas, que possuíam o grupo em suas estruturas, apresentaram efeito citotóxico promissor (MUHAMMAD et al., 2003).

O partenolídeo é capaz de interagir com sítios nucleofílicos de proteínas, como resíduos de cisteína expostos (HEHNER *et al.*, 1998). O IKKbeta, que ativa indiretamente o NF-kB, tem sua atividade diminuída pelo partenolídeo através da modificação covalente do tipo Michael no grupo sulfidrila da proteína rica em resíduos de cisteína (LESIAK *et al.*, 2010). O asteriscunolide A altera o status redox de células malignas por meio de sua ligação a biomoléculas contendo tiol, como a glutatona, que está envolvida na manutenção do equilíbrio redox (NEGRÍN *et al.*, 2010b).

Ao se analisar a relação estrutura-atividade das tagitininas utilizadas neste estudo, verificamos que TC apresenta em sua estrutura química três grupos eletrofílicos representados pela enona e pelo grupo α -metileno- γ -lactona, enquanto a TF apresenta apenas a porção α -metileno- γ -lactona (**figura 9**), o que pode explicar a maior citotoxicidade de TC em comparação com a TF nos ensaios realizados. Uma maior quantidade de grupos farmacofóricos confere maior toxicidade para dado composto (KITAI et al., 2015). Zidorn e colaboradores (1999) verificou, em seu estudo, que a lactona sesquiterpênica de maior citotoxicidade contra células de melanoma foi aquela que continha em sua estrutura química dois grupos enonas e uma porção α -metileno- γ -lactona (ZIDORN et al., 1999). Outro estudo também verificou que a presença de dois grupos α -metileno- γ -lactona potencializam os efeitos citotóxicos contra células de melanoma, ao passo que sua hidrólise, e conseqüente perda do grupo farmacofórico, promove também a perda da bioatividade verificada (STRAPASSON et al., 2012).

Os achados deste estudo também corroboram com outros estudos, onde a presença do grupo α -metileno- γ -lactona (KONISHI *et al.*, 2002) ou sua associação com o grupo enona (LEE, SEUNG HO *et al.*, 2003; PRIESTAP *et al.*, 2012; RAUTER *et al.*, 2001; TAYLOR, PETER G. *et al.*, 2008) intensificam os efeitos citotóxicos contra células de melanoma. Estudos futuros de relação estrutura-atividade são necessários

para esclarecer a contribuição dos diferentes grupos funcionais presentes na TC e TF para a comprovação dessa hipótese levantada.

Tanto TC como TF foram capazes de inibir a migração celular, sendo uma das etapas que englobam a metástase tumoral juntamente com o processo de invasão, adesão, proliferação e angiogênese (KIM, HAK SU *et al.*, 2012). A migração, portanto, é um processo de dispersão de células cancerosas a partir do crescimento *in loco*, sendo a primeira etapa para o processo metastático de uma célula em VGP (CVETANOVA *et al.*, 2021) e requer que a célula expresse proteínas que favoreçam seu deslocamento no tecido de origem (HUANG *et al.*, 2021). A superexpressão de enzimas proteolíticas metaloproteinase (MMP), por exemplo, principalmente MMP-2 e MMP-9, é capaz de favorecer a degradação de componentes da matriz extracelular e garantir a migração tecidual (SCHOMBERG *et al.*, 2020). TC e TF bloqueiam de forma irreversível a migração de ambas as células tumorais em 72 h de tratamento. CHL-1 mostrou-se mais sensível, uma vez que sua migração foi inibida em 24 h, enquanto WM1366 em 48 h.

O efeito na diminuição da migração celular pela ação da TC e TF corrobora e está intimamente correlacionada com o bloqueio da proliferação celular observada no ensaio de azul de tripan deste estudo. Para a migração ocorrer, é preciso que a célula entre em divisão celular e se prolifere a fim de reestabelecer as interações intercelulares (MOLONEY; COTTER, 2017). Já foi observado previamente que a TC também é capaz de bloquear a migração de células de câncer colorretal, porém, nas concentrações de 5, 10 e 20 μM , evidenciando esse efeito intrínseco da TC em células tumorais (WEI *et al.*, 2021).

Se uma via desempenha um papel importante na proliferação e migração de células malignas, isso sugere que diversos receptores e proteínas dessa via podem ser alvos potenciais para drogas anticâncer (VOLPE *et al.*, 2017). Uma hipótese para o mecanismo de ação das tagitininas seria a possível interferência em proteínas que favorecem a migração celular, tais quais as MMP. Pesquisas futuras para a investigação do mecanismo pelo qual as tagitininas agem inibindo a migração devem ser realizadas em ambas as linhagens. Contudo, estudos anteriores com lactonas sesquiterpênicas apontam mecanismos que podem explicar a ação antimigratória nas células de melanoma. Partenolídeo, que também apresenta o grupo farmacofórico α -metileno- γ -lactona, interfere negativamente na via constitutiva do NF- κ B e, conseqüentemente, em seus promotores à jusante, como MMP-9, em uma linhagem de melanoma humano primária (WM793B) em VGP e outra metastática (A375 e 1205Lu) (CZYZ *et al.*,

2010b), tais quais WM1366 e CHL-1, respectivamente. Diversos estudos anteriores também já descreveram outras lactonas sesquiterpênicas com efeito antimigração, interferindo negativamente no mesmo alvo (CHAO *et al.*, 2019; DE CICCIO *et al.*, 2021; PRATHEESHKUMAR; KUTTAN, 2011a; PRIESTAP *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2007; SU, TAO *et al.*, 2020).

A capacidade clonogênica é entendida como uma etapa crítica na malignidade de células tumorais, pois permite que uma única célula se transforme em uma população de células, antecedendo o processo de metástase (CVETANOVA *et al.*, 2021).

A formação de colônias das células tumorais WM1366 e CHL-1 foram totalmente bloqueadas nos valores próximos aos do IC₅₀ (TC: 2 µM e TF: 20 µM) e nas concentrações subtóxicas (TC: 0,5 µM e 0,1 µM, TF: 10 µM e 1,0 µM). Os dados sugerem, ainda, que os efeitos das tagitininas na formação de colônias são irreversíveis, uma vez que, após tratamento por 48 h, as células receberam meio de cultura isento de TC ou TF e o efeito negativo na quantidade de células viáveis foi evidenciado após 14 dias. Nos valores abaixo e aproximadamente vinte vezes menores do que a IC₅₀ tanto da TC (0,1 µM) quanto de TF (1,0 µM), as colônias cresceram, mas o crescimento foi menor quando se comparou com o grupo não tratado, sendo CHL-1 mais sensível que WM1366 aos efeitos das tagitininas. Além disso, a diferença entre as concentrações de TC e TF para o surgimento de colônias foi de dez vezes, o que reforça os achados deste trabalho sobre a diferença de citotoxicidade existente entre ambas as tagitininas.

Os resultados deste estudo corroboram com uma recente pesquisa elaborada por WEI e colaboradores (2021), o qual verificou-se que a TC também foi capaz de bloquear a formação de colônias em um células de câncer colorretal (SW480, DLD1 e HCT116). Na concentração de 2 µM, os pesquisadores também observaram bloqueio total das colônias. As colônias só foram observadas na concentração de 1,5 µM, o que evidencia que as células de melanoma são mais susceptíveis aos efeitos anti-clonogênicos de TC quando compara às células de câncer colorretal (WEI *et al.*, 2021).

Uma importante estratégia terapêutica para a destruição de células tumorais é frear o seu crescimento e induzir morte celular, visto que muitos tipos de cânceres apresentam intensa atividade mitótica e falhas na indução de morte (GEORGE *et al.*, 2013). No melanoma, a inibição de proteínas apoptogênicas e a superexpressão de proteínas de sobrevivência permitem que as células contornem a apoptose e se tornem resistentes às quimioterapias (HELMBACH *et al.*, 2001). A morte celular por apoptose é uma atividade metabólica intracelular que ativa uma série de proteínas que culmina na

destruição programada da célula, ao passo que a necrose gera rápida desregulação da homeostase, lesão celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático, o que induz resposta inflamatória e danos locais (YOO *et al.*, 2019).

A apoptose pode apresentar duas vias distintas: a via intrínseca (ou apoptose mitocondrial) e via extrínseca (mediada por receptor de morte). A via intrínseca tem início com a ativação da proteína p53, que ativa a proteína pró-apoptótica Bax. A permeabilidade da membrana externa mitocondrial é aumentada quando Bax promove a abertura de canais de cálcio, favorecendo a liberação citosólica de fatores apoptogênicos, tais quais o citocromo c. Uma vez no citosol, o citocromo c pode formar um complexo apoptótico com a procaspase-9 e a proteína Apaf-1 (fator 1 de ativação da peptidase apoptótica). A formação do complexo apoptossomo é capaz de ativar a caspase-9 e induzir a clivagem de caspases efetoras responsáveis por desencadear a sinalização apoptótica, como a caspase-3 (BASU; MIURA, 2002; LIU, NING *et al.*, 2020). Após a ativação, as caspases efetoras clivam substratos específicos e medeiam alterações bioquímicas e morfológicas típicas em células apoptóticas, como redução da célula, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, entre outras (KÖHLER; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2002).

Por outro lado, as vias de sinalização de morte (por exemplo, receptor do fator de necrose tumoral – TNF) modulam a via extrínseca da apoptose (ZHANG, YING *et al.*, 2003). A ativação de caspase-8 pela via extrínseca culmina na ativação da proteína apoptótica Bid, que pode alimentar a via intrínseca pela liberação do citocromo c pela mitocôndria (ABBAS; LARISCH, 2020) (MOLONEY; COTTER, 2017). A apoptose, contudo, é regulada pela proteína anti-apoptótica Bcl-2, capaz de bloquear a liberação do citocromo c e, portanto, a ativação de caspases (MANU, KANJOORMANA ARYAN; KUTTAN, 2009). Esses receptores de morte podem, ainda, modular os processos de morte celular por necrose (KACZMAREK; VANDENABEELE; KRYSKO, 2013), visto que algumas caspases atuam na sinalização de proteínas necróticas, como a catepsina e calpaína. Foi demonstrado que o alcaloide natural evodiamina pode iniciar esses dois sistemas de regulação de morte em células de melanoma (A375-S2) (ZHANG, YING *et al.*, 2003).

Já foi observado que quando o receptor de TNF é ativado e há baixos níveis de caspase-8, a necrose é iniciada no lugar da apoptose (HOLLER *et al.*, 2000). Portanto, como TC ativa a via apoptótica e necrótica em ambas as linhagens tumorais CHL-1 e WM1366, enquanto TF induz apoptose/necrose na linhagem CHL-1, e apenas necrose

nas células WM1366, sugere-se que há uma ativação da apoptose pela via intrínseca e ativação do receptor TNF, o que induz necrose por uma diminuição de caspase-8 pela ação das tagitinininas ou por fatores intrínsecos das células tumorais, como mutações genéticas. Estudos futuros para a quantificação de caspases devem ser realizados para validar essa hipótese.

A capacidade de indução de apoptose das tagitinininas pode estar ligada a atuação de TC e TF no bloqueio do ciclo celular. As análises do ciclo celular revelaram que a perda da viabilidade das células tumorais de ambas as linhagens tratadas com TC e TF é resultado de uma parada do ciclo celular em G2/M, indicando morte celular. A parada em G2/M nas células tratadas com TF foi observada no tempo de tratamento de 48 h, indicando seu efeito apoptótico em 48 h. Contudo, TC aumentou discretamente as células em G2/M, mas alargou a fase sub-G1, tratando-se as células por 48 h. Com o tratamento das células por 24 h, porém, TC aumentou a população celular em G2/M e diminuiu as células em sub-G1. Esse achado intensifica as diferenças quanto à citotoxicidade existentes entre as duas lactonas sesquiterpênicas, TC e TF.

A progressão do ciclo celular em G2/M é favorecida pela ligação da ciclina B1, expressa pelo gene *CCNB1*, com a CDK1. Esse complexo sofre controle pelos seus reguladores negativos, que inclui a proteína p27 e p21, ativadas pela p53 (ZHAO, GUANGMING et al., 2017). Substâncias capazes de promover a superexpressão dessas proteínas reguladoras negativas podem induzir parada do ciclo celular e consequente apoptose, inibindo a proliferação e metástase tumoral (CHENG, JONATHAN D. et al., 1999). Além disso, já foi verificado *in vitro* e *in vivo* que o complexo CDK1/Ciclina B1 é capaz de bloquear a proteína oncosupressora p53, favorecendo a progressão tumoral (LU, MIN et al., 2013).

Portanto, o efeito citostático das tagitinininas C e F em parar o ciclo celular na fase G2/M se dá provavelmente pelo bloqueio do complexo CDK1/Ciclina B1 mediado pela ativação de *checkpoints*, como indução de p53 e de suas proteínas à jusante, relatado em outros trabalhos com lactonas sesquiterpênicas α -metileno- γ -lactona, tomentosina e inuviscolídeo (ROZENBLAT et al., 2008). Além dessas, outros metabólitos também induzem parada do ciclo em G2/M pelos mesmos mecanismos. É o caso do alcaloide evodiamina (LIU, NING et al., 2020) e da naftoquinona plumbagina (WANG, CLAY. et al., 2008).

A literatura científica evidencia que existem proteínas-chaves pelas quais as substâncias naturais agem para promoverem um efeito citotóxico promissor. Em estudos

anteriores, TC obtida do extrato metanólico de *T. diversifolia* mostrou citotoxicidade seletiva para células de glioblastoma (U373) e indução de morte independente de apoptose (autofagia) (LEE, MING YI *et al.*, 2011). Em outro trabalho com a mesma linhagem de glioblastoma, foi isolado uma série de compostos do extrato metanólico da *T. diversifolia*, e de todos, apenas a TC foi capaz de inibir a viabilidade de células de glioblastoma, e essa atividade ocorreu por meio da parada do ciclo celular em G2/M e consequente apoptose acompanhada por uma diminuição dos níveis da proteína pró-tumoral survivina (LIAO *et al.*, 2011). Recentemente, também foi observado que TC age contra células de câncer colorretal (SW480, DLD1 e HCT116), promovendo parada em G2/M, mas causando morte por apoptose, além de gerar estresse oxidativo (WEI *et al.*, 2021). Outro trabalho verificou que TC mostrou-se citotóxica para células de hepatoma humano (Hep-G2) com efeitos antiproliferativos e apoptóticos, induzindo caspases-3 e 8 e alargamento das células em sub-G1 em 24 h de tratamento (LIAO *et al.*, 2013).

O flavonoide luteolina também é capaz de induzir parada do ciclo celular e, consequentemente, levar a apoptose em células de melanoma A375 (GEORGE *et al.*, 2013). Tem sido sugerido que o mecanismo de ação seja por meio da atuação dual da p53 no desencadeamento da apoptose, pela ativação de Bax e supressão de Bcl-2, e ciclo celular, ativando p21, responsável por bloquear quinases dependentes de ciclinas (YEE *et al.*, 2015), o mesmo mecanismo observado em outros produtos naturais, como os alcaloides α -solanina (ALEXAKI; JAVELAUD; MAUVIEL, 2008) e corinolina (YI *et al.*, 2020). As lactonas sesquiterpênicas customolídeo (HUANG *et al.*, 2021) e atractilenolídeo II (YE *et al.*, 2011) também promovem parada do ciclo celular e apoptose por meio de mecanismos similares aos dos metabólitos secundários listados acima, inibindo quinases e Bcl-2 e ativando p53 e Bax.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que as duas lactonas sesquiterpênicas naturais, TC e TF, apresentam ação citotóxica seletiva para células tumorais, uma proveniente de melanoma metastático (CHL-1) e outra de melanoma primário (WM1366). Ambas as tagitininas atuam como agentes pró-apoptótico e necrótico, antimigração, antiproliferativo e antimitótico, freando o ciclo celular em G2/M, além de serem capazes de inibir a formação de colônias. Além disso, observou-se que a linhagem metastática parece ser mais sensível às ações das tagitininas, e que TC é cerca de 10 vezes mais tóxica que seu isômero TF, independente da linhagem. Uma hipótese levantada para a diferença entre as tagitininas é embasada na relação estrutura-atividade, visto que a TC apresenta três grupos farmacofóricos essenciais para a ação de lactonas sesquiterpênicas, ao passo que TF apenas um.

Portanto, este trabalho demonstrou um potencial antitumoral promissor de duas moléculas naturais bioativas, TC e TF, contra células de melanoma humano, e este resultado deve ser considerado a fim de investigar como as tagitininas podem interferir na complexa rede de sinalização intracelular das células de melanoma e no intuito de avaliar e validar a resposta antitumoral *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Ruqaiya; LARISCH, Sarit. Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death—The Story of ARTS and SMAC. , 2020.

ABBASI, Naheed R *et al.* Early Diagnosis of Cutaneous Melanoma. v. 292, n. 22, p. 2771–2776 , 2004.

ABE, Aneli E. *et al.* Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *tithonia diversifolia* trigger different effects on human neutrophils. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 25, n. 2, p. 111–116 , 2015.

ALEXAKI, Vasileia Ismini; JAVELAUD, Delphine; MAUVIEL, Alain. JNK supports survival in melanoma cells by controlling cell cycle arrest and apoptosis. **Pigment Cell and Melanoma Research** v. 21, n. 4, p. 429–438 , 2008.

ALQATHAMA, A.; PRIETO, J. M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. **Natural Product Reports** v. 32, n. 8, p. 1170–1182 , 2015.

AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo *et al.* Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry** v. 69, n. 10, p. 2052–2060 , 2008.

ANDO, Hideya *et al.* Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. **Journal of Investigative Dermatology** v. 132, n. 4, p. 1222–1229 , 2012.

AZIMI, Farhad *et al.* Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. **Journal of Clinical Oncology** v. 30, n. 21, p. 2678–2683 , 2012.

BANSAL, Anita *et al.* Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Ocotea tonduzii* from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications** v. 2, n. 7, p. 781–784 , 2007.

BARUAH, Nabin C. *et al.* Sesquiterpene Lactones of *Tithonia diversifolia*. Stereochemistry of the Tagitinins and Related Compounds. **Journal of Organic Chemistry** v. 44, n. 11, p. 1831–1835 , 1979.

BASTIAN, Boris C. **The Molecular Pathology of Melanoma: An Integrated Taxonomy of Melanocytic Neoplasia**. [S.l: s.n.], 2014. 239–271 p. 9 v. .0125131046.

BASU, Alakananda; MIURA, Ayako. Differential regulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways by protein kinase C. **International journal of molecular medicine** v. 10, n. 5, p. 541–545 , 2002.

BEEKMAN, Aäron C. *et al.* Structure-cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpene lactones. **Journal of Natural Products** v. 60, n. 3, p. 252–257 , 1997.

BHATIA, Shailender; TYKODI, Scott S.; THOMPSON, John A. Treatment of metastatic melanoma: An overview. **Oncology** v. 23, n. 6, p. 488–496 , 2009.

BOLLAG, Gideon *et al.* Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 11, n. 11, p. 873–886 , 2012.

BORGES, Beatriz E. *et al.* De novo galectin-3 expression influences the response of melanoma cells to isatin-Schiff base copper (II) complex-induced oxidative stimulus. **Chemico-Biological Interactions** v. 206, n. 1, p. 37–46 , 2013.

BRESLOW A. *Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma* .**Annals of Surgery**. [S.l: s.n]. , 1970

BUCHBINDER, Elizabeth I.; FLAHERTY, Keith T. Biomarkers in Melanoma: Lessons from Translational Medicine. **Trends in Cancer** v. 2, n. 6, p. 305–312 , 2016.

BUOMMINO, Elisabetta *et al.* Artemisinin reduces human melanoma cell migration by down-regulating $\alpha\beta3$ integrin and reducing metalloproteinase 2 production. **Investigational New Drugs** v. 27, n. 5, p. 412–418 , 2008.

CAMPAGNE, C. *et al.* RACK1 cooperates with NRASQ61K to promote melanoma in vivo. **Cellular Signalling** v. 36, n. March, p. 255–266 , 2017.

CAO, Hui Hui *et al.* Inhibition of the STAT3 signaling pathway contributes to apigenin-mediated anti-metastatic effect in melanoma. **Scientific Reports** v. 6, n. October 2015, p. 1–12 , 2016.

CARLI, Paolo; BIGGERI, Annibale; GIANNOTTI, Benvenuto. Malignant melanoma in Italy: Risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 32, n. 5 PART 1, p. 734–739 , 1995.

CARR, Stephanie; SMITH, Christy; WERNBERG, Jessica. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surgical Clinics of North America** v. 100, n. 1, p. 1–12 , 2020.

CATALANI, Elisabetta *et al.* Natural products from aquatic eukaryotic microorganisms for cancer therapy: Perspectives on anti-tumour properties of ciliate bioactive molecules. **Pharmacological Research** v. 113, p. 409–420 , 2016.

CHAGAS-PAULA, Daniela A. *et al.* Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chemistry and Biodiversity** v. 9, n. 2, p. 210–235 , 2012.

CHAGAS-PAULA, Daniela Aparecida *et al.* Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. **Journal of Ethnopharmacology** v. 136, n. 2, p. 355–362 , 2011.

CHANG, David Z. *et al.* Clinical significance of BRAF mutations in metastatic melanoma. **Journal of Translational Medicine** v. 2, p. 1–5 , 2004.

CHAO, Wen Wan *et al.* Phyto-sesquiterpene lactone deoxyelephantopin and cisplatin synergistically suppress lung metastasis of B16 melanoma in mice with reduced nephrotoxicity. **Phytomedicine** v. 56, p. 194–206 , 15 mar. 2019.

CHE, Song Tian *et al.* Parthenolide inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human uveal melanoma cells. **International Journal of Ophthalmology** v. 12, n. 10, p. 1531–1538 , 2019.

CHEN, Chia Nan *et al.* Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells. **Cancer Letters** v. 246, n. 1–2, p. 237–252 , 8 fev. 2007.

CHEN, Jiezhong *et al.* Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. **International Journal of Nanomedicine** v. 8, p. 2677–2688 , 2013.

CHENG, Jonathan D. *et al.* Paradoxical correlations of cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1 and p27kip1 in metastatic colorectal carcinoma. **Clinical Cancer Research** v. 5, n. 5, p. 1057–1062 , 1999.

CHENG, Liang *et al.* Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: A move toward precision medicine. **Modern Pathology** v. 31, n. 1, p. 24–38 , 2017.

CHENG, Yabin; ZHANG, Guohong; LI, Gang. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. **Cancer and Metastasis Reviews** v. 32, n. 3–4, p. 567–584 , 2013.

CHIANG, Lien Chai *et al.* In vitro anti-leukemic and antiviral activities of traditionally used medicinal plants in Taiwan. **American Journal of Chinese Medicine** v. 32, n. 5, p. 695–704 , 2004.

CHU, Haihan; LI, Meng; WANG, Xiuchun. Capsaicin induces apoptosis and autophagy in human melanoma cells. **Oncology Letters** v. 17, n. 6, p. 4827–4834 , 2019.

CICHOREK, Mirosława *et al.* Skin melanocytes: Biology and development. **Postepy Dermatologii i Alergologii** v. 30, n. 1, p. 30–41 , 2013.

CORRÊA, Flávia de Miranda *et al.* Target therapy versus dacarbazine in first-line treatment of advanced non-surgical and metastatic melanoma: budget impact analysis from the perspective of the Brazilian National Health System, 2018-2020. **Epidemiologia e serviços de saude : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil** v. 28, n. 2, p. e2018325 , 2019.0000000221.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects** v. 1830, n. 6, p. 3670–3695 , 2013.

CROWSON, A. Neil; MAGRO, Cynthia M.; MIHM, Martin C. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. **Modern Pathology** v. 19, n. SUPPL. 2 , 2006.

CURTIN, John A. *et al.* Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. **New England Journal of Medicine** v. 353, n. 20, p. 2135–2147 , 2005.

CVETANOVA, B *et al.* Sesquiterpene lactone deoxyelephantopin isolated from elephantopus scaber and its derivative detd-35 suppress BRAFV600E mutant melanoma lung metastasis in mice. **International Journal of Molecular Sciences** Export Date: 30 April 2021, v. 22, n. 6, p. 1–25 , 2021.

CZAJKOWSKI, Rafał *et al.* Cell cycle in sporadic melanoma. **International Journal of Dermatology** v. 41, n. 9, p. 550–556 , 2002.

CZYZ, M. *et al.* Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells. **British Journal of Pharmacology** v. 160, n. 5, p. 1144–1157 , 2010a.

CZYZ, M. *et al.* Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells. **British Journal of Pharmacology** v. 160, n. 5, p. 1144–1157 , 2010b.

D'MELLO, Stacey A.N. *et al.* Signaling pathways in melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences** v. 17, n. 7, p. 1–18 , 2016.

DA'I, Muhammad *et al.* Selectivity Index of Alpinia galanga Extract and 1'-Acetoxychavicol Acetate on Cancer Cell Lines. **Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention** v. 10, n. 2, p. 95 , 2019.

DANIOTTI, Maria *et al.* BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. **Oncogene** v. 23, n. 35, p. 5968–5977 , 2004.

DE CICCIO, Paola *et al.* Inhibitory effects of cynaropicrin on human melanoma progression by targeting MAPK, NF- κ B, and Nrf-2 signaling pathways in vitro. **Phytotherapy Research** v. 35, n. 3, p. 1432–1442 , 1 mar. 2020.

DE CICCIO, Paola *et al.* Inhibitory effects of cynaropicrin on human melanoma progression by targeting MAPK, NF-kappa B, and Nrf-2 signaling pathways in vitro. **PHYTOTHERAPY RESEARCH** v. 35, n. 3, p. 1432–1442 , mar. 2021.

DEVITT, Bianca *et al.* Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research** v. 24, n. 4, p. 666–672 , 2011.

DUNN, Gavin P.; OLD, Lloyd J.; SCHREIBER, Robert D. The three Es of cancer immunoediting. **Annual Review of Immunology** v. 22, n. 4, p. 329–360 , 2004.

DUTTA, Shruti *et al.* Hypopigmentation in burns is associated with alterations in the architecture of the skin and the dendricity of the melanocytes. **Burns** p. 1–12 , 2019.

EGGERMONT, Alexander M.M.; KIRKWOOD, John M. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: What have we learned in 30 years? **European Journal of Cancer** v. 40, n. 12, p. 1825–1836 , 2004.

EHRKE, M. Jane. Immunomodulation in cancer therapeutics. **International Immunopharmacology** v. 3, n. 8, p. 1105–1119 , 2003.

ENOMOTO, Laura M. *et al.* Role of Surgery for Metastatic Melanoma. **Surgical Clinics of North America** v. 100, n. 1, p. 127–139 , 2020.

ERNFORS, Patrik. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. **Experimental Cell Research** v. 316, n. 8, p. 1397–1407 , 2010.

FARNSWORTH, N. R. *et al.* Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization** v. 63, n. 6, p. 965–981 , 1985.

FERNANDES, Victor Hugo Catricala *et al.* Fast and Efficient Method to Obtain Tagitinin F by Photocyclization of Tagitinin C. **Photochemistry and Photobiology** v. 96, n. 1, p. 14–20 , 2019.

FIGUEIREDO, Licia Caldas *et al.* Câncer de pele : estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo Skin cancer : main molecular markers of cutaneous melanoma. **Revisão de literatura Câncer de pele** v. 49, n. 3, p. 179–183 , 2003.

FISCHER, Nikolaus H. *et al.* Antimycobacterial evaluation of germacranolides. **Phytochemistry** v. 49, n. 2, p. 559–564 , 1998.

FOUCHE, G *et al.* In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of ethnopharmacology** v. 119, n. 3, p. 455–461 , out. 2008.

FRANKEN, Nicolaas A.P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols** v. 1, n. 5, p. 2315–2319 , 2006.

FRIEDMAN, R. J.; RIGEL, D. S.; KOPF, A. W. Early Detection of Malignant Melanoma: The Role of Physician Examination and Self-Examination of the Skin. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** v. 35, n. 3, p. 130–151 , 1985.

FUNK, Jens Oliver. Cell Cycle Checkpoint Genes and Cancer. **Encyclopedia of Life Sciences** p. 1–6 , 2005.

GARCÍA, Abraham; DELGADO, Guillermo; JOSEPH, Pedro. Constituents from *Tithonia diversifolia*. Stereochemical Revision of 2-Hydroxytirotonin. **Journal of the Mexican Chemical Society** v. 50, n. 4, p. 180–183 , 2006.

GEORGE, Vazhapilly Cijo *et al.* Comparative Studies to Evaluate Relative in vitro Potency of Luteolin in Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HaCaT and A375 Cells. v. 14, p. 631–637 , 2013.

GERSHENWALD, Jeffrey E. *et al.* Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. v. 00, n. 0 , 2017.

GERSHENWALD, Jeffrey E.; SCOLYER, Richard A. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. **Annals of Surgical Oncology** v. 25, n. 8, p. 2105–2110 , 2018.

GHANTOUS, A *et al.* What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? **Drug Discovery Today** Cited By :416Export Date: 30 April 2021, v. 15, n. 15–16, p. 668–678 , 2010.

GOFFIN, Eric *et al.* In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: Tagitinin C. **Planta Medica** v. 68, n. 6, p. 543–545 , 2002.

GOFFIN, Eric *et al.* Quantification of tagitinin C in *Tithonia diversifolia* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis** v. 14, n. 6, p. 378–380 , 2003.

GONÇALVES-SANTOS, Elda *et al.* Sesquiterpene lactone potentiates the immunomodulatory, antiparasitic and cardioprotective effects on anti-*Trypanosoma cruzi* specific chemotherapy. **International Immunopharmacology** v. 77, n. October, p. 105961 , 2019.

GRIEWANK, Klaus G. Biomarkers in melanoma. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation** v. 76, n. July, p. S104–S112 , 2016.

GU, Jian Qiao *et al.* Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products** v. 65, n. 4, p. 532–536 , 2002.

GUPTA, Vishal; SHARMA, Vinod Kumar. Skin typing: Fitzpatrick grading and others. **Clinics in Dermatology** v. 37, n. 5, p. 430–436 , 2019.

HACKER, Elke *et al.* The association between MC1R genotype and BRAF mutation status in cutaneous melanoma: Findings from an Australian population. **Journal of Investigative Dermatology** v. 130, n. 1, p. 241–248 , 2010.

HAMILTON, Erika; INFANTE, Jeffrey R. Targeting CDK4/6 in patients with cancer. **Cancer Treatment Reviews** v. 45, p. 129–138 , 2016.

HAMSA, T. P.; KUTTAN, Girija. Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both in vivo and in vitro. **European Journal of Pharmacology** v. 649, n. 1–3, p. 64–73 , 2010.

HAMSA, Thayele P.; KUTTAN, Girija. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. **Chinese Medicine** v. 6, p. 1–8 , 2011.

HEHNER, Steffen P. *et al.* Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF- κ B by preventing the degradation of I κ B- α and I κ B- β . **Journal of Biological Chemistry** v. 273, n. 3, p. 1288–1297 , 1998.

HELMBACH, Heike *et al.* Drug-resistance in human melanoma. **International Journal of Cancer** v. 93, n. 5, p. 617–622 , 2001.

HEO, Jae Rim *et al.* Resveratrol induced reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, and cell cycle arrest in the A375SM malignant melanoma cell line. **International Journal of Molecular Medicine** v. 42, n. 3, p. 1427–1435 , 2018.

HOLLER, Nils *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. **Nature Immunology** v. 1, n. 6, p. 489–495 , 2000.

HONORS, Channay Naidoo; KRUGER, Cherie Ann; ABRAHAMSE, Heidi. Photodynamic therapy for metastatic melanoma treatment: A review. **Technology in Cancer Research and Treatment** v. 17, p. 1–15 , 2018.

HOUTS, P. S.; LENHARD, R. E.; VARRICCHIO, C. ACS cancer facts and figures. **Cancer Practice** v. 8, n. 3, p. 105–108 , 2019.

HSIEH, Tze Chen *et al.* Inhibition of melanoma cell proliferation by resveratrol is correlated with upregulation of quinone reductase 2 and p53. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 334, n. 1, p. 223–230 , 2005.

HU-LIESKOVAN, Siwen *et al.* Combining targeted therapy with immunotherapy in BRAF-mutant melanoma: Promise and challenges. **Journal of Clinical Oncology** v. 32, n. 21, p. 2248–2254 , 2014.

HUANG, Hai *et al.* Costunolide suppresses melanoma growth via the AKT/mTOR pathway in vitro and in vivo. **American journal of cancer research** v. 11, n. 4, p. 1410–1427 , 2021.

IBRAHIM, Nageatte; HALUSKA, Frank G. Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease** v. 4, n. 1, p. 551–579 , 2009.

JOHNSON, D. G.; WALKER, C. L. Cyclins and Cell Cycle Checkpoints. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** v. 39, n. 1, p. 295–312 , 1999.

JONES, O. T. *et al.* Dermoscopy for melanoma detection and triage in primary care: A systematic review. **BMJ Open** v. 9, n. 8, p. e027529 , 2019.

JONES, Rebecca *et al.* A CDKN2A mutation in familial melanoma that abrogates binding of p16 INK4a to CDK4 but not CDK6. **Cancer Research** v. 67, n. 19, p. 9134–9141 , 2007.

JUN, Hye Seung *et al.* Capsaicin induced apoptosis of B16-F10 melanoma cells through down-regulation of Bcl-2. **Food and Chemical Toxicology** v. 45, n. 5, p. 708–715 , 2007.

KACZMAREK, Agnieszka; VANDENABEELE, Peter; KRYSKO, Dmitri V. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. **Immunity** v. 38, n. 2, p. 209–223 , 2013.

KAISER, William J. *et al.* RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. **Nature** v. 471, n. 7338, p. 368–373 , 2011.

KANNENGIESSER, Caroline *et al.* Gene expression signature associated with BRAF mutations in human primary cutaneous melanomas. **Molecular Oncology** v. 1, n. 4, p. 425–430 , 2008.

KHAZAEI, Z. *et al.* Global Incidence and Mortality of Skin Cancer By Histological Subtype and Its Relationship With the Human Development Index (Hdi); an Ecology Study in 2018. **World Cancer Research Journal** v. 6, n. 2, p. e13 , 2019.

KIM, Hak Su *et al.* Berberine-induced AMPK activation inhibits the metastatic potential of melanoma cells via reduction of ERK activity and COX-2 protein expression. **Biochemical Pharmacology** v. 83, n. 3, p. 385–394 , 2012.

KIM, Sung Hyun *et al.* Antitumor and apoptotic effects of quercetin on human melanoma cells involving JNK/P38 MAPK signaling activation. **European Journal of Pharmacology** v. 860, n. July, p. 172568 , 2019.

KITAI, Yurika *et al.* New Sesquiterpene Lactone Dimer, Uvedafolin, Extracted from Eight Yacon Leaf Varieties (*Smallanthus sonchifolius*): Cytotoxicity in HeLa, HL-60, and Murine B16-F10 Melanoma Cell Lines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 63, n. 50, p. 10856–10861 , 23 dez. 2015.

KOEBEL, Catherine M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. **Nature** v. 450, n. 7171, p. 903–907 , 2007.

KÖHLER, Camilla; ORRENIUS, Sten; ZHIVOTOVSKY, Boris. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. **Journal of Immunological Methods** v. 265, n. 1–2, p. 97–110 , 2002.

KONISHI, Tenji *et al.* Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium*. **Biological & pharmaceutical bulletin** v. 25, n. 10, p. 1370–1372 , out. 2002.

KOPROWSKA, Kamila *et al.* Parthenolide enhances dacarbazine activity against melanoma cells. **Anti-Cancer Drugs** v. 24, n. 8, p. 835–845 , set. 2013.

KOZAR, Ines *et al.* Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer** v. 1871, n. 2, p. 313–322 , 2019.

KURODA, Minpei *et al.* Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** v. 55, n. 8, p. 1240–1244 , 2007.

KWOK, Benjamin H.B. *et al.* The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase. **Chemistry and Biology** v. 8, n. 8, p. 759–766 , 2001.

LEE, Ming Yi *et al.* Identification and anti-human glioblastoma activity of tagitinin C from *tithonia diversifolia* methanolic extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 59, n. 6, p. 2347–2355 , 2011.

LEE, Seung Ho *et al.* Anti-tumor activity of the farnesyl-protein transferase inhibitors arteminolides, isolated from *Artemisa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 11, n. 21, p. 4545–4549 , 2003.

LEONARDI, Giulia C. *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology** v. 52, n. 4, p. 1071–1080 , 2018.

LESIAK, Karolina *et al.* Parthenolide, a sesquiterpene lactone from the medical herb feverfew, shows anticancer activity against human melanoma cells in vitro. **Melanoma Research** v. 20, n. 1, p. 21–34 , fev. 2010.

LI, Wei *et al.* The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. **Pathology** v. 38, n. 4, p. 287–301 , 2006.

LI, Yumei *et al.* WDR74 modulates melanoma tumorigenesis and metastasis through the RPL5–MDM2–p53 pathway. **Oncogene** v. 39, n. 13, p. 2741–2755 , 2020.

LIANG, Chun Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun Lin. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols** v. 2, n. 2, p. 329–333 , 2007.

LIAO, May Hua *et al.* Anti-human hepatoma Hep-G2 proliferative, apoptotic, and antimutagenic activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* leaves. **Journal of Natural Medicines** v. 67, n. 1, p. 98–106 , 2013.

LIAO, May Hua *et al.* *Tithonia diversifolia* and its main active component tagitinin C induce survivin inhibition and G2/M arrest in human malignant glioblastoma cells. **Fitoterapia** v. 82, n. 3, p. 331–341 , 2011.

LIN, Hsiang Ru. Sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* act as peroxisome proliferator-activated receptor agonists. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** v. 22, n. 8, p. 2954–2958 , 2012.

LIU, Jia Fang *et al.* Berberine inhibits human melanoma A375.S2 cell migration and invasion via affecting the FAK, uPA, and NF- κ B signaling pathways and inhibits PLX4032 resistant A375.S2 cell migration in vitro. **Molecules** v. 23, n. 8 , 2018.

LIU, Ning *et al.* Evodiamine induces reactive oxygen species-dependent apoptosis and necroptosis in human melanoma A-375 cells. **Oncology Letters** v. 20, n. 4, p. 1–1 , 2020.

LU, Min *et al.* Restoring p53 Function in Human Melanoma Cells by Inhibiting MDM2 and Cyclin B1/CDK1-Phosphorylated Nuclear iASPP. **Cancer Cell** v. 23, n. 5, p. 618–633 , 2013..

LU, Ming Kun *et al.* α -Solanine inhibits human melanoma cell migration and invasion by reducing matrix metalloproteinase-2/9 activities. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** v. 33, n. 10, p. 1685–1691 , 2010.

MACKINTOSH, James A. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. **Journal of Theoretical Biology** v. 211, n. 2, p. 101–113 , 2001.

MALUMBRES, Marcos; BARBACID, Mariano. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. v. 9, n. mArCH , 2009.

MANU, K. A.; KUTTAN, Girija. Boerhaavia diffusa stimulates cell-mediated immune response by upregulating IL-2 and downregulating the pro-inflammatory cytokines and GM-CSF in B16F-10 metastatic melanoma bearing mice. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology** v. 7, n. 1, p. 17–29 , 2008.

MANU, K. A.; KUTTAN, Girija. Effect of punarnavine, an alkaloid from Boerhaavia diffusa, on cell-mediated immune responses and TIMP-1 in B16F-10 metastatic melanoma-bearing mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology** v. 29, n. 3–4, p. 569–586 , 2007.

MANU, Kanjoormana Aryan; KUTTAN, Girija. Punarnavine induces apoptosis in B16F-10 melanoma cells by inhibiting NF- κ B signaling. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** v. 10, n. 6, p. 1031–1038 , 2009.

MARGHOOB, Nadeem G.; LIOPYRIS, Konstantinos; JAIMES, Natalia. Dermoscopy: A review of the structures that facilitate melanoma detection. **Journal of the American Osteopathic Association** v. 119, n. 6, p. 380–390 , 2019.

MATTIA, Gianfranco *et al.* Cell death-based treatments of melanoma:conventional treatments and new therapeutic strategies review-Article. **Cell Death and Disease** v. 9, n. 2 , 2018.

MCGAHON, Anne J. *et al.* The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro. **Methods in Cell Biology** v. 46, n. C, p. 153–174 , 1995.

MEIER, Friedegund *et al.* The Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. **Frontiers in Bioscience** v. 10, n. SUPPL. 3, p. 2986–3001 , 2005.

MELIS, C. *et al.* Molecular genetic and immunotherapeutic targets in metastatic melanoma. **Virchows Archiv** v. 471, n. 2, p. 281–293 , 2017.

MILLER, C. Ryan *et al.* Significance of necrosis in grading of oligodendroglial neoplasms: A clinicopathologic and genetic study of newly diagnosed high-grade gliomas. **Journal of Clinical Oncology** v. 24, n. 34, p. 5419–5426 , 2006.

MIRZAEI, Hamed *et al.* Curcumin: A new candidate for melanoma therapy? **International Journal of Cancer** v. 139, n. 8, p. 1683–1695 , 2016.9177948564.

MITCHELL, Tara C; KARAKOUSIS, Giorgos; SCHUCHTER, Lynn. 66 - Melanoma. **Abeloff's Clinical Oncology (Sixth Edition)** p. 1034- 1051.e2 , 2020.

MOHAMMADPOUR, Ali *et al.* Melanoma: Where we are and where we go. **Journal of Cellular Physiology** v. 234, n. 4, p. 3307–3320 , 2019.

MOLAGODA, Ilandarage Menu Neelaka *et al.* GSK-3 β -targeting fisetin promotes melanogenesis in B16F10 melanoma cells and zebrafish larvae through β -catenin activation. **International Journal of Molecular Sciences** v. 21, n. 1, p. 312–332 , 2020.

MOLONEY, Jennifer N.; COTTER, Thomas G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology** v. 80, p. 50–64 , 2017.

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

MUHAMMAD, Ilias *et al.* Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Centaurothamnus maximus* and *Vicoa pentanema*. **Phytotherapy research : PTR** v. 17, n. 2, p. 168–173 , fev. 2003.

NAJEM, Ahmad *et al.* P53 and MITF/Bcl-2 identified as key pathways in the acquired resistance of NRAS-mutant melanoma to MEK inhibition. **European Journal of Cancer** v. 83, p. 154–165 , 2017.

NEGRÍN, Gledy *et al.* Naturally occurring asteriscunolide A induces apoptosis and activation of mitogen-activated protein kinase pathway in human tumor cell lines. **Molecular carcinogenesis** v. 49, n. 5, p. 488–499 , maio 2010a.

NEGRÍN, Gledy *et al.* Naturally occurring asteriscunolide A induces apoptosis and activation of mitogen-activated protein kinase pathway in human tumor cell lines. **Molecular carcinogenesis** v. 49, n. 5, p. 488–499 , maio 2010b.

NGUYEN, Nhu T.; FISHER, David E. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. **Pigment Cell and Melanoma Research** v. 32, n. 2, p. 224–236 , 2019.

ORSOMANDO, Giuseppe *et al.* Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*, Asteraceae) volatile oil as a selective inhibitor of *Staphylococcus aureus* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase (NadD). **Industrial Crops and Products** v. 85, p. 181–189 , 2016.

OWOYELE, Victor B. *et al.* Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology** v. 90, n. 2–3, p. 317–321 , 2004.

OZRETIC, Petar *et al.* Expression profiles of p53/p73, NME and GLI families in metastatic melanoma tissue and cell lines. **Scientific Reports** v. 9, n. 1, p. 1–13 , 2019.

PEREIRA, Paulo Sérgio *et al.* Sesquiterpene lactones from brazilian *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry** v. 45, n. 7, p. 1445–1448 , 1997.

PLITZKO, Birte; KAWEESA, Elizabeth N.; LOESGEN, X. Sandra. The natural product mensacarcin induces mitochondrial toxicity and apoptosis in melanoma cells. **Journal of Biological Chemistry** v. 292, n. 51, p. 21102–21116 , 2017.

PLONKA, Przemyslaw M. *et al.* What are melanocytes really doing all day long...? **Experimental Dermatology** v. 18, n. 9, p. 799–819 , 2009.

POLLOCK, Pamela M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nature Genetics** v. 33, n. 1, p. 19–20 , 2003.

PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor- κ B (NF- κ B), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. **International Immunopharmacology** v. 4, n. 14 SPEC.ISS., p. 1795–1803 , 2004.

PRATHEESHKUMAR, P; KUTTAN, G. Vernolide-A inhibits tumour specific angiogenesis by regulating proinflammatory cytokines, VEGF, MMPs and TIMP. **European Journal of Pharmacology** Cited By :16Export Date: 30 April 2021, v. 656, n. 1–3, p. 10–18 , 2011a.

PRATHEESHKUMAR, P; KUTTAN, Girija. Vernolide-A Inhibits Radiation-Induced Hypoxia-Mediated Tumor Angiogenesis by Regulating HIF-1 alpha, MMP-2, MMP-9, and VEGF. **JOURNAL OF ENVIRONMENTAL PATHOLOGY TOXICOLOGY AND ONCOLOGY** v. 30, n. 2, p. 139–151 , 2011b.

PRIESTAP, Horacio A. *et al.* Dehydroleucodine and dehydroparishin-B inhibit proliferation and motility of B16 melanoma cells. **Phytochemistry Letters** v. 5, n. 3, p. 581–585 , set. 2012.

PUSPITASARI, Endah *et al.* Antiproliferative activity of Ethanolic Extract of Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) Leaf on HeLa Cervical Cancer Cell Line. **Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention** v. 13, n. 1, p. 55 , 2022.

RAHMATI, M. *et al.* Designing multigradient biomaterials for skin regeneration. **Materials Today Advances** v. 5, p. 100051 , 2020.

RANJAN, Atul; IWAKUMA, Tomoo. Non-canonical cell death induced by p53. **International Journal of Molecular Sciences** v. 17, n. 12 , 2016.

RANTI, Imaniar; WAHYUNINGSIH, Mae Sri Hartati; WIROHADIDJOJO, Yohannes Widodo. The antifibrotic effect of isolate tagitinin C from *tithonia diversifolia* (Hemsley) A. gray on keloid fibroblast cell. **Pan African Medical Journal** v. 30, p. 1–8 , 2018.

RASHID, Mohammad A.; GUSTAFSON, Kirk R.; BOYD, Michael R. HIV-inhibitory cembrane derivatives from a Philippines collection of the soft coral *Lobophytum* species. **Journal of Natural Products** v. 63, n. 4, p. 531–533 , 2000.

RAUTER, Amélia P *et al.* Bioactive humulene derivatives from *Asteriscus vogelii*. **Phytochemistry** v. 56, n. 2, p. 167–171 , 2001.

REZZE, Gisele Gargantini; LEON, Alexandre; DUPRAT, João. Dysplastic nevus (atypical nevus). **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 85, n. 6, p. 863–871 , 2010.

ROCHA, Danilo D *et al.* Studies on the cytotoxicity of miscellaneous compounds from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) BAKER (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity** CAPLUS AN 2008:62366(Journal), v. 4, n. 12, p. 2835–2844 , 2007.

ROESCH, A. Tumor heterogeneity and plasticity as elusive drivers for resistance to MAPK pathway inhibition in melanoma. **Oncogene** v. 34, n. 23, p. 2951–2957 , 2015.

ROESCH, Alexander *et al.* Dermatoscopy of “dysplastic nevi”: A beacon in diagnostic darkness. **European Journal of Dermatology** v. 16, n. 5, p. 479–493 , 2006.

ROMANSKI, Nicole A. *et al.* Characterization of risk factors and efficacy of medical management of immune-related hepatotoxicity in real-world patients with metastatic melanoma treated with immune checkpoint inhibitors. **European Journal of Cancer** v. 130, p. 211–218 , 2020.

ROSSI, Andrés H. *et al.* *Brucella* spp. Lumazine Synthase induces a TLR4-mediated protective response against B16 melanoma in mice. **PLoS ONE** v. 10, n. 5, p. 1–17 , 2015.

ROZENBLAT, Sharon *et al.* Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. **Biochemical pharmacology** v. 75, n. 2, p. 369–382 , jan. 2008.

SÁNCHEZ-MENDOZA, María Elena *et al.* Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer compound, tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Molecules** v. 16, n. 1, p. 665–674 , 2011.

SARMA, J. C. *et al.* Absolute stereochemistry of tagitinin A. **Phytochemistry** v. 26, n. 8, p. 2406–2407 , 1987.

SATZGER, Imke *et al.* MicroRNA-15b represents an independent prognostic parameter and is correlated with tumor cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. **International Journal of Cancer** v. 126, n. 11, p. 2553–2562 , 2010.

SCHADENDORF, Dirk *et al.* Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers** v. 1, n. April, p. 1–20 , 2015.

SCHMIDT, Thomas J. Helenanolide-type sesquiterpene lactones - III. Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** v. 5, n. 4, p. 645–653 , 1997.

SCHOMBERG, John *et al.* Luteolin inhibits melanoma growth in vitro and in vivo via regulating ECM and oncogenic pathways but not ROS. **Biochemical Pharmacology** v. 177, n. March, p. 114025 , 2020.

SCOLYER, Richard A. *et al.* Melanoma pathology reporting and staging. **Modern Pathology** v. 33, p. 15–24 , 2020.

SCOTTI, Marcus T. *et al.* Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** v. 15, n. 8, p. 2927–2934 , 2007.

SHARIFI-RAD, Javad *et al.* **Natural products and synthetic analogs as a source of antitumor drugs**. [S.l: s.n.], 2019. 9 v.

SHOO, B. Aika; SAGEBIEL, Richard W.; KASHANI-SABET, Mohammed. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma at a melanoma referral center. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 62, n. 5, p. 751–756 , 2010.

SHTIVELMAN, Emma *et al.* Pathways and therapeutic targets in melanoma. **Oncotarget** v. 5, n. 7, p. 1701–1752 , 2014.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** v. 69, n. 1, p. 7–34 , 2019.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** v. 70, n. 1, p. 7–30 , 2020.

SMYTH, Mark J.; DUNN, Gavin P.; SCHREIBER, Robert D. Cancer Immun-surveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. **Advances in Immunology** v. 90, n. 06, p. 1–50 , 2006.

SOURA, Efthymia *et al.* Hereditary melanoma: Update on syndromes and management Emerging melanoma cancer complexes and genetic counseling. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 74, n. 3, p. 395–407 , 2016.

STRAPASSON, Regiane L.B. *et al.* Bioactivity-guided isolation of cytotoxic sesquiterpene lactones of *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*. **Phytotherapy Research** v. 26, n. 7, p. 1053–1056 , jul. 2012.

STURZA, Adrian *et al.* Quercetin exerts an inhibitory effect on cellular bioenergetics of the B164A5 murine melanoma cell line. **Molecular and Cellular Biochemistry** v. 447, n. 1–2, p. 103–109 , 2018.

SU, Ching Chuan *et al.* Anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyx attenuate in vitro and in vivo melanoma cancer metastasis. **Journal of Functional Foods** v. 48, n. 110, p. 614–631 , 2018.

SU, Tao *et al.* The JAK2/STAT3 pathway is involved in the anti-melanoma effects of brevilin A. **Life Sciences** v. 241 , 15 jan. 2020.

SUT, Stefania *et al.* Identification of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* as antitrypanosomal compound using bioactivity-guided fractionation. **Fitoterapia** v. 124, n. November, p. 145–151 , 2018.

SWETTER, Susan M. *et al.* Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 80, n. 1, p. 208–250 , 2019.

TAYLOR, Peter G. *et al.* Anticancer activities of two sesquiterpene lactones, millerenolide and thieleanin isolated from *Viguiera sylvatica* and *Decachaeta thieleana*. **Fitoterapia** v. 79, n. 6, p. 428–432 , 2008.

TAYLOR, W R; STARK, G R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene** v. 20, n. 15, p. 1803–1815 , 2001.

THEJASS, P.; KUTTAN, G. Modulation of cell-mediated immune response in B16F-10 melanoma-induced metastatic tumor-bearing C57BL/6 mice by sulforaphane. **Immunopharmacology and Immunotoxicology** v. 29, n. 2, p. 173–186 , 2007.0892397070151.

TOLEDO, Juliano S De *et al.* In Vitro Leishmanicidal Activities of Sesquiterpene Lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* Promastigotes and Amastigotes. p. 6070–6079 , 2014.

TROUSIL, Sebastian *et al.* Phenformin Enhances the Efficacy of ERK Inhibition in NF1-Mutant Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology** v. 137, n. 5, p. 1135–1143 , 2017.

TUCKER, Margaret A. *et al.* Risks of Melanoma and Other Cancers in Melanoma-Prone Families over 4 Decades. **Journal of Investigative Dermatology** v. 138, n. 7, p. 1620–1626 , 2018.

TUCKER, Margaret A *et al.* A Central Risk Factor for Cutaneous Melanoma. , 1997.

UEDA, Hiroshi; FUJITA, Ryousuke. Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** v. 27, n. 7, p. 950–955 , 2004.

VAZQUEZ, Vinicius De Lima *et al.* Melanoma characteristics in Brazil: Demographics, treatment, and survival analysis. **BMC Research Notes** v. 8, n. 1, p. 1–9 , 2015.

VENUS, Matt; WATERMAN, Jacqueline; MCNAB, Ian. Basic physiology of the skin. **Surgery** v. 29, n. 10, p. 471–474 , 2011.

VENZA, Isabella *et al.* Genistein reduces proliferation of EP3-expressing melanoma cells through inhibition of PGE2-induced IL-8 expression. **International Immunopharmacology** v. 62, n. November 2017, p. 86–95 , 2018.

VERA, Jesus *et al.* Case series of dabrafenib-trametinib-induced pyrexia successfully treated with colchicine. **Supportive Care in Cancer** v. 27, n. 10, p. 3869–3875 , 2019.0052001946542.

VOLPE, Virginia O. *et al.* The new paradigm of systemic therapies for metastatic melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 77, n. 2, p. 356–368 , 2017.

WANG, Clay. *et al.* Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/cJun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375.S2 cells- Jun N-terminal kinase pat. **Cancer Letters** v. 259, n. 1, p. 82–98 , 2008.

WANG, Haizhen *et al.* The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. **Nature** v. 546, n. 7658, p. 426–430 , 2017.

WANZALA, W *et al.* Chemical composition of essential oil of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray from the Southern slopes of Mount Elgon in Western Kenya. **Indian Journal of Ethnopharmacology** v. 2, n. 2, p. 72–83 , 2016.

WEI, Ruiran *et al.* Tagitinin c induces ferroptosis through perk-nrf2-ho-1 signaling pathway in colorectal cancer cells. **International Journal of Biological Sciences** v. 17, n. 11, p. 2703–2717 , 2021.

WU, Julie *et al.* Distribution of BRAF T1799A(V600E) mutations across various types of benign nevi: Implications for melanocytic tumorigenesis. **American Journal of Dermatopathology** v. 29, n. 6, p. 534–537 , 2007.

WU, Xufeng; HAMMER, John A. Melanosome transfer: It is best to give and receive. **Current Opinion in Cell Biology** v. 29, n. 1, p. 1–7 , 2014.

XU, Lu *et al.* Apigenin suppresses PD-L1 expression in melanoma and host dendritic cells to elicit synergistic therapeutic effects. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research** v. 37, n. 1, p. 1–15 , 2018.

XU, Yang *et al.* Receptor interactive protein kinase 3 promotes cisplatin-triggered necrosis in apoptosis-resistant esophageal squamous cell carcinoma cells. **PLoS ONE** v. 9, n. 6, p. 1–13 , 2014.

XUE, Chun Yu *et al.* The involvement of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the hyperpigmentation of human skin autografts. **Burns** v. 36, n. 2, p. 284–290 , 2010.

YAMAGUCHI, Yuji; BRENNER, Michaela; HEARING, Vincent J. The regulation of skin pigmentation. **Journal of Biological Chemistry** v. 282, n. 38, p. 27557–27561 , 2007.

YANG, Guang; RAJADURAI, Anpuchchelvi; TSAO, Hensin. Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma. **Journal of Investigative Dermatology** v. 125, n. 6, p. 1242–1251 , 2005.

YANG, Shuping *et al.* Hinokiflavone induces apoptosis in melanoma cells through the ROS-mitochondrial apoptotic pathway and impairs cell migration and invasion. **Biomedicine and Pharmacotherapy** v. 103, n. February, p. 101–110 , 2018.

YE, Yan *et al.* Atractylenolide II induces G1 cell-cycle arrest and apoptosis in B16 melanoma cells. **Journal of ethnopharmacology** v. 136, n. 1, p. 279–282 , jun. 2011.

YEE, Su Bog *et al.* Growth inhibition of luteolin on HepG2 cells is induced via p53 and Fas/Fas-ligand besides the TGF- β pathway. **International Journal of Oncology** v. 47, n. 2, p. 747–754 , 2015.

YI, Chunyang *et al.* Natural product corynoline suppresses melanoma cell growth through inducing oxidative stress. **Phytotherapy Research** v. 34, n. 6, p. 1–12 , 2020.

YOO, EUN SEON *et al.* Antitumor and Apoptosis-inducing Effects of Piperine on Human Melanoma Cells. v. 1892, p. 1883–1892 , 2019.

ZAIDI, M. Raza; DAY, Chi Ping; MERLINO, Glenn. From UVs to metastases: Modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **Journal of Investigative Dermatology** v. 128, n. 10, p. 2381–2391 , 2008.

ZHANG, Siyuan *et al.* Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: Bioactivity and molecular mechanisms. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents** v. 5, n. 3, p. 239–249 , 2005.

ZHANG, Wenjing *et al.* Galangin induces B16F10 melanoma cell apoptosis via mitochondrial pathway and sustained activation of p38 MAPK. **Cytotechnology** v. 65, n. 3, p. 447–455 , 2013.

ZHANG, Ying *et al.* Intracellular regulation of evodiamine-induced A375-S2 cell death. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** v. 26, n. 11, p. 1543–1547 , 2003.

ZHAO, Guangming *et al.* Apigenin inhibits proliferation and invasion , and induces apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cells. n. 19, p. 2277–2285 , 2017.

ZHAO, Guijun *et al.* Three new sesquiterpenes from *Tithonia diversifolia* and their anti-hyperglycemic activity. **Fitoterapia** v. 83, n. 8, p. 1590–1597 , 2012.

ZHAO, Hailong *et al.* Resveratrol induces apoptosis in human melanoma cell through negatively regulating Erk/PKM2/Bcl-2 axis. **OncoTargets and Therapy** v. 11, p. 8995–9006 , 2018.

ZHAO, Xianda; SUBRAMANIAN, Subbaya. Intrinsic resistance of solid tumors to immune checkpoint blockade therapy. **Cancer Research** v. 77, n. 4, p. 817–822 , 2017.

ZIDORN, Christian *et al.* Cytotoxic Activities of Hypocretenolides from *Leontodon hispidus*. **Journal of Natural Products** CAPLUS AN 1999:407844(Journal), v. 62, n. 7, p. 984–987 , 1999.

ANEXO A: CADASTRO SISGEN *Tithonia diversifolia*

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

Comprovante de Cadastro de Acesso**Cadastro nº A913C3F**

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

Número do cadastro:	A913C3F
Usuário:	UNIFAL-MG
CPF/CNPJ:	17.879.859/0001-15
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Ocotea odorifera
Ocotea diospyrifolia
Ocotea corymbosa
Ocotea diospyrifolia
Nectranda grandiflora
Endlicheria paniculata
Cryptocarya aschersoniana
Caesalpinia pluviosa
Aioea saligna
Aniba firmula
Cinnamomum glaziovii
Cinnamomum triplinerve
Nectrandra membranaceae

Ocotea aciphylla
Ocotea divaricata
Ocotea puberula
Ocotea pulchella
Ocotea bicolor
Persea major
Persea willdenovii
Nectandra oppositifolia
Tithonia diversifolia
Tithonia diversifolia
Tithonia diversifolia
Achillea millefolium
Bidens pilosa
Emilia sonchifolia
Pluchea guttoc
Tanacetum vulgare
Minasia scapigera
Piptolepis monticola
Prestelia eriopus
Solidago microglossa
Sphagneticola trilobata
Vernonia herbaceae
Vernonia platensis
Vernonia polyanthes
Vernonia rubriramea
Viguiera robusta
Viguiera trichophylla
Prestelia eriopus
Minasia scapigera
Lychnophora ericoides
Ocotea odorifera
Tithonia diversifolia

Achillea millefolium
Bidens pilosa
Emilia sonchifolia
Pluchea gutoc
Tanacetum vulgare
Solidago microglossa
Vernonia polyanthes
Lychnophora ericoides

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável
CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Metabólica, fitoquímica e ensaios biológicos de espécies vegetais para descoberta de substâncias de interesse farmacológico**

Equipe

Daniela Aparecida Chagas de Paula	UNIFAL-MG
Olivia da Silva Domingos	UNIFAL-MG
Bianca Gonçalves Vasconcelos de Alcântara	UNIFAL-MG
Aline de Fátima Silva	UNIFAL-MG
Felipe Policarpo de Oliveira	UNIFAL-MG
Mario Ferreira Conceição Santos	UNIFAL-MG
Daniela Aparecida Garcia	UNIFAL-MG
Albert Katchborian Neto	UNIFAL-MG
Paula Pio de Oliveira Salem	UNIFAL-MG
Marisi Gomes Soares	UNIFAL-MG
Luiza Beatriz Lima Zanini	UNIFALMG
Victor Hugo Catricala Fernandes	UNIFAL-MG