

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

HANNA KAROLINA DE ARAÚJO BATISTÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM HÍBRIDO
MOLECULAR DE CURCUMINA-RESVERATROL EM MELANOMA
MURINO**

ALFENAS/MG

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

HANNA KAROLINA DE ARAÚJO BATISTÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM HÍBRIDO
MOLECULAR DE CURCUMINA-RESVERATROL EM MELANOMA
MURINO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Pollyanna Francielli de Oliveira

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas Biblioteca
Central

Araújo Batistão, Hanna Karolina de .

Caracterização da atividade antitumoral de um híbrido molecular de
curcumina-resveratrol em melanoma / Hanna Karolina de Araújo Batistão.

- Alfenas, MG, 2025.

72 f. : il. -

Orientador(a): Pollyanna Francielli de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -

Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Câncer. 2. Curcumina. 3. Resveratrol. 4. Cisplatina. 5. Hibridização
molecular. I. Oliveira, Pollyanna Francielli de, orient. II. Título.

HANNA KAROLINA DE ARAÚJO BATISTÃO

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM HÍBRIDO MOLECULAR
DE CURCUMINA-RESVERATROL EM MELANOMA MURINO

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde

Aprovada em: 08 de abril de 2025.

Profa. Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Saulo Duarte Ozelin

Instituição: Universidade de São Paulo

FZEA/USP

Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Francielli de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 08/04/2025, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 informando o código verificador **1478091** e o código CRC **90452B95**.

Dedico este trabalho aos meus pais que me acompanharam a cada passo até aqui, pelas conversas sérias e as extrovertidas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar, iluminar os meus caminhos, me dar sabedoria e entendimento, permitindo que chegasse até aqui.

Aos meus pais e irmão, por serem o meu exemplo, minha força, pelo seu apoio incondicional, por serem meus maiores incentivadores e apoiadores dos meus sonhos. Sem dúvidas não teria conquistado nada sem a ajuda de vocês. Amo vocês!

A grandes amigos, pessoas incríveis que tive a honra de conhecer em Alfenas, que me proporcionaram momentos sem igual, e principalmente me apoiaram em todas as etapas e momentos: Nathália Alves, João Marcos, Leilane Salles, Rafael Fernandes, Carlos Souza, Vinícius Bernardo e Carla Maria meu muito, muito obrigada!

À minha orientadora Dra. Prof^ª Pollyanna Francielli, pela orientação, dedicação, apoio, confiança e compreensão ao longo deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Genética Humana, agradeço pelo prestígio de poder viver os últimos três anos com cada um de vocês, pelas risadas, cafés, conversas e descobertas na bancada. Que essa parceria firmada nestes anos permaneça e traga novas conquistas e contribuições para a ciência.

Aos membros da banca de defesa, Dra. Silvia Leitão, Dr. Saulo Ozelin e Dra. Pollyanna Francielli, pela certeza de excelentes contribuições científicas para a versão final desta dissertação.

Aos colaboradores, sem os quais este trabalho não alcançaria qualidade científica e metodológica. Agradeço a Universidade Federal de Alfenas, por fornecer inúmeras oportunidades ao longo desses anos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Código de Financiamento 13991; APQ-01683-23) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer potencialmente fatal devido ao seu perfil metastático e de quimiorresistência aos tratamentos convencionais, como a quimioterapia. Embora a imunoterapia e as terapias direcionadas tenham aumentado as chances de cura dos pacientes, ainda são necessárias novas abordagens de tratamento que minimizem os problemas relacionados à seletividade, resistência e baixa taxa de resposta. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos antitumorais da molécula PQM-162 [(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- ((E)-4-metoxibenzilideno) acrilohidrazida], um derivado híbrido de curcumina-resveratrol. Para isso, foi realizada a indução tumoral em roedores C57BL/6, utilizando a linhagem celular de melanoma murino B16-F10. Após desenvolvimento do tumor, os animais foram tratados, durante cinco dias consecutivos, por via subcutânea (sc), com dimetilsulfóxido (DMSO 5 %); cisplatina [CDDP 7 mg/kg peso corpóreo (pc)]; PQM-162 2 mg/kg pc e PQM-162 combinado com CDDP. A massa do tumor foi utilizada como parâmetro para avaliação da atividade antitumoral. Sinais de toxicidade foram monitorados através da massa corporal, consumo hídrico e níveis séricos de creatinina, ureia, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP). Análise da expressão de proteínas por imuno-histoquímica (IHC) e de transcritos de mRNA por *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) foram realizadas para investigação dos mecanismos moleculares. O tratamento com PQM-162 diminuiu significativamente a massa tumoral sem causar redução na massa corporal e dos órgãos, sem aumentar significativamente os níveis dos biomarcadores de toxicidade hepática e renal, sem ocasionar citogenotoxicidade significativa na medula óssea, no sangue periférico e nos hepatócitos quando comparado com tratamento com CDDP. A coadministração de PQM-162 e CDDP revelou efeito antitumoral efetivo, menor toxicidade sistêmica mediante à comparação com o tratamento isolado de CDDP. O tratamento com PQM-162 isolado e combinado com CDDP reduziu a expressão de PCNA e β -catenina e aumentou os níveis dos transcritos de mRNA de *Caspase 3* e *9*. Os resultados demonstraram que PQM-162 exerce efeito antitumoral significativo através da redução da proliferação celular e modulação de vias apoptóticas, sem causar toxicidade sistêmica relevante, levando a concluir que a molécula pode ser uma candidata importante para terapia do melanoma.

Palavras-chave: câncer; hibridização molecular; quimioterapia; cisplatina; β -catenina.

ABSTRACT

Melanoma is a potentially fatal type of cancer due to its metastatic profile and chemoresistance to conventional treatments, such as chemotherapy. Although immunotherapy and targeted therapies have increased patients' chances of cure, new treatment approaches are still needed to minimize issues related to selectivity, resistance, and low response rates. In this context, the present study aimed to investigate the antitumor effects of the molecule PQM-162 [(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N'-((E)-4-methoxybenzylidene)acrylohydrazide], a curcumin-resveratrol hybrid derivative. For this purpose, tumor induction was performed in C57BL/6 rodents using the B16-F10 murine melanoma cell line. After tumor development, the animals were treated subcutaneously (sc) for five consecutive days with dimethyl sulfoxide (DMSO 5 %); cisplatin [CDDP 7 mg/kg body weight (bw)]; PQM-162 2 mg/kg bw; and PQM-162 combined with CDDP. Tumor weight was used as a parameter to assess antitumor activity. Signs of toxicity were monitored by measuring body weight, water intake, and serum levels of creatinine, urea, oxaloacetic transaminase (AST), and pyruvic transaminase (ALT). Protein expression analysis by immunohistochemistry (IHC) and mRNA transcript analysis by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed to investigate the molecular mechanisms. Treatment with PQM-162 significantly reduced tumor mass without causing a decrease in body or organ weight, without significantly increasing hepatic and renal toxicity biomarkers, and without inducing significant cytogenotoxicity in bone marrow, peripheral blood, or hepatocytes compared to CDDP treatment. The co-administration of PQM-162 and CDDP demonstrated effective antitumor activity with lower systemic toxicity compared to CDDP alone. Treatment with PQM-162 alone and combined with CDDP reduced the expression of PCNA and β -catenin and increased the levels of Caspase 3 and 9 mRNA transcripts. The results demonstrated that PQM-162 exerts significant antitumor effects by reducing cell proliferation and modulating apoptotic pathways, without causing relevant systemic toxicity, leading to the conclusion that the molecule may be an important candidate for melanoma therapy.

Keywords: cancer; molecular hybridization; chemotherapy; cisplatin; β -catenin.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Características adquiridas pelas células tumorais no decorrer do processo de transformação maligna | 15 |
| Figura 2 - | Estrutura química da cisplatina [CDDP - Cis-diaminodicloroplatina(II)]..... | 21 |
| Figura 3 - | Principais efeitos adversos da cisplatina no organismo humano..... | 22 |
| Figura 4 | Estrutura química da curcumina [1E, 6E 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil) hepta-1,6- dieno-3,5-diona] | 24 |
| Figura 5 - | Estrutura química do trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno)..... | 25 |
| Figura 6 - | Estrutura molecular de PQM-162 [(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'-(4-metoxibenzilideno) acrilidrazida]..... | 27 |
| Figura 7 - | Massa tumoral (g) (A) e fotomicrografia representativa (B) dos tumores nos diferentes grupos de tratamentos | 38 |
| Figura 8 - | Quantificação imuno-histoquímica no tecido tumoral de camundongos C57BL/6 tratados com PQM-162 e respectivos controles..... | 40 |
| Figura 9 - | Abundância relativa dos transcritos de mRNA em camundongos tratados com PQM-162 e respectivos controles..... | 42 |
| Figura 10 - | Ganho/perda de massa corporal (g) (A) e consumo hídrico relativo (mL/10g de massa corporal) (B) durante o período de tratamento com PQM-162..... | 44 |
| Figura 11 - | Massa relativa dos órgãos (g) dos animais tratados com PQM-162 e seus respectivos controles..... | 45 |
| Figura 12 - | Marcadores bioquímicos de função renal e hepática nos diferentes grupos de tratamento..... | 47 |
| Figura 13 - | Genotoxicidade em hepatócitos de camundongos C57BL/6 após 5 dias de tratamentos consecutivos..... | 48 |
| Figura 14 - | Citogenotoxicidade na medula óssea (A, C) e no sangue periférico (B e D) camundongos C57BL/6 tratados..... | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado utilizados nas reações de RT-PCR | 36 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| AKT | Proteína quinase B |
| ARID2 | Domínio de interação AT-Rico 2 |
| B16-F10 | Linhagem celular de fibroblastos de camundongos derivada de melanoma murino |
| <i>Bax</i> | Proteína associada a <i>Bcl-2</i> |
| <i>Bcl-2</i> | Linfoma de células B |
| BRAF | B-Raf proto-oncogene |
| β -catenina | Beta-catenina |
| <i>CASP3</i> | Caspase 3 |
| <i>CASP9</i> | Caspase 9 |
| C57BL/6 | Linhagem animal utilizada - <i>Mus musculus</i> |
| CDDP | Cis-diaminodicloroplatina II, cisplatina |
| <i>CDKN2A</i> | Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A |
| CHL-1 | Linhagem celular melanoma humano |
| COX-2 | Ciclo-oxigenase-2 |
| CYP450 | Citocromo P-450 |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DTIC | Dacarbazina |
| ENC | Eritrócitos normocromáticos |
| EPC | Eritrócitos policromáticos |
| ELISA | Ensaio de imunoadsorção enzimática |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| ERK | Quinase regulada extracelularmente |
| FCA | Focos de criptas aberrantes |
| HDACs | Histonas desacetilases |
| Hep G2 | Carcinoma hepatocelular |
| HIF-1 | Fator induzido por hipóxia 1 |
| HIF-1 α | Subunidade alfa do fator induzível de hipóxia 1 |
| HUVEC | Células derivadas do endotélio de veias do cordão umbilical humano |
| KIT | Proto-oncogene KIT |
| ip | Intraperitoneal |

| | |
|----------------|---|
| IL-1 β | Interleucina-1 beta |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| MEK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| MN | Micronúcleo |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| n | Número |
| NF- κ B | Fator nuclear kappa B |
| NRAS | N-Ras proto-oncogene |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RT-PCR | <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> |
| <i>p21</i> | Inibidor de cinase dependente de ciclina 1A |
| <i>p27</i> | Inibidor de cinase dependente de ciclina 1B |
| PCNA | Antígeno de proliferação nuclear celular |
| PCR | Reação de polimerização em cadeia |
| PeQuim | Grupo de Pesquisa em Química Medicinal |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-Quinase |
| PQM-162 | [(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N ² -(4-metoxibenzilideno) acrilidrazida] |
| sc | Subcutâneo |
| TERT | Transcriptase Reversa da Telomerase |
| TGO | Transaminase glutâmica oxalacética |
| TGP | Transaminase glutâmica pirúvica |
| TMZ | Temozolomida |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| TP53 | Proteína tumoral 53 |
| UNIFAL | Universidade Federal de Alfenas |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |

SUMÁRIO

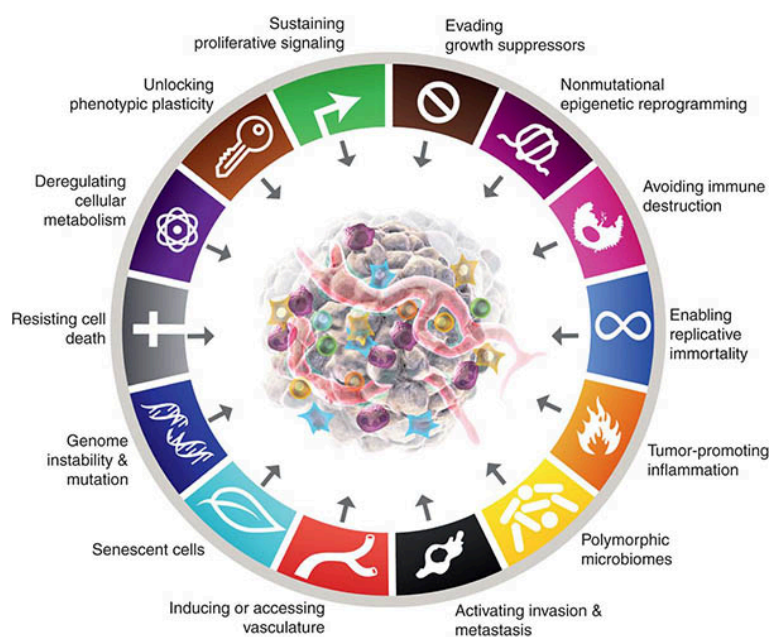
| | | |
|---------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 18 |
| 2.1 | MELANOMA CUTÂNEO..... | 18 |
| 2.2 | CISPLATINA NA TERAPÊUTICA DO MELANOMA..... | 20 |
| 2.3 | CURCUMINA, RESVERATROL E A MOLÉCULA HÍBRIDA..... | 23 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 29 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 29 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 29 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1 | PQM-162..... | 30 |
| 4.2 | CISPLATINA..... | 30 |
| 4.3 | ANIMAIS..... | 30 |
| 4.4 | LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO..... | 31 |
| 4.5 | INDUÇÃO TUMORAL..... | 31 |
| 4.6 | TRATAMENTOS..... | 31 |
| 4.7 | ATIVIDADE ANTITUMORAL..... | 32 |
| 4.8 | TOXICIDADE SISTÊMICA..... | 32 |
| 4.9 | GENOTOXICIDADE..... | 33 |
| 4.10 | MUTAGENICIDADE..... | 34 |
| 4.11 | INVESTIGAÇÃO DOS ALVOS MOLECULARES..... | 35 |
| 4.11.1 | Quantificação da expressão de transcritos de mRNA..... | 35 |
| 4.11.2 | Imuno-histoquímica..... | 36 |
| 4.12 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 37 |
| 5 | RESULTADOS..... | 38 |
| 5.1 | ATIVIDADE ANTITUMORAL..... | 38 |
| 5.2 | DOS ALVOS MOLECULARES..... | 39 |
| 5.3 | TOXICIDADE SISTÊMICA..... | 43 |
| 5.3.1 | Massa corporal, dos órgãos e consumo hídrico..... | 43 |
| 5.3.2 | Creatinina, ureia, TGO e TGP..... | 47 |
| 5.3.3 | Genotoxicidade..... | 47 |

| | | |
|-------|---------------------------|----|
| 5.3.4 | Mutagenicidade..... | 49 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 52 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 61 |
| | REFERÊNCIAS..... | 62 |
| | ANEXOS | 74 |

1 INTRODUÇÃO

Em definição, o câncer é uma doença de natureza multicausal, caracterizada por capacidades funcionais adquiridas pelas células à medida que passam de estado fisiológico normal para estado de crescimento neoplásico (Peters; Gonzalez, 2018). Essa alteração é causada pela associação entre suscetibilidade genética e fatores ambientais, que iniciam o processo de tumorigênese induzido por mutações genéticas (Hanssapour, Dehghani, 2017) com consequentes alterações fenotípicas em nível celular (Mbemi *et al.*, 2020). Após adquirirem o fenótipo mutado, as células tumorais compartilham características semelhantes no seu desenvolvimento e progressão, tais como: proliferação contínua e desordenada, resistência à morte celular (apoptose), evasão do sistema imune, indução de angiogênese, dentre outras (Figura 1) (Hanahan, 2022).

Figura 1 – Características adquiridas pelas células tumorais no decorrer do processo de transformação maligna.



Fonte: Hanahan; Weinberg (2022).

Legenda: Os autores Hanahan e Weinberg, apresentam 14 características adquiridas que, em conjunto, são responsáveis por tornar as células neoplásicas entre as quais podem ser mencionadas a sinalização proliferativa sustentada, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, potencial replicativo ilimitado, angiogênese e instabilidade genômica. Juntas, essas marcas permitem que as células cancerosas evitem os controles normais que regulam o crescimento e a divisão celular, permitindo que continuem a se dividir e proliferar, formando um tumor que pode invadir tecidos próximos e se espalhar para outras partes do corpo.

O câncer constitui uma das principais causas de mortalidade em escala global, ocupando a primeira ou segunda posição nos rankings de óbitos na maioria dos países (Soerjomataram; Bray, 2021). Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2024), essa doença representa um grave desafio para a saúde pública, impactando significativamente a expectativa de vida da população (Cao; Bray; Soerjomataram, 2018). Projeções indicam que, até 2030, a incidência de câncer atingirá aproximadamente 21 milhões de novos casos anuais, evidenciando a necessidade de estratégias eficazes para seu controle e tratamento (IARC, 2022).

Dentre os diversos tipos de câncer, o melanoma cutâneo destaca-se como uma neoplasia maligna altamente agressiva, com elevado potencial metastático e resistência intrínseca aos tratamentos quimioterápicos convencionais (Ghosh, 2019; Dhanyamraju; Patel, 2022). Em estágios avançados, a quimioterapia torna-se a principal modalidade terapêutica, com destaque para agentes como a dacarbazina (DTIC), a temozolomida (TMZ) e a cisplatina [CDDP - cis-diaminodicloroplatina (II)]. No entanto, apesar da comprovada eficácia desses fármacos, observa-se uma elevada toxicidade sistêmica e a ativação de mecanismos de resistência tumoral, o que limita sua eficácia clínica (Ghosh, 2019; Dhanyamraju; Patel, 2022).

Nesse contexto, compostos bioativos de origem natural e moléculas sintéticas derivadas de produtos naturais têm sido amplamente investigados como alternativas terapêuticas promissoras para o tratamento do melanoma. Essas substâncias atuam em vias moleculares específicas, mitigam os efeitos adversos associados à terapia convencional e modulam mecanismos de sinalização envolvidos na carcinogênese (Ijaz *et al.*, 2018; Dehelean *et al.*, 2021). Dentre os mecanismos propostos, destacam-se o aumento da capacidade de reparo do DNA, a indução do retardo no ciclo celular em células mutadas e a inibição de processos metastáticos (Dehelean *et al.*, 2021).

Entre os compostos naturais que têm demonstrado potencial antitumoral, temos como destaque para a curcumina e o resveratrol. A curcumina, um diarilheptanoide da subclasse dos fenóis presente no açafrão-da-terra, exibe atividades pró-apoptóticas, antioxidantes e antiproliferativas (Hashem *et al.*, 2022). Já o resveratrol, um estilbeno pertencente à classe das fitoalexinas, é encontrado em uvas, amendoins e frutas vermelhas, atuando como agente protetor contra estresses ambientais e invasões microbianas. Estudos recentes evidenciam suas propriedades antiproliferativas, antioxidantes, anti-inflamatórias e pró-apoptóticas, destacando seu potencial terapêutico no tratamento do melanoma (Lin *et al.*, 2020).

Considerando os efeitos promissores destacados na literatura para curcumina e resveratrol, nosso grupo de Pesquisa, sintetizou, a partir de técnicas de hibridização molecular, uma molécula híbrida de curcumina-resveratrol PQM-162 [(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- ((E)-4-metoxibenzilideno) acrilohidrazida] com o objetivo de melhorar a polaridade e biodisponibilidade, e conseqüentemente, a potencialização dos efeitos evidenciados anteriormente pelos fitoquímico precursores (De Freitas-Silva *et al.*, 2018). Neste sentido, este trabalho explorou os efeitos antitumorais da PQM-162 em sistema de monoterapia e terapia combinada com a cisplatina (CDDP), além de avaliar a toxicidade sistêmica dos tratamentos em camundongos C57BL/6 com melanomas induzidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MELANOMA CUTÂNEO

A pele é composta por duas camadas principais: a epiderme, camada superior constituída por células epiteliais e melanócitos pigmentados, e a derme, camada inferior que contém tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e outros tipos celulares (Perez *et al.*, 2022). A etiologia do câncer de pele está relacionada à proliferação anormal de células cutâneas, geralmente desencadeada por mutações genéticas e alterações epigenéticas que comprometem os mecanismos reguladores do ciclo celular (Dildar *et al.*, 2021).

O câncer de pele não melanoma, o mais frequente entre os cânceres de pele, origina-se na epiderme e pode ser classificado, de acordo com o tipo celular envolvido, como carcinoma de células escamosas (CEC) ou carcinoma basocelular (CBC). O CBC é o subtipo mais comum, responsável por cerca de 80 % dos casos de câncer de pele, enquanto o CEC é mais agressivo e está associado a um maior risco de metástases (Linares; Zakaria; Nizran, 2015; Skin Cancer Foundation, 2023).

Por outro lado, o melanoma cutâneo, embora menos frequente, é a forma mais agressiva de câncer de pele, apresentando altas taxas de mortalidade mundialmente. Ele caracteriza-se pela proliferação anormal de melanócitos na epiderme, com potencial de invasão para a derme subjacente e disseminação metastática. Os melanócitos, células dendríticas derivadas da crista neural, migram para a epiderme durante a embriogênese e são encontrados principalmente na camada basal da pele, na interface entre a epiderme e a derme (Marghoob; Liopyris; Jaimes, 2019; Wick, 2017). Sua principal função é a produção de melanina, que, ao ser transferida para os queratinócitos, protege o núcleo celular contra danos no DNA induzidos pela radiação ultravioleta (UV).

Fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma incluem histórico familiar da doença, exposição solar excessiva, queimaduras solares na infância e presença de lesões pigmentadas na pele, como nevos (pintas). Com relação ao risco individual, a suscetibilidade genética pode ser considerada como fator contribuinte, uma vez que cerca de 7 a 15 % do total de casos ocorre em indivíduos com antecedentes familiares (Leonardi *et al.*, 2018). Pintas adquiridas, especialmente aquelas com atipias em formato ou coloração, estão associadas a um maior risco de melanoma (Pereira *et al.*, 2015). Adicionalmente, variantes genéticas em genes como *CDKN2A*, *BRAF*, e *NRAS* têm sido identificadas como importantes

marcadores de predisposição ao melanoma, influenciando diretamente seu prognóstico e resposta ao tratamento (Yang *et al.*, 2020).

O melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna cuja incidência é mais prevalente em indivíduos de meia-idade, com uma idade média de diagnóstico de 57 anos. Observa-se um aumento linear na incidência da doença entre os 25 e 50 anos, com diferenças significativas entre os sexos. Mulheres jovens (25-40 anos) apresentam maior probabilidade de diagnóstico em comparação aos homens da mesma faixa etária. No entanto, após os 75 anos, a incidência é significativamente maior em homens e estes, possuem um risco até três vezes maior de desenvolver melanoma em relação às mulheres. Globalmente, homens têm uma probabilidade 1,5 vezes maior (Leonardi *et al.*, 2018).

De acordo com o relatório do INCA, estima-se que, entre 2023 e 2025, ocorram aproximadamente 9 mil novos casos de melanoma por ano no Brasil, configurando-se como um importante problema de saúde pública. Estudos indicam que até 90 % dos casos de melanoma poderiam ser evitados por meio de medidas eficazes de proteção solar e mudanças comportamentais, o que ressalta a relevância de políticas públicas voltadas à prevenção e à educação da população (Siegel, 2024).

O melanoma está associado a uma ampla gama de mutações somáticas que afetam genes-chave envolvidos na proliferação celular e na ativação de vias de sinalização, incluindo *BRAF*, *NRAS* e *NF1* (Leonardi *et al.*, 2018). Além disso, outras vias críticas são comprometidas, como aquelas relacionadas ao crescimento e metabolismo (*PTEN*, *KIT*), manutenção da identidade celular (*ARID2*), resistência à apoptose (*TP53*), regulação do ciclo celular (*CDKN2A*, que codifica p16INK4A e p14ARF) e replicação celular (*TERT*) (Hodis *et al.*, 2012). As vias de sinalização mais frequentemente alteradas no melanoma incluem MAPK, PI3K/AKT, KIT, além de vias relacionadas à apoptose e senescência celular (Vanni *et al.*, 2020).

O melanoma metastático apresenta resistência significativa aos tratamentos convencionais, como a quimioterapia, resultando em uma taxa de sobrevida em 5 anos inferior a 10 % para pacientes com a forma avançada da doença (O'neil; Scoggins, 2019; INCA, 2023). Historicamente, o tratamento do melanoma inclui cirurgia, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia, frequentemente em abordagens combinadas. No entanto, a quimioterapia clássica apresenta limitações consideráveis, como baixa taxa de resposta e efeitos adversos significativos decorrentes da bioacumulação dos fármacos no organismo (Domingues *et al.*, 2018).

Entre os agentes quimioterápicos mais utilizados no tratamento do melanoma metastático, destacam-se os compostos à base de platina, como a CDDP, que promove danos ao DNA, induzindo morte celular. Além disso, outros agentes alquilantes, como a TMZ e a DTIC, são amplamente empregados na prática clínica, no entanto, a eficácia limitada desses tratamentos impulsionou a busca por abordagens terapêuticas inovadoras (Mishra *et al.*, 2018).

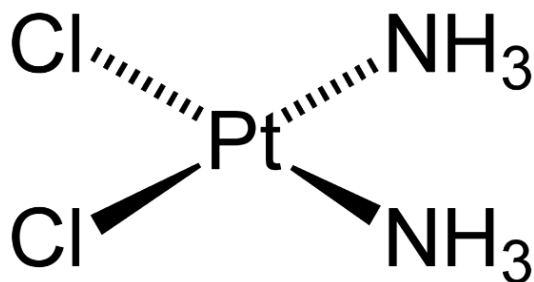
Diante dos desafios clínicos impostos pelo melanoma metastático, a pesquisa científica tem avançado na identificação de barreiras biológicas e no desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos tóxicas. Nos últimos anos, a imunoterapia emergiu como um dos pilares do tratamento do melanoma avançado, com o uso de inibidores de checkpoint imunológico, como os anticorpos monoclonais anti-CTLA-4 (ipilimumabe) e anti-PD-1 (nivolumabe e pembrolizumabe), que têm demonstrado melhora significativa na sobrevida global dos pacientes (Domingues *et al.*, 2020). Além disso, terapias-alvo, como os inibidores de *BRAF* (vemurafenibe, dabrafenibe) e *MEK* (trametinibe, cobimetinibe), oferecem opções terapêuticas promissoras para pacientes portadores de mutações específicas (Ullah *et al.*, 2022).

2.2 CISPLATINA NA TERAPÊUTICA DO MELANOMA

A síntese da CDDP teve início no século XIX, com o objetivo de quantificar seus efeitos inibitórios sobre a proliferação bacteriana (Ghosh, 2019). Após aproximadamente um século de estudos, determinou-se a eficácia deste composto no tratamento de diversos tipos de neoplasias, incluindo câncer de pulmão, bexiga, hepático, pele e outros (Rodríguez *et al.*, 2016).

A CDDP é caracterizada por sua estrutura de coordenação metálica com geometria molecular quadrada plana, na qual um átomo central de platina se liga a dois átomos de cloro e dois grupos amônia (Dasari *et al.*, 2014; Ghosh, 2019) (Figura 2). Essa configuração molecular é fundamental para sua atividade antitumoral, permitindo a interação com biomoléculas essenciais, como o DNA.

Figura 2 - Estrutura química da cisplatina
[CDDP -Cis-diaminodicloroplatina(II)].



Fonte: Barrabás *et al.*, 2008.

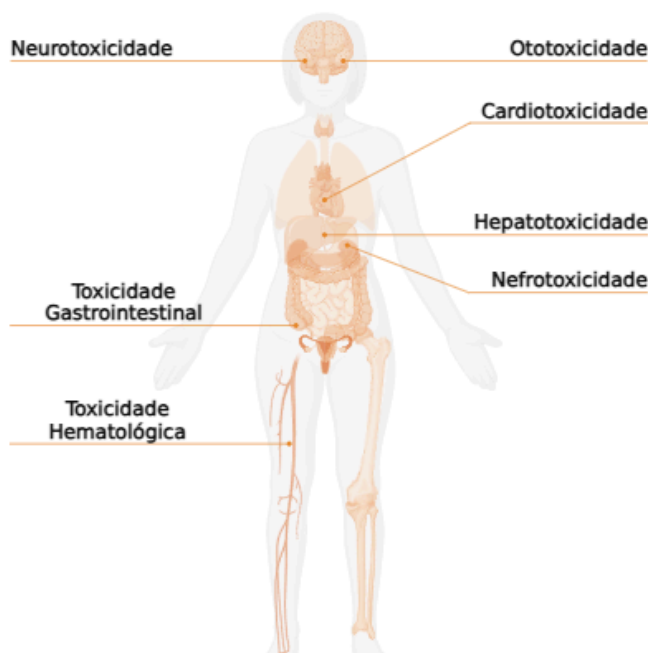
A atividade antitumoral exercida pela CDDP é realizada por meio da indução de apoptose, mediada por múltiplos mecanismos inter-relacionados. O principal mecanismo envolve a formação de adutos de DNA, nos quais a CDDP se liga covalentemente às bases de guanina (Dasari *et al.*, 2022), causando distorções na dupla hélice e interferindo na replicação e transcrição do DNA. Essas alterações estruturais desencadeiam defeitos no ciclo celular, ativam sistemas de reparo de DNA e, em casos de danos irreparáveis, levam à morte celular programada. Além disso, a CDDP promove a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que induzem estresse oxidativo e danificam componentes celulares essenciais, como membranas e proteínas. A ativação de vias apoptóticas também é facilitada por lesões na membrana celular e por sinais intracelulares decorrentes dos danos ao DNA. Esses mecanismos combinados conferem à CDDP uma potente atividade citotóxica (Galanski; Jakupec; Keppler, 2005; Siddik, 2003), consolidando seu papel como um dos quimioterápicos mais eficazes (Barrabás *et al.*, 2008) no tratamento de diversos tipos de câncer (Florea *et al.*, 2011; Ghosh, 2019).

Embora amplamente utilizada como agente antineoplásico no tratamento do melanoma, a CDDP apresenta modestas e imprevisíveis taxas de resposta, com duração limitada e rápida recidiva. Esses resultados são comparáveis aos observados em regimes de terapia isolada com quimioterápicos mais modernos, como a TMZ e a DTIC (Ernst; Giubellino, 2022; Gupta; Gomes; Lorigan, 2017).

No Brasil, a CDDP é um dos tratamentos mais comumente empregados na prática clínica, conforme diretrizes do Instituto Nacional de Câncer (INCA). O fármaco está disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) e é frequentemente utilizado em protocolos de quimioterapia para melanoma avançado, especialmente em casos onde outras terapias, como imunoterapia ou terapias-alvo, não estão disponíveis ou não são viáveis. Contudo, sua

administração está associada a efeitos colaterais significativos, decorrentes da bioacumulação do fármaco nos tecidos, o que eleva a toxicidade sistêmica. Entre os principais efeitos adversos (Figura 3) destacam-se a nefrotoxicidade (Aldossari, 2019), hepatotoxicidade (Crona *et al.*, 2017), neurotoxicidade (Avan *et al.*, 2015), cardiotoxicidade e mielossupressão (Ghosh, 2019).

Figura 3 – Principais efeitos adversos da cisplatina no organismo humano.



Fonte: Criado em <https://BioRender.com> pelo autor (2025).

Diante dos desafios relacionados à toxicidade e resistência aos fármacos, estratégias terapêuticas combinadas têm sido exploradas, seja por meio da associação com terapias clínicas em fase de teste ou pelo uso de produtos naturais com propriedades quimioprotetoras e sinérgicas, como a curcumina e o resveratrol. Esses compostos podem potencializar a eficácia da CDDP e, ao mesmo tempo, reduzir seus efeitos tóxicos (Hashem *et al.*, 2022; Lin *et al.*, 2020).

Embora tenham proporcionado discretos aumentos na eficácia do tratamento do melanoma metastático, essas estratégias não demonstraram ainda diferenças significativas na taxa de sobrevida média em comparação com o uso isolado da CDDP (Gupta; Gomes; Lorigan, 2017; Ernst; Giubellino, 2022). Isso ressalta a necessidade de investigar novas abordagens de quimioterapia envolvendo a aplicação de novas estruturas isoladas e combinadas para otimizar o tratamento do melanoma, visando reduzir a toxicidade

ocasionada pelo tratamento convencional a fim de melhorar os desfechos clínicos e a qualidade de vida dos pacientes.

2.3 CURCUMINA, RESVERATROL E A MOLÉCULA HÍBRIDA

A utilização de compostos bioativos, tais como flavonoides e antioxidantes, no contexto do câncer, é respaldada por investigações científicas contemporâneas, as quais têm delineado um extenso repertório de substâncias capazes de inibir a proliferação celular neoplásica, induzir apoptose e potencializar a eficácia da terapia convencional (Raskin *et al.*, 2002). Diversas dessas moléculas, muitas de origem botânica ou microbiana, têm demonstrado propriedades anticancerígenas significativas em ensaios pré-clínicos e clínicos (Peterle *et al.*, 2023).

A pesquisa em oncologia tem avançado progressivamente em direção a tratamentos personalizados, utilizando as propriedades específicas dessas moléculas para direcionar intervenções terapêuticas de acordo com as características genéticas do paciente e do tumor. Nesse sentido, a aplicação de compostos bioativos emerge como uma perspectiva terapêutica promissora no combate ao câncer, oferecendo alternativas mais eficazes e com menor incidência de efeitos adversos para os indivíduos afetados pela doença (Nabavi *et al.*, 2018). Essa abordagem representa um avanço significativo no campo da oncologia, ao integrar conhecimentos multidisciplinares que visam não apenas a eficácia terapêutica, mas também a redução dos impactos negativos associados aos tratamentos convencionais.

A curcumina é um metabólito secundário encontrado predominantemente na *Curcuma longa L.*, pertencente à família Zingiberaceae. Trata-se de um curcuminoide, um fenol natural da classe dos diarilheptanoides [1E,6E-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona]. Os efeitos benéficos da *C. longa* estão associados à presença dessa substância polifenólica lipofílica, responsável pela coloração amarelo-alaranjada de seus rizomas. Estudos têm demonstrado o potencial da curcumina em diversas atividades biológicas, incluindo ação antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória (Srimal e Dhawan, 1973; Satoskar *et al.*, 1986), anticancerígena (Kuttan *et al.*, 1985), antioxidante (Sharma, 1976; Toda *et al.*, 1985) e cicatrizante (Sidhu *et al.*, 1998; Negi *et al.*, 1999).

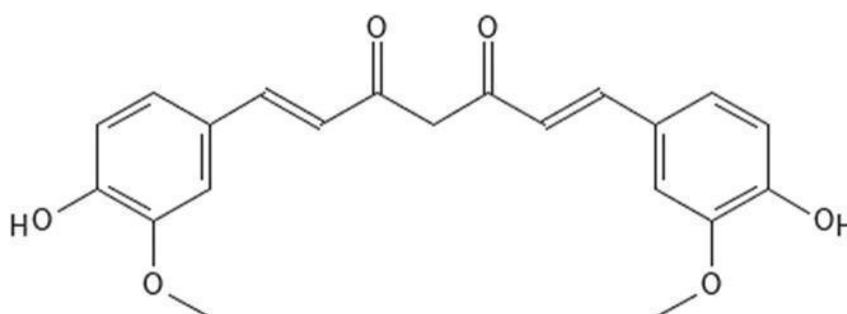
A estrutura química da curcumina é caracterizada pelo equilíbrio ceto-enólico, composta por dois sistemas de anéis aromáticos contendo grupos *o*-metoxifenol, interligados

por um ligante de sete carbonos que inclui uma porção β -dicetona α,β -insaturada (Figura 4) (Priyadarsini, 2014; Jackubczyk *et al.*, 2020).

A forma ceto, mais estável termodinamicamente, predomina em soluções aquosas ou em pH neutro, fenômeno explicado pela capacidade dos oxigênios carboxílicos atuarem como fortes aceptores de ligações de hidrogênio intermoleculares (De Freitas-Silva *et al.*, 2018; Strimpakos & Sharma, 2008), além de ser menos reativa quimicamente em comparação com a forma enol, o que pode influenciar em sua interação com alvos biológicos e sua eficácia terapêutica (Priyadarsini *et al.*, 2014). Esta também possui baixa absorção no corpo humano devido à pouca solubilidade em água e a presença de sítios lábeis ao metabolismo da substância faz com que a mesma tenha uma metabolização hepática rápida com alto teor de eliminação e instabilidade no pH intestinal, o que de fato limita sua ação terapêutica (Dudhatra *et al.*, 2012; Reuter *et al.*, 2011).

Figura 4 - Estrutura química da curcumina [1E, 6E

1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil) hepta-1,6- dieno-3,5-diona].



Fonte: Nabavi *et al* (2018).

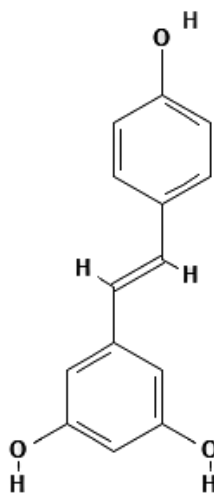
Estudos sobre a curcumina indicam seu potencial na terapia anticancerígena, com evidências demonstradas em análises *in vitro* (Chen *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2013) e *in vivo* (Zhou *et al.*, 2017), associadas a inibição de diferentes estágios da carcinogênese, incluindo promoção, angiogênese e crescimento tumoral, devido à sua capacidade de modular diversos alvos moleculares (Dosoky; Setzer, 2018). Entre seus mecanismos de ação, destacam-se a redução dos fatores de crescimento associados à tirosina quinase; a diminuição da expressão da ciclina D1 e a amplificação de genes-chave de supressão tumoral, como o *p53*; a redução da expressão de fatores de transcrição essenciais para a progressão tumoral, como β -catenina e *AP-1*; e, por fim, a diminuição da produção de citocinas inflamatórias que podem favorecer a progressão tumoral, como TNF- α (Tomeh; Hadianamrei; Zhao, 2019). Estudos *in vitro* em

linhagens de melanoma demonstraram que a curcumina inibiu o crescimento, a proliferação e a viabilidade celular, além de induzir a apoptose. Já em modelos *in vivo*, a curcumina levou à redução do volume tumoral, à supressão do crescimento e à inibição de atividades metastáticas (Navabi *et al.*, 2018).

O resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) foi isolado pela primeira vez em 1940 como constituinte das raízes do *Veratrum grandiflorum*, também encontrado naturalmente em uvas (Rocha-Gonzales *et al.*, 2008), framboesas, amendoins e outros (Tokuşoğlu *et al.*, 2005). Pertencente à subclasse dos estilbenos é um fenol natural, uma fitoalexina, substância química sintetizada em resposta a ataques de microrganismos, exposição à radiação UV e danos mecânicos, amplamente estudado por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e cardioprotetoras (Baur; Sinclair, 2006).

Estruturalmente, o resveratrol consiste em dois anéis fenólicos conectados por uma ponte de etileno, formando um esqueleto de estilbeno, com grupos hidroxila nas posições 3, 5 e 4' (Jang *et al.*, 1997) (Figura 5). A configuração *trans* do resveratrol é a forma biologicamente ativa mais comum, embora a forma *cis* também possa ocorrer sob certas condições, como exposição à luz ultravioleta.

Figura 5 - Estrutura química do *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno).



Fonte: Pubchem, 2024.

A presença dos grupos hidroxila no anel fenólico confere ao resveratrol a capacidade de neutralizar radicais livres e modular vias de sinalização celular, contribuindo para os efeitos benéficos na saúde (Rauf *et al.*, 2018). Estudos estruturais utilizando técnicas como cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN) têm elucidado a

conformação molecular e as interações do resveratrol com alvos biológicos, como proteínas e DNA (Piotrowska; Kucinska; Murias, 2012), que contribuem para os seus efeitos quimiopreventivos e cardioprotetores (Breuss; Atanasov; Uhrin, 2019) e outras propriedades que têm sido exploradas (Aluyen *et al.*, 2012; Rauf *et al.*, 2018).

Em um estudo realizado em 1997, demonstrou que a aplicação tópica de resveratrol protegeu camundongos da tumorigênese em um modelo de câncer de pele (Jang *et al.*, 1997). Quando analisados em experimentos *in vitro*, o resveratrol inibiu rotas de iniciação tumoral, atuando nas vias de progressão (Kalra *et al.*, 2008), promovendo parada do ciclo celular (Carter *et al.*, 2014) e levando à apoptose de células tumorais. O resveratrol também demonstrou diminuir a atividade de ligação ao DNA do fator nuclear κ B (NF- κ B) e impulsionar a transcrição de genes que retardam o crescimento tumoral (Roy *et al.*, 2009), essas propriedades foram demonstradas em cânceres de mama, cólon, próstata e pulmão, entre outros (Wu *et al.*, 2022).

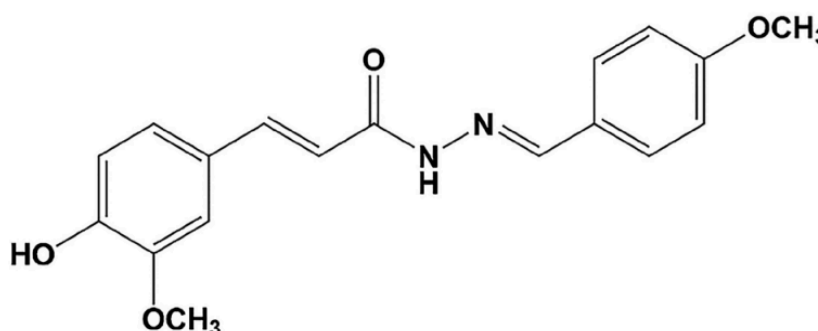
Estudos em seres humanos demonstraram que o resveratrol suprime a expressão de IGF-1 e IGFBP-3, proteínas de sinalização essenciais na carcinogênese, além de modular citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , e promover a metilação da PGE2, sugerindo efeitos antiproliferativos e anti-inflamatórios (Salehi *et al.*, 2018). Em pacientes com câncer colorretal, o resveratrol demonstrou atividade pró-apoptótica e aumento de marcadores de estresse oxidativo nos tecidos tumorais (Buhrmann *et al.*, 2016). Além disso, tem sido utilizado em associação com outros quimioterápicos com o objetivo de potencializar a atividade de fármacos convencionais, reverter a resistência e reduzir a toxicidade sistêmica decorrente do tratamento (Salehi *et al.*, 2018).

Apesar dos efeitos promissores, a principal dificuldade encontrada para aplicações mais específicas e eficientes do resveratrol consiste na baixa biodisponibilidade devido à sua baixa solubilidade, correlacionada à rápida metabolização no trato gastrointestinal (Bellina *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2019). Logo, a formulação de um híbrido de curcumina-resveratrol tornou-se uma forma de contornar os aspectos limitantes do resveratrol e da curcumina como a solubilidade e a biodisponibilidade (Posey, 2024). Nesse sentido, De Freitas e colaboradores (2018) realizaram a hibridização molecular para a junção das moléculas de resveratrol e curcumina e adição de novas subunidades, a partir da ligação da subunidade 3-metoxi-4-hidroxicinamilo da curcumina ao sistema O-substituído-fenil-conjugado do resveratrol gerando moléculas com estrutura química hídrice. Para isso, e para aperfeiçoar o revés da solubilidade e da absorção, dispuseram de um grupo funcional espaçador N-acil-hidrazona, o

qual promove uma maior polaridade e capacidade de doação e aceitação de locais de ligações de hidrogênio, favorecendo, dessa forma, propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Chen, 2015; De Freitas-Silva *et al.*, 2018; Neves *et al.*, 2012). Como resultado, a molécula híbrida denominada PQM-162 foi sintetizada (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura molecular de PQM-162

[(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxibenzilideno) acrilidrazida].



Fonte: De Freitas-Silva *et al.* (2018).

Legenda: O anel lateral da curcumina com sua hidroxila (-OH) e metoxila (-OCH₃) foram preservados, além de uma ligação dupla conjugada a uma cetona. A esta, foi adicionado um espaçador N-acilidrazônico, aumentando a polaridade, hidrossolubilidade, absorção e eficácia terapêutica da molécula. O anel do resveratrol, ligado ao espaçador, possui uma metoxila no lugar da hidroxila original racionalizado para aumentar sua capacidade antiproliferativa (De Freitas-Silva *et al.*, 2018).

O perfil de citotoxicidade de PQM-162 foi avaliado em linhagens celulares representativas de tumores humanos, incluindo HepG-2 (hepatocarcinoma humano), A549 (carcinoma de pulmão), MCF-7 (carcinoma de mama humano) e HT 144 (melanoma). Os resultados demonstraram que PQM-162 foi capaz de inibir o ciclo celular e induzir a apoptose nas células testadas. A seletividade foi verificada em linhagem normal de fibroblastos de pele (CCD 1059 Sk) e os resultados demonstraram um índice de seletividade significativo de 3,9. Interessantemente, esse índice se mostrou, inclusive, maior que o índice de seus precursores isolados (curcumina: 1,93 e resveratrol: 1,45).

No que se refere à análise do ciclo celular, foi observada uma redução da população celular em G₀/G₁ e S, e aumento concomitante da população G₂/M associado à capacidade do híbrido de intervir na dinâmica do alinhamento cromossômico e de perturbar a mitose e sua progressão. Os níveis dos transcritos, que codificam para o supressor de tumor *CDKN1A*, foram maiores nas amostras tratadas com PQM-162 em comparação com as amostras tratadas

concomitantemente com curcumina e resveratrol na mesma concentração (De Freitas-Silva *et al.*, 2018).

PQM-162 também se mostrou eficaz na redução de lesões pré-neoplásicas em cólons de ratos Wistar, modulando a expressão de genes envolvidos em vias inflamatórias, como *COX-2* e *TNF- α* , além de agir em vias que inibem a proliferação celular, demonstrando atividade quimiopreventiva e quimioterapêutica (Baptistella *et al.*, 2023).

Esses resultados indicam que a estrutura química inovadora PQM-162 possui um considerável potencial antitumoral, justificando a realização de novos estudos pré-clínicos que possam validar seu efeito antitumoral *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a atividade antitumoral da molécula híbrida (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxibenzilideno) acrilidrazida (PQM-162) em modelo de melanoma murino induzido.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a atividade antitumoral de em sistema de monoterapia (tratamento isolado);
- b) Investigar a atividade antitumoral em tratamento combinado com CDDP;
- c) Monitorar a toxicidade hepática, renal, na medula óssea e no sangue periférico;
- d) Elucidar os mecanismos moleculares subjacentes à atividade antitumoral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PQM-162

PQM-162 foi sintetizada e gentilmente cedida pelo Prof^o. Dr. Cláudio Viegas Júnior do grupo de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM), da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) conforme descrito por de Freitas-Silva *et al.*, 2018. PQM-162 foi utilizada na dose de 2 mg/kg peso corpóreo (pc) diluída em dimetilsulfóxido (DMSO 5 %) e água destilada no momento do uso. A escolha desta dose foi baseada em estudos anteriores realizados pela nossa equipe de pesquisa que demonstraram seu potencial na redução dos Focus de Criptas Aberrantes (FCA) do cólon de ratos Wistar (Baptistella *et al.*, 2023).

4.2 CISPLATINA

A cisplatina (CDDP) (CAS: 15663-27-1), (Sigma-Aldrich) foi utilizada na dose de 7 mg/kg pc, solubilizada em DMSO (5 %) e água destilada anterior à administração, ajustada após experimentos pilotos seguindo, inicialmente, as doses investigadas nos estudos de Rinaldi Neto *et al.*, 2021 e Cruz *et al.*, 2022.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados, para este experimento, camundongos machos da linhagem C57BL/6, espécie *Mus musculus*, com idade de 5 semanas e aproximadamente 23 g/pc. Os animais foram cedidos pelo Centro de Bioterismo da UNIFAL-MG e mantidos em caixas plásticas, em sala experimental, em condições de temperatura de (23 ± 2 °C), umidade (50 ± 10 %) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com acesso ad libitum à ração padrão e água, e monitoramento diário quanto às condições ambientais, físicas e comportamentais. Os protocolos de manuseio realizados neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG (Protocolo 0003/2022 – Anexo A).

4.4 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A linhagem celular derivada de melanoma murino (B16-F10) 6 (Ya *et al.*, 2015) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marcos Vinícios Salles Dias, do Laboratório de Biologia Molecular no Instituto de Ciências da Natureza da UNIFAL-MG.

As células foram mantidas em cultivo em meio de cultura *Eagle* Modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco) suplementado com 10 % de Soro Bovino Fetal (SBF), 1,2 g/mL de bicarbonato de sódio, 0,1 g/mL de estreptomicina e 0,06 g/mL de penicilina. O cultivo foi realizado em monocamada, em frascos de cultura descartáveis de 25 cm² de área a 36,5 °C em estufa úmida 5% de CO₂. A manutenção do cultivo foi feita por tripsinização. Para a indução tumoral, foram utilizadas células entre a 4^a e a 6^a passagens, com confluência celular de aproximadamente 90 %.

4.5 INDUÇÃO TUMORAL

A indução dos tumores foi realizada após uma semana de aclimação dos animais de acordo com os procedimentos descritos por Ferreira *et al* (2018). As células cultivadas foram, portanto, tripsinizadas com 2 mL de tripsina 0,01 % e, em seguida, foi realizada a viabilidade celular utilizando o método de Azul de Tripano em câmera de *Neubauer* para visualização e contagem das células que foi realizada em microscópio invertido (Levenhuk MED IM400KH model).

Células refringentes ou transparentes foram quantificadas como viáveis, enquanto as células azuis escuras, coradas devido às ligações com proteínas intracelulares em decorrência de danos de membrana foram quantificadas como não viáveis (Tsuboy *et al.*, 2007). Cerca de 7×10^5 células viáveis, ressuspendidas em 0,1 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de SBF foram inoculadas na região dorsolateral direita por via subcutânea (sc) após prévia tricotomização da região.

4.6 TRATAMENTOS

Após o tumor atingir um volume de aproximadamente 700 mm³, os tratamentos foram iniciados e administrados por via sc, na região do dorso (sc), a uma distância aproximada de 1 cm do tumor (Ferreira *et al.*, 2018; Rinaldi Neto *et al.*, 2021) em volume de 100 µL durante 5

dias consecutivos, uma vez ao dia. Os seguintes grupos foram estabelecidos: I. controle negativo (CN) (sem implante tumoral e sem tratamento); II. controle implante (CI) (com implante tumoral, sem tratamento); III. controle solvente (CS) (com implante tumoral e tratado com DMSO 5 % sc.); IV. CDDP (com implante tumoral e tratado com CDDP 7 mg/kg pc sc); V. PQM-162 (com implante tumoral e tratado com 2 mg/kg pc sc de PQM-162); VI. PQM-162 + CDDP (com implante tumoral e tratado com 2 mg/kg pc sc de PQM-162 + 7 mg/kg pc sc de CDDP).

Após 24 horas do último dia de tratamento, os animais foram anestesiados com uma solução contendo 100 µL de Cetamina 10 % (100 mg/kg pc) e Xilazina 2 % (10 mg/kg pc), via intraperitoneal (ip) para coleta de sangue via punção cardíaca. Posteriormente à confirmação da morte do animal, o tumor e demais órgãos/amostras foram coletados de destinados às análises descritas na sequência.

4.7 ATIVIDADE ANTITUMORAL

O efeito antitumoral foi diariamente acompanhando através do do cálculo do volume tumoral (mm^3) [comprimento (mm) x largura (mm) / 2], mensurado com o auxílio de um paquímetro (Ferreira *et al.*, 2018). Após eutanásia, o tumor foi extraído e a massa tumoral foi aferida em balança de precisão analítica.

4.8 TOXICIDADE SISTÊMICA

A massa corporal dos animais e dos órgãos, o consumo hídrico e alimentar e os biomarcadores de toxicidade hepática [transaminase oxalacética (TGO), transaminase pirúvica (TGP)] e renal [creatinina e ureia] foram utilizados como parâmetros para avaliação da toxicidade sistêmica. Adicionalmente, a toxicidade também foi monitorada, na medula óssea, no sangue periférico e nos hepatócitos em parâmetros adicionais que acompanham os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, conforme descrito nas seções seguintes. A massa corporal e foi diariamente avaliada com o uso de uma balança de precisão (MARTE BL3200H) e após a eutanásia, a massa dos órgãos foi aferido utilizando a mesma balança. O consumo hídrico foi diariamente avaliado pela diferença entre o volume final de água consumida no último dia e o volume inicial disponibilizado por grupo (~ 300 mL).

Para a quantificação bioquímica, amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca em tubos de coleta de sangue à vácuo com EDTA, centrifugadas a 3000 rpm por 10 min, para a separação do plasma. Foram utilizados os kits de creatinina cinética (1108 GtGroup), uréia enzimática (1132 GtGroup), TGO (1117 GtGroup) e TGP (1118 GtGroup) de acordo com as instruções do fabricante e com algumas adaptações. A quantificação foi realizada no analisador automático bioquímico de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a creatinina em 510 nm de comprimento de onda e, em espectrofotômetro (Hitachi High-tech, Tóquio, Japão) de cubeta para os demais em 580 nm para uréia e 340 nm para TGO e TGP.

4.9 GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade foi monitorada por meio do ensaio cometa alcalino em células do fígado. A obtenção dos hepatócitos foi realizada de acordo com Sasaki *et al.* (1997) e o ensaio seguiu o protocolo proposto por Tice *et al.* (2000) com modificações desenvolvidas por Burlinson *et al.* (2007) e revisadas pela OECD 489 (2016), além do protocolo de Collins *et al.* (2023). Após eutanásia, uma porção do fígado foi coletada (400 mg) e macerada em 1 mL de solução contendo DMSO (0,2 mL) e PBS (1,8 mL) e filtrada em gase, obtendo-se assim células únicas (Sasaki *et al.*, 1997). A citotoxicidade dos tratamentos foi avaliada previamente à realização do ensaio utilizando o método de exclusão por Trypan blue (Tsuboy *et al.*, 2007).

Cerca de 110 μ L da solução celular foi misturada com agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen, UltraPure 16520-050) e, em seguida, gotejadas em lâminas (Olen) previamente cobertas com um fina camada de agarose normal e cobertas com lamínula. Após gelatinização, a lamínula foi retirada e as lâminas permaneceram por 24 horas a 4 °C em solução de lise que consistiu em NaCl (2,5 M), EDTA (100 Mm), Tris (10 M), Lauril sarcosinato (L-4509 Sigma), Triton X-100 e DMSO. Na sequência, as lâminas foram previamente lavadas com PBS 1:10, dispostas sobre a cuba de eletroforese mantida em gelo e protegida da luz por 20 minutos em tampão alcalino (300 Mm NaOH + 1 Mm EDTA). Em seguida, procedeu-se com a corrida da eletroforese (25 volts e 300 mA). Ao final da corrida, foi utilizado um tampão de neutralização (Tris 0,4 M + Água deionizada) para realizar três lavagens consecutivas, com duração de 5 minutos cada. Posteriormente, as lâminas foram fixadas em álcool etílico por 10 minutos e colocadas para secagem. Todos os procedimentos foram realizados em ambiente escuro.

Para a análise, as lâminas foram coradas com 35 μ L de Gel Red diluído em água deionizada (1 μ L/1100 μ L) e recobertas com lamínulas. A visualização dos danos no DNA foi

realizada utilizando um microscópio de fluorescência BX53 (Olympus) com aumento total de 400x. As imagens foram capturadas e analisadas por meio do software ImageJ, utilizando o plugin OpenComet. Os danos ao DNA foram quantificados em 100 nucleóides por animal, avaliados com base na porcentagem de DNA presente na cauda do cometa.

4.10 MUTAGENICIDADE

O ensaio do micronúcleo foi realizado em células da medula óssea e do sangue periférico para avaliar a mutagenicidade dos tratamentos.

Para a coleta de sangue periférico, os animais foram imobilizados individualmente e, após anestesia com lidocaína na ponta da cauda, foi realizado um pequeno corte e uma gota de sangue foi gotejada na lâmina de acordo com Oliveira *et al.* (2024). Em seguida, foi realizado o esfregaço sanguíneo que após seco, foi fixado em metanol por 5 minutos e corado Giemsa diluído em tampão fosfato (pH 6,8) 1:10 por 25 minutos.

Para obtenção de células da medula óssea foi realizada a técnica de Macgregor *et al.* (1987). Após a eutanásia, os fêmures foram retirados e o conteúdo medular foi extraído com o auxílio de uma seringa e depositado em SBF. O material coletado foi centrifugado a 1.000 rpm por 5 minutos e, com uma pipeta *Pasteur* o sobrenadante foi retirado e do *pellet* de células, uma gota foi depositada em lâmina limpa e seca para confecção do esfregaço. Posteriormente, o material foi fixado em metanol durante 5 minutos, e as lâminas foram coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato (pH 6,8) na proporção 1:30 por 5 minutos.

A análise foi realizada em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) de campo claro na objetiva de 100x. A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) foi determinada a partir da análise de 2000 PCEs por animal. A citotoxicidade dos tratamentos foi monitorada utilizando-se as mesmas lâminas utilizadas para quantificação da frequência de EPCMNs tendo sido realizada por meio da análise de 2.000 eritrócitos totais por animal onde foi determinada a razão de EPC (eritrócitos policromático) / EPC+ENC (eritrócitos normocromáticos) (Hayashi *et al.*, 2000; OECD, 2016).

4.11 INVESTIGAÇÃO DOS ALVOS MOLECULARES

4.11.1 Quantificação da expressão de transcritos de mRNA

A expressão de transcritos de mRNA envolvidos em diversas vias-alvo que dizem respeito ao processo de tumorigênese foram avaliados, no tecido tumoral, pela técnica da *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) Foram escolhidos reguladores apoptóticos (*Bcl-2* e *Bax*; *Caspase 3* e *9*) e de ciclo celular (*p21* e *p27*) (Tabela 1).

Após a eutanásia dos animais, o tecido tumoral foi removido e armazenados com em freezer - 80°C. A quantificação do RNA total foi realizada por leitura espectrofotométrica utilizando o NanoDrop® ND1000 (*Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA*). Em seguida, foi realizada a incubação do RNA total com DNase, por 15 min em termociclador a 37°C, a fim de se eliminar possível contaminação com DNA genômico. Feito isso, o RNA total foi, então, submetido à reação de transcrição reversa utilizando *Random primers* e *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (*Applied Biosystems, São Paulo, 186 SP, Brasil*), conforme as instruções do fabricante. Ressalta-se que, todos os reagentes foram incubados a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e então, 85 °C por 5 min para promover a inativação da enzima.

A expressão dos genes alvo foi investigada utilizando o sistema *Power Sybr*®*Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, São Paulo, SP, 191 Brasil*) no ABI Prism 7500 Sequence Detection System (*Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil*). Todas as reações foram efetuadas obtendo-se um volume final de 25 µL e os genes foram amplificados seguindo as seguintes condições experimentais: 95 °C por 10 min (1 ciclo), desnaturação a 95°C por 10 segundos, seguido pelo anelamento a 60 °C e extensão por 1 min (40 ciclos). A normalização dos valores de expressão dos genes alvo foi realizada utilizando a expressão do gene constitutivo β -actina. O método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência foi empregado para calcular a expressão relativa de cada gene e, uma amostra controle foi usada como calibradora (PFAFFL, 2001), sendo esta o tumor coletados dos controles implantes, para uma quantificação arbitrária.

Os valores médios de eficiência para cada gene foram mensurados através do perfil de amplificação de cada amostra, através do auxílio do programa LinRegPCR (Ramakers et al.2003, Baptistella et al. 2023 e Oliveira et al. 2023. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado utilizados nas reações de RT-PCR.

| Transcrito | Primers | Tamanho (pb) |
|---------------|--|--------------|
| <i>CASP 9</i> | F: 5' GGCTTCATTTGGTTGGTTGG 3' R: 5' GGCCAGAACTTGGGAATAAGA 3' | 99 |
| <i>p21</i> | F: 5' CCTGGTGATGTCCGACCTG 3' R: 5' CCATGAGCGCATCGCAATC 3' | 103 |
| <i>p27</i> | F: 5' AGTGTCCCTTTCGGTAAGAATG 3' R: 5' TCAGAACCTCCAAGTGAGAATAAG 3' | 118 |
| <i>Bcl-2</i> | F: 5' ATGCCTTTGTGGAAGTATATGGC 3' R: 5' GGTATGCACCCAGAGTGATGC 3' | 120 |
| <i>Bax</i> | F: 5' GGAGATGAACTGGACAGCAATA 3' R: 5' GAAGTTGCCATCAGCAAACAT 3' | 117 |
| <i>CASP 3</i> | F: 5' TGGTGATGAAGGGGTCATTTATG 3' R: 5' TTCGGCTTCCAGTCAGACTC 3' | 105 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: F: forward primer (sense); R: reverse primer (antisense); pb: pares de base; *Casp 9*: Caspase 9; *p21*: CDKN1A (Inibidor de cinase dependente de ciclina 1A); *p27*: CDKN1B (Regulador do Ciclo Celular); *Bcl-2*: Linfoma de células B; *Bax*: Proteína X associada a *Bcl-2*; *Casp 3*: Caspase 3.

4.11.2 Imuno-histoquímica

A quantificação da expressão de proteínas foi realizada por imuno-histoquímica de acordo com os procedimentos publicados por Baptistella *et al.* (2023) e Oliveira *et al.* (2023), com modificações. Amostras dissecadas do tecido tumoral foram mantidas em solução de paraformaldeído por 24 horas, seguida de álcool 70 % até o início do processo de inclusão em parafina. Durante essa etapa, as amostras foram submetidas a uma série de banhos sequenciais em álcool e xilol para desidratação, seguidos por um banho em parafina a 60 °C durante uma noite em estufa. No dia seguinte, os tumores foram emblocados em Paraplast Plus (Leica, ref. 39601006) e cortes histológicos com espessura de 4 a 5 µm foram realizados em lâminas silanizadas.

Inicialmente, procedeu-se à desparafinização do material em estufa a 60°C por uma hora, seguida de banhos sequenciais em xilol e etapas de reidratação. Posteriormente, foi realizada a recuperação antigênica por meio da manipulação das lâminas em tampão citrato 10 mM (pH 6,0) aquecido (80 °C) em panela elétrica com água por 20 minutos. Na sequência as lâminas foram lavadas com *Tris-buffered saline with Tween® 20* (TBST) por 5 minutos.

Foi realizado também a retirada da melanina, na qual os materiais são mantidos em solução de permanganato de potássio 0,5 % por 30 minutos, e submersas por 30 segundos em solução de ácido oxálico 5 %. Para reduzir marcas inespecíficas, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio de incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3 % por 10 minutos. Adicionalmente, o bloqueio de proteínas inespecíficas foi resolvido com a incubação das lâminas por 10 minutos em solução de leite desnatado a 5 %, preparado em TBST ajustado a pH 7,6.

Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas em TBST e incubadas, durante a noite, com o anticorpo primário direcionado à antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab29; monoclonal) na diluição de 1: 2000 e β -catenina (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab32572; monoclonal): diluição 1: 1000. No dia seguinte as amostras foram lavadas e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário IgG anti-coelho produzido em cabras e conjugado com peroxidase (Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP, Aguilent, Santa Clara, CA, USA).

A coloração foi realizada utilizando 3,3'-diaminobenzidina (DAB) a 0,5 % por 30 minutos, seguida de contra-coloração com hematoxilina de Harris (100 %) filtrada, por 7 segundos. Em seguida, as lâminas foram submetidas a três lavagens consecutivas em água destilada e cobertas com resina Entellan e lamínula.

A expressão protéica foi avaliada de forma semi-quantitativa utilizando imagens capturadas em microscopia óptica com aumento de 400x. A análise foi realizada no software ImageJ Fiji® (versão 1.2; WS Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD), seguindo os princípios metodológicos descritos de acordo com Crowe e Yue (2019).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

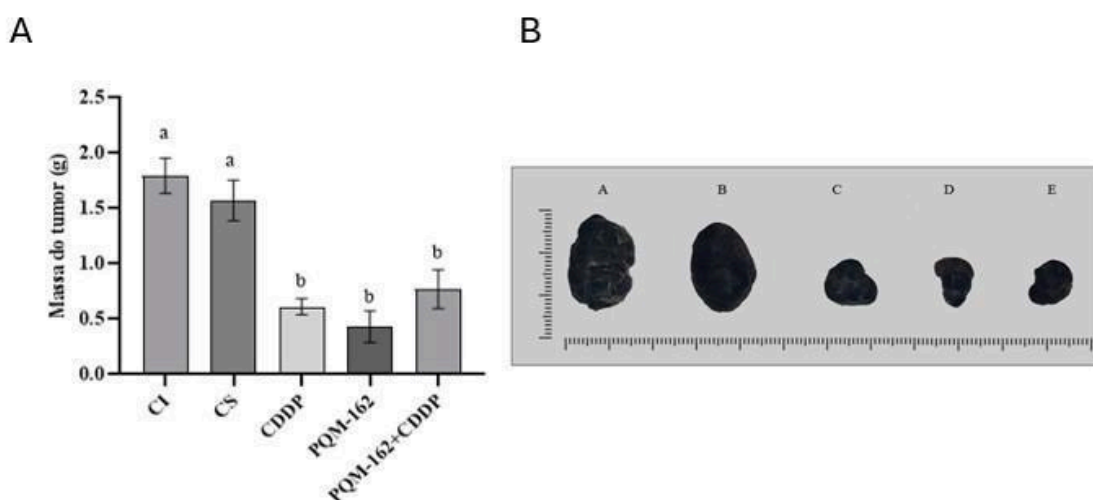
Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (One-way ANOVA) para experimentos inteiramente aleatorizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “p-value”. Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$, utilizando o programa Graph Pad Prism (Versão 8.4.3).

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE ANTITUMORAL

A Figura 7A e B apresenta os resultados da redução da massa tumoral (g) após cinco dias de tratamento com PQM-162 e seus controles. A massa tumoral formada apresentou consistência gelatinosa, com margens não totalmente claras e morfologia variando entre ovóides ou esféricos (Figura 7B). Os resultados obtidos demonstraram diferenças significativas na redução da massa tumoral em todos os grupos de tratamento testados, exceto no CI e CS que não apresentaram diferenças estatísticas entre si. O grupo CDDP apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos CI e CS. Os animais tratados com a molécula teste PQM-162 tiveram uma redução significativa na massa tumoral em comparação com CI e CS, inclusive não diferindo significativamente do grupo tratado com CDDP. A coadministração de PQM-162 com CDDP demonstrou redução significativa na massa tumoral quando comparado com os grupos CI, CS e CDDP. Essa redução na massa tumoral foi de 64,77; 76 e 70 % para PMQ-162 combinado com CDDP, CDDP e PQM-162, respectivamente (Figura 7A e B).

Figura 7 - Massa tumoral (g) (A) e fotomicrografia representativa (B) dos tumores nos diferentes grupos de tratamento.



Fonte: do autor (2025).

Legenda: (A) Gráfico das massas tumorais em g. (B) Imagem representativa da atividade antitumoral média em cm. CI - Controle implante; CS - Controle solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 5%; CDDP - Cisplatina 7 mg/kg/peso corporal (pc) subcutâneo (sc); PQM-162 (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxibenzilideno) acrilidrazida 2 mg/kg/pc sc). Os

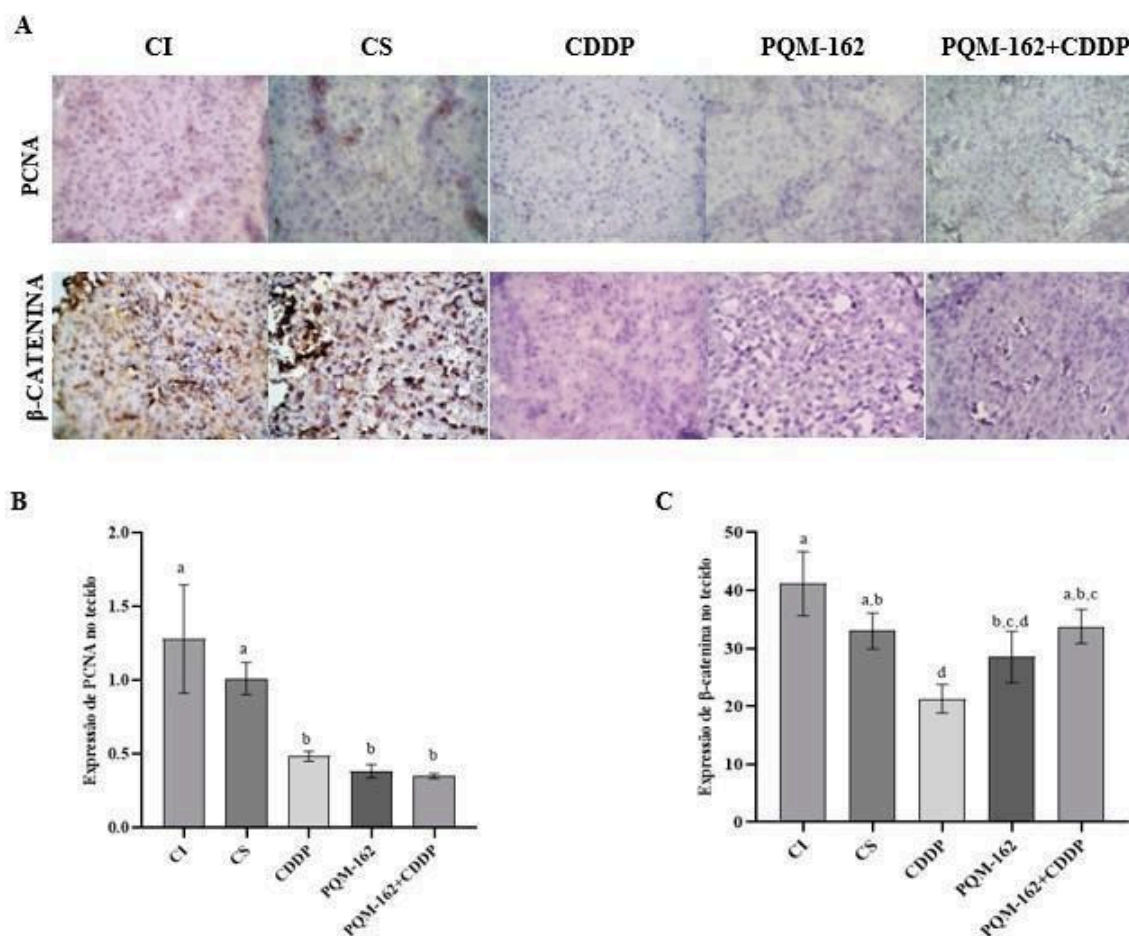
valores são média \pm desvio padrão (n=5). Barras com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si Referência para $p \leq 0,05$ (ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey).

5.2 DOS ALVOS MOLECULARES

A análise imuno-histoquímica do tecido tumoral de camundongos C57BL/6 tratados com PQM-162 e seus respectivos controles revelou diferenças significativas na expressão das proteínas PCNA e β -catenina (Figura 8A-C).

Na fotomicrografia apresentada na Figura 8A, observa-se que a expressão de PCNA é mais evidente nos grupos controle (CI e CS), enquanto os grupos tratados com CDDP, PQM-162 e a combinação PQM-162+CDDP apresentam menor marcação, indicando uma redução na proliferação celular. Essa tendência é confirmada pela quantificação absoluta mostrada na Figura 8B, onde os grupos CI e CS exibem valores significativamente mais elevados de PCNA em comparação aos grupos tratados (CDDP, PQM-162 e PQM-162+CDDP), os quais não diferem estatisticamente entre si. A redução da expressão de PCNA foi de aproximadamente 69 % e 72 % para os grupos tratados com PQM-162 e PQM-162+CDDP respectivamente quando comparado ao CI, enquanto a cisplatina reduzir a marcação de PCNA em 58,63 % (Figura 8A e B).

Figura 8 – Quantificação imuno-histoquímica no tecido tumoral de camundongos C57BL/6 tratados com PQM-162 e respectivos controles.



Fonte: do autor, 2025.

Legenda: (A) Fotomicrografia ilustrativa representando a expressão de PCNA e β-catenina em pixels 2080 x 1540, em (B) quantificação absoluta de PCNA e (C) de β-catenina. PCNA – antígeno de proliferação celular; CI - Controle implante; CS - Controle solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 5 %; CDDP - Cisplatina 7 mg/kg/peso corporal (pc) subcutâneo (sc); PQM-162 (E)- 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxibenzilideno) acrilidrazida 2 mg/kg/pc sc). Os valores são média ± desvio padrão (n=5). Barras com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si Referência para $p \leq 0,05$ (ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey).

Em relação à expressão de β-catenina (Figura 8A), os grupos CI e CS apresentam maior marcação imuno-histoquímica quando comparados ao grupo CDDP, o qual demonstra a menor expressão dessa proteína. A quantificação absoluta da β-catenina (Figura 8C) corrobora essa observação, evidenciando uma redução estatisticamente significativa da

expressão no grupo CDDP em relação aos demais. Os grupos tratados com PQM-162 e PQM-162+CDDP apresentam valores intermediários de β -catenina, sendo estatisticamente superiores ao grupo CDDP, porém inferiores ao grupo CI. A redução da expressão de β -catenina foi de aproximadamente 30,8 % e 18,1 % para os grupos tratados com PQM-162 e PQM-162+CDDP respectivamente quando comparado ao CI, enquanto a cisplatina reduziu a marcação de em 51,1 % (Figura 8A e B).

A análise da abundância relativa dos transcritos de mRNA em camundongos tratados com PQM-162 foi realizada a fim de investigar quais seriam os transcritos envolvidos na redução da proliferação celular revelada pela imuno-histoquímica. De modo geral, os resultados demonstraram alterações significativas nos níveis de expressão relativa de transcritos envolvidas na regulação da apoptose e do ciclo celular (Figura 9A-G).

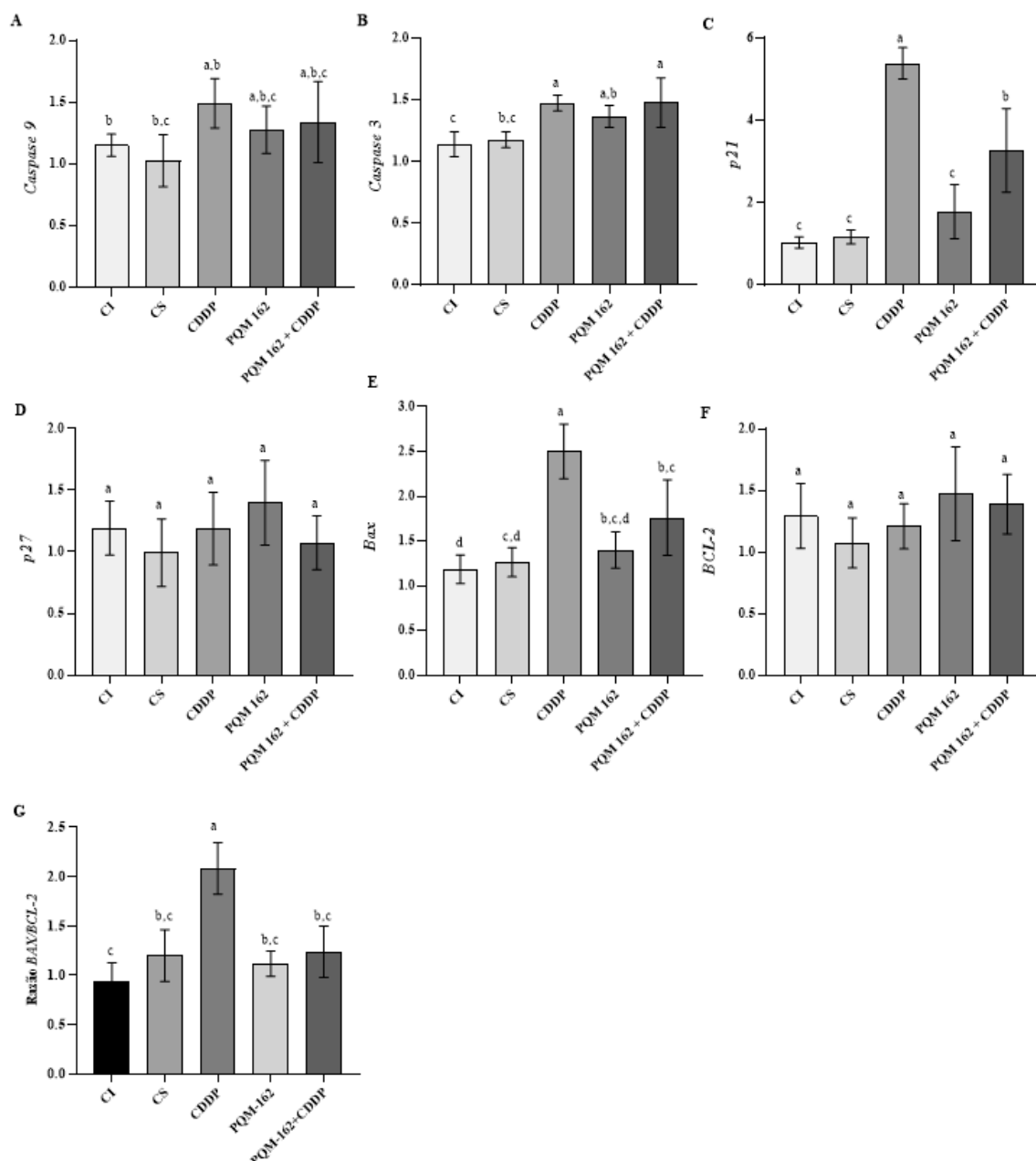
A expressão de *Caspase 3* (Figura 9A) foi significativamente maior nos grupos tratados com CDDP, PQM-162 e PQM-162+CDDP em comparação ao grupo CS, indicando uma maior ativação da via apoptótica. O grupo CI apresentou os menores níveis de expressão da caspase, diferindo estatisticamente dos demais (exceto do CS) (Figura 9A). A *Caspase 9* (Figura 9B) seguiu um padrão semelhante, com níveis mais elevados nos grupos tratados (CDDP, PQM-162 e PQM-162+CDDP) em comparação ao CS.

Em relação aos reguladores do ciclo celular, observou-se um aumento expressivo na expressão de *p21* (Figura 9C) no grupo tratado com CDDP, que foi significativamente maior do que nos demais grupos. O grupo tratado com PQM-162 apresentou uma expressão significativamente menor do que o grupo tratado com CDDP, inclusive não se diferenciando da expressão dos grupos CI e CS. O grupo tratado com PQM-162+CDDP apresentou uma expressão intermediária de *p21*, superior à dos controles, mas inferior à do grupo CDDP (Figura 9C). Já os níveis de *p27* (Figura 9D) permaneceram relativamente constantes entre os grupos, sem diferenças estatísticas significativas.

A expressão do gene pró-apoptótico *Bax* (Figura 9E) foi significativamente elevada no grupo tratado com CDDP, sendo superior à dos demais grupos. O tratamento com PQM-162+CDDP resultou em um nível intermediário de expressão, significativamente maior que o dos controles (CI e CS), mas inferior ao do grupo CDDP. O grupo tratado com PQM-162 apresentou uma expressão significativamente menor do que o grupo tratado com CDDP, não se diferenciando da expressão dos grupos CI e CS. A expressão do gene antiapoptótico *Bcl-2* (Figura 9F) não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais. No entanto, a razão *Bax/Bcl-2* (Figura 9G) foi significativamente maior no

grupo tratado com CDDP em comparação aos demais grupos. Os grupos tratados com PQM-162 e PQM-162+CDDP apresentaram uma razão *Bax/Bcl-2* que não se diferenciou significativamente dos grupos CI e CS (Figura 9G).

Figura 9 - Abundância relativa dos transcritos de mRNA em camundongos tratados com PQM-162 e respectivos controles.



Fonte: do autor (2025).

Legenda: Em (A) *Caspase 3*, (B) *Caspase 9*, (C) *p21*, (D) *p27*, (E) *Bax*, (F) *Bcl-2* e (G) Razão

Bax/Bcl-2. CI - Controle implante; CS - Controle solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 5 %; CDDP - Cisplatina 7 mg/kg/peso corporal (pc) subcutâneo (sc); PQM-162 (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxibenzilideno) acrilidrazida 2 mg/kg/pc sc). Os valores são média \pm desvio padrão (n=5). Barras com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si. Referência para $p \leq 0,05$ (ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey).

5.3 TOXICIDADE SISTÊMICA

5.3.1 Massa corporal, dos órgãos e consumo hídrico

A Figura 10, apresenta os resultados de ganho/perda de massa corporal (A) e o consumo hídrico (B) dos animais nos diferentes grupos após 5 dias consecutivos de tratamento. Os valores acima de zero representam ganho de massa corpórea e, abaixo, perda de massa corpórea durante o período de tratamento (Figura 10A). A taxa de sobrevivência dos animais foi de 100 % em todos os grupos.

Os grupos CN, CI, CS e PQM-162 não apresentaram ganho/perda de massa corporal significativa. Os grupos tratados com CDDP e PQM-162+CDDP demonstraram perda de peso significativa quando comparados entre si e aos demais grupos de tratamento. De modo geral, o grupo tratado com a molécula híbrida PQM-162 isolada apresentou um ganho de peso corporal de 8,34 % durante o período do tratamento. Em contraste, o grupo tratado com CDDP apresentou uma perda de peso corporal de 17 % (aproximadamente 4 g) em comparação aos grupos CN e CI, indicando alta toxicidade do tratamento. O grupo tratado com a combinação de PQM-162 e CDDP apresentou uma perda de peso corporal de 9 % em relação aos grupos CN e CI (Figura 10A).

Quanto ao consumo hídrico (Figura 10B), os resultados demonstraram que o grupo tratado com PQM-162 apresentou um consumo médio de cerca de 36,43 mL/10g enquanto o grupo tratado com CDDP consumiu uma média aproximada de 42,50 mL/10g, revelando um aumento significativo no consumo. Por outro lado, a combinação PQM-162+CDDP resultou em uma redução expressiva no consumo hídrico para cerca de 22 mL/10g, sendo significativamente menor que todos os demais grupos.

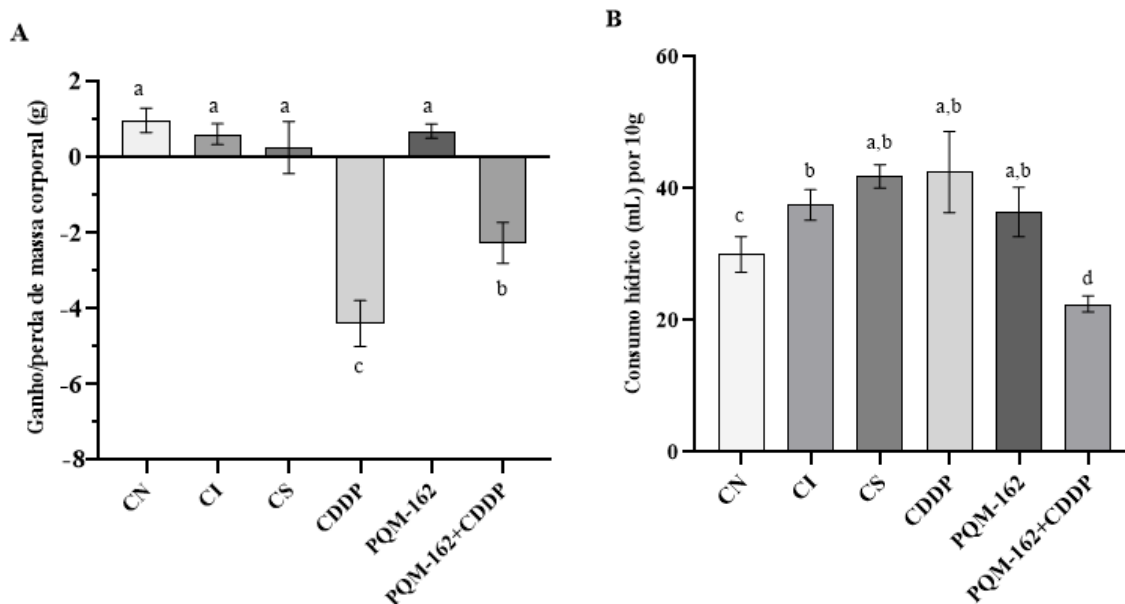
A massa relativa dos diferentes órgãos como fígado, baço, rins, coração, estômago, cérebro e pulmões foi calculada para cada 10 g da massa corporal é utilizada como parâmetro adicional entre as interpretações de toxicidade sistêmica (Figura 11A-G). A massa relativa do fígado não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CS e CI. No entanto, o grupo tratado com CDDP e PQM-162 isolados apresentaram uma leve redução,

enquanto o grupo tratado com PQM-162 + CDDP demonstrou redução significativa na massa do órgão quando comparado aos demais grupos, exceto ao CN (Figura 11A).

A massa relativa do rim foi menor nos grupos tratados com cisplatina e PQM-162 + CDDP em comparação aos grupos CS e CI (Figura 11B). Comportamento similar foi demonstrado para o baço (Figura 11C). A massa relativa do coração (Figura 11 D) e estômago (Figura 11 G) não apresentou variações significativas entre os grupos, indicando que os tratamentos não influenciaram diretamente nesses órgãos. A massa relativa do pulmão foi menor nos grupos CS e CI em comparação ao grupo tratado com PQM-162 + CDDP, que apresentou aumento significativo.

Nos animais tratados com PQM-162 não houveram diferenças significativas quando comparados aos grupos controles (Figura 11E). No que diz respeito ao cérebro, o grupo tratado com PQM-162 não demonstrou diferença significativa em relação aos demais tratamentos, já sobre os animais combinados com a CDDP foi demonstrado que houve uma redução significativa (Figura 11F).

Figura 10 – Ganho/perda de massa corporal (g) (A) e consumo hídrico relativo (mL/10g de massa corporal) (B) durante o período de tratamento com PQM-162.

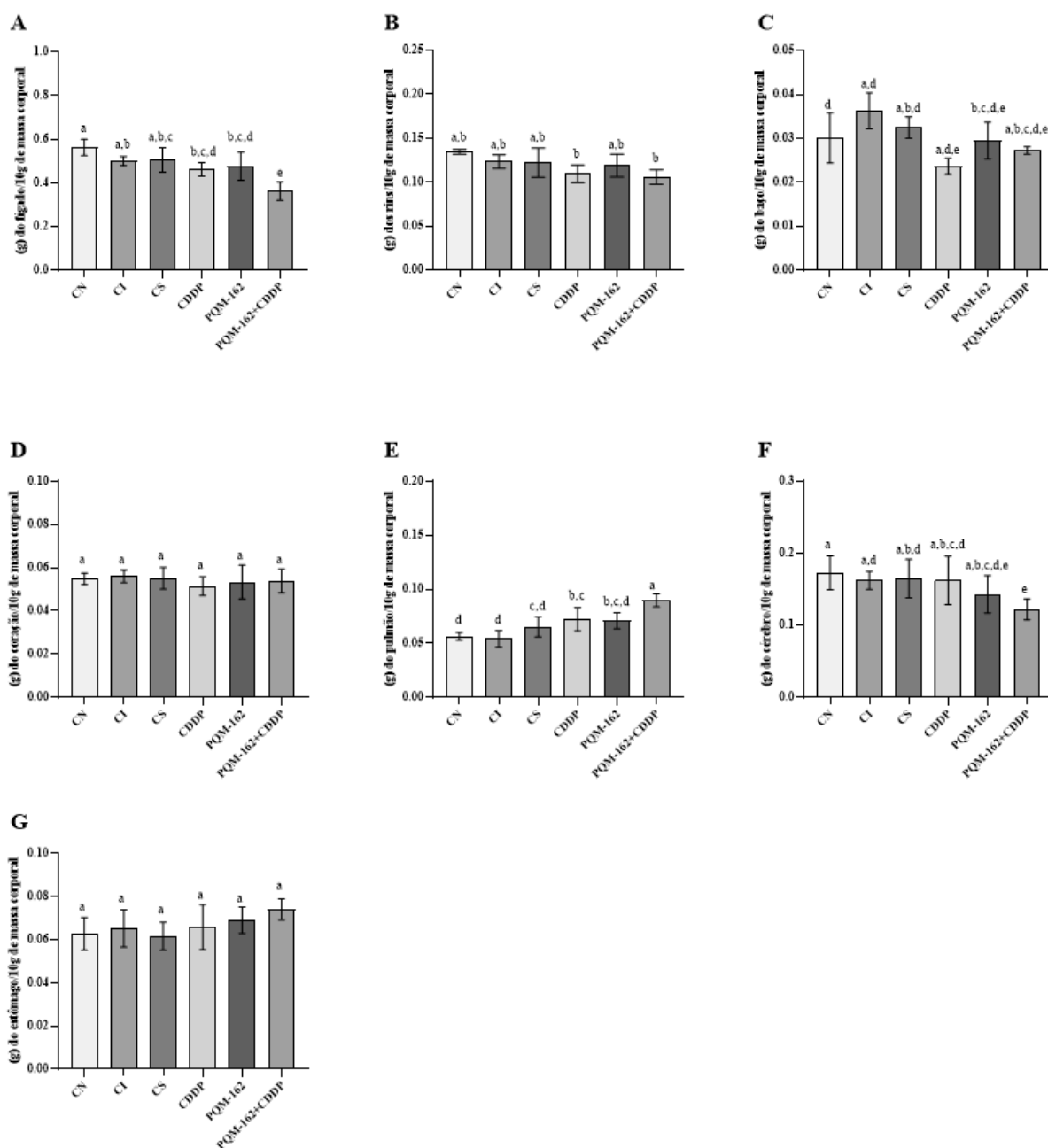


Fonte: do autor (2025).

Legenda: CI - Controle implante; CS - Controle solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 5%; CDDP - Cisplatina 7 mg/kg/peso corporal (pc) subcutâneo (sc); PQM-162 (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxibenzilideno) acrilidrazida 2 mg/kg/pc sc). Os

valores são média \pm desvio padrão (n=5). Barras com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si. Referência para $p \leq 0,05$ (ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey).

Figura 11 - Massa relativa dos órgãos (g) dos animais tratados com PQM-162 e seus respectivos controles.



Fonte: do autor (2025).

Legenda: Em (A) Fígado, (B) Rim, (C) Baço, (D) Coração, (E) Pulmões, (F) Cérebro e (G) Estômago. CI - Controle implante; CS - Controle solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 5 %; CDDP - Cisplatina 7 mg/kg/peso corporal (pc) subcutâneo (sc); PQM-162 (E)-

3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxibenzilideno) acrilidrazida 2 mg/kg/pc sc). Os valores são média \pm desvio padrão (n=5). Barras com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si. Referência para $p \leq 0,05$ (ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey).

5.3.2 Creatinina, ureia, TGO e TGP

Biomarcadores de toxicidade renal e hepática foram quantificados no soro dos roedores e os resultados estão apresentados na Figura 12 (A-D). Os níveis séricos de creatinina foram significativamente elevados no grupo tratado com CDDP, apresentando a maior média entre os grupos. Os grupos controle CN, CI, CS exibiram valores significativamente inferiores, enquanto o grupo tratado com PQM-162 apresentou níveis moderadamente elevados. O grupo que recebeu a combinação PQM-162 + CDDP apresentou valores reduzidos em comparação à cisplatina CDDP (Figura 12 A). Na Figura 12B, os níveis séricos de ureia também foram mais elevados no grupo CDDP, diferindo significativamente dos demais grupos. Os grupos controle CN, CI, CS e os grupos tratados com PQM-162, isolado ou em combinação com CDDP, apresentaram valores similares entre si, significativamente inferiores ao grupo CDDP, indicando um possível efeito nefroprotetor de PQM-162.

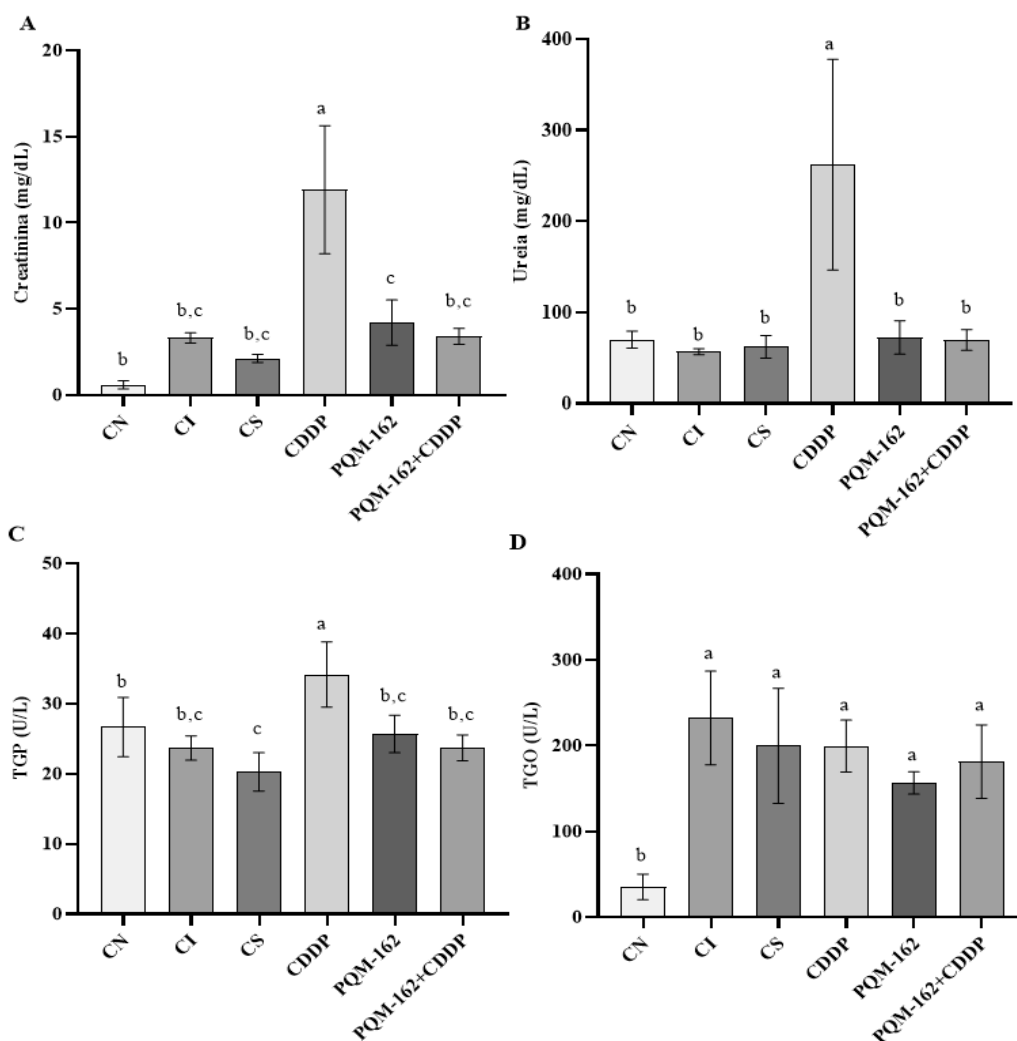
Os níveis de TGP (Figura 12C) foram mais elevados no grupo CDDP, diferindo significativamente dos grupos CN, CI e CS. Os grupos CN, CI e aqueles tratados com PQM-162, isolado ou em combinação com CDDP, apresentaram valores intermediários, sem diferenças estatisticamente significativas entre si. Os níveis de TGO (Figura 12D) foram significativamente menores no grupo CN, enquanto todos os demais grupos apresentaram valores elevados, sem diferenças significativas entre si. Valores encontrados no estudo mediante ao grupo CN, estão de acordo com a faixa de referência fisiológica demonstrada por Zhou e Hansson (2004) em relação a idade e sexo do animal.

5.3.3 Genotoxicidade

O ensaio cometa foi realizado para investigar a genotoxicidade dos tratamentos (Figura 13A e B). As imagens obtidas por microscopia de fluorescência ilustram os achados quantitativos revelando núcleos celulares com pouca ou nenhuma migração de DNA até núcleos com um aumento expressivo no tamanho da cauda do cometa, indicando maior fragmentação do DNA (Figura 13A).

Os resultados demonstraram que os grupos CN, CI e CS apresentaram baixa porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando níveis mínimos de danos no DNA. O grupo tratado com CDDP exibiu um aumento significativo da porcentagem de DNA na cauda, evidenciando seu efeito genotóxico. O tratamento com PQM-162, por si só, não resultou em um aumento significativo na genotoxicidade em comparação com o grupo CDDP, apenas quando comparado aos controles (CN, CI e CS). No entanto, a combinação de PQM-162 + CDDP apresentou um perfil de genotoxicidade semelhante ao da CDDP, indicando que a coadministração do composto não aumentou significativamente os danos ao DNA além dos efeitos já observados no tratamento com CDDP.

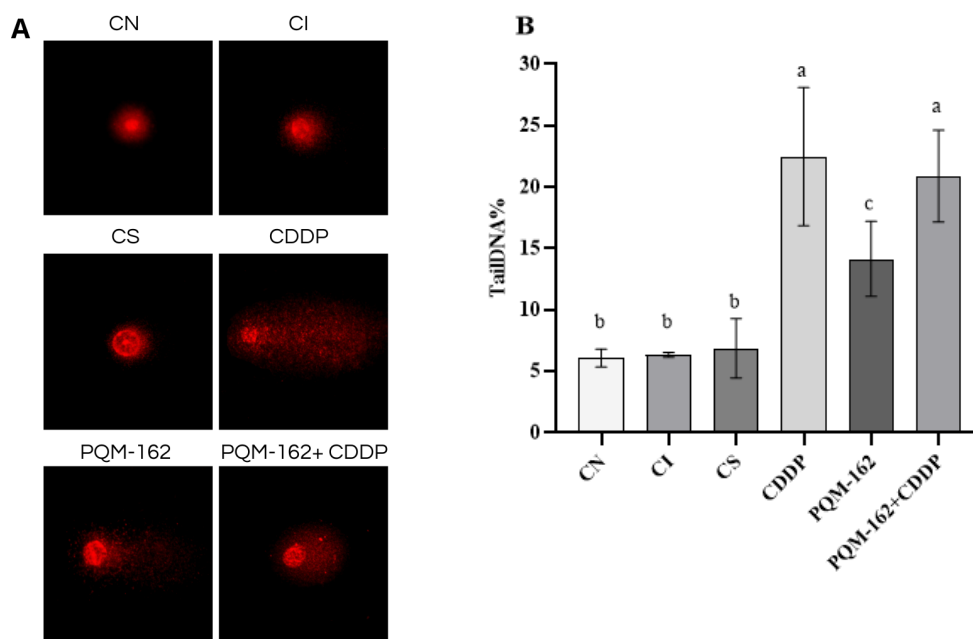
Figura 12 - Marcadores bioquímicos de função renal e hepática nos diferentes grupos de tratamento.



Fonte: do autor (2024).

Legenda: Em (A) níveis séricos de creatinina, (B) ureia, (C) TGP e (D) TGO. TGO – Transaminase Oxalacética; TGP - Transaminase Pirúvica; Controle implante; CS - Controle solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 5%; CDDP - Cisplatina 7 mg/kg/peso corporal (pc) subcutâneo (sc); PQM-162 (E)- 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxibenzilideno) acrilidrazida 2 mg/kg/pc sc). Os valores são média \pm desvio padrão (n=5). Barras com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si. Referência para $p \leq 0,05$ (ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey).

Figura 13 – Genotoxicidade em hepatócitos de camundongos C57BL/6 após 5 dias de tratamentos consecutivos.



Fonte: do autor (2025).

Legenda: Em (A) % de DNA na cauda do cometa e (B) fotomicrografias representativas dos danos no DNA em cada grupo de tratamento. Análise realizada a partir de 50 cometas por lâmina através do software OpenComet. Imagens ilustrativas de cometas em amostras visualizadas em microscópio de fluorescência após coloração com GelRed (1:1100) de acordo com o respectivo tratamento. Controle Controle implante; CS - Controle solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 5 %; CDDP - Cisplatina 7 mg/kg/peso corporal (pc) subcutâneo (sc); PQM-162 (E)- 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxibenzilideno) acrilidrazida 2 mg/kg/pc sc). Os valores são média \pm desvio padrão (n=5). Barras com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si. Referência para $p \leq 0,05$ (ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey).

5.3.4 Mutagenicidade

Na medula óssea, a análise da razão EPC/EPC+ENC revelou que os animais dos grupos CI e CS apresentaram diferença estatística em relação ao grupo CN. O tratamento com CDDP resultou em uma redução significativa na quantidade de eritrócitos policromáticos disponíveis para análise, em comparação com os grupos CN, CI e CS. Os grupos tratados com a molécula testada isoladamente (PQM-162) apresentaram redução na frequência de eritrócitos policromáticos em relação ao grupo CN, sendo essa redução relativamente maior do que a observada no grupo CDDP. A combinação de PQM-162 e CDDP, quando comparada aos grupos CN, CI, CS e PQM-162, demonstrou uma redução significativa. No entanto, ao ser

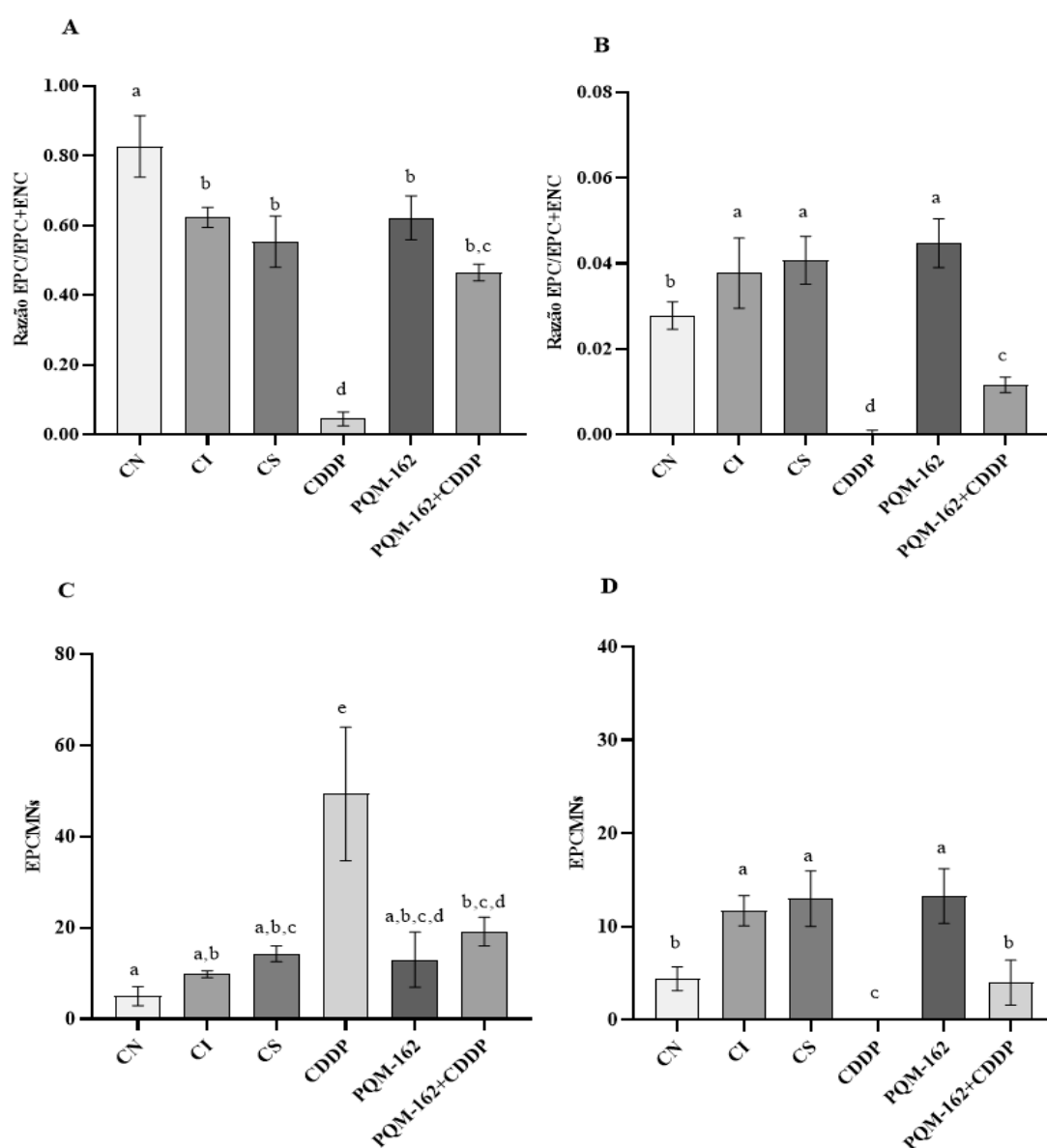
comparado com o grupo CDDP, esse tratamento apresentou um aumento na razão EPC/EPC+ENC (Figura 14A).

No sangue periférico, o grupo CS apresentou diferença significativa em relação aos grupos CN e CDDP. Os animais tratados com CDDP apresentaram ausência de eritrócitos policromáticos para contagem e posterior análise, indicando a citotoxicidade da dose administrada em comparação com os grupos controle CN, CI e CS. O grupo tratado com PQM-162 apresentou diferenças significativas em relação aos grupos CN e CDDP, uma vez que o grupo controle positivo demonstrou caráter citotóxico, evidenciado pela ausência de eritrócitos jovens disponíveis para contagem. Por sua vez, o grupo tratado com a combinação PQM-162 + CDDP apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos CI, CS e PQM-162. Embora não tenha sido observada diferença estatística significativa quando comparado ao grupo CDDP, verificou-se que a razão EPC/EPC+ENC foi maior (Figura 14B).

Os animais do grupo CDDP apresentaram um aumento significativo na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) em comparação com os grupos CN, CI e CS. O tratamento com PQM-162 resultou em uma redução significativa na quantidade de EPCMNs em relação ao grupo CDDP. Além disso, os animais tratados com a combinação de PQM-162 e CDDP apresentaram diferenças estatísticas em relação aos grupos CN e CDDP (Figura 14C).

Nas análises do sangue periférico, observou-se que os grupos CI e CS apresentaram diferença estatística em relação ao grupo CN. Os animais tratados com CDDP não apresentaram eritrócitos policromáticos, resultando na ausência de micronúcleos. Já os animais tratados com PQM-162 isolado apresentaram diferença estatística em relação aos grupos CN e CDDP, com um aumento na frequência de EPCMNs em comparação ao grupo CDDP. Por fim, o grupo tratado com a combinação de PQM-162 e CDDP apresentou uma redução significativa na frequência de EPCMNs no sangue periférico em comparação com os grupos CI, CS e PQM-162, mas um aumento em relação ao grupo CDDP (Figura 14D).

Figura 14 – Citogenotoxicidade na medula óssea (A, C) e no sangue periférico (B e D) camundongos C57BL/6 tratados.



Fonte: do autor (2025).

Legenda: A) Razão EPC/EPC+ENC na medula óssea; B) Razão EPC/EPC+ENC no sangue periférico; C) EPCMN% na medula óssea; D) EPCMN% no sangue periférico. EPC – eritrócitos policromáticos; ENC – eritrócitos normocromáticos; EPCMN% – eritrócitos policromáticos micronucleados; Controle implante; CS - Controle solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 5%; CDDP - Cisplatina 7 mg/kg/peso corporal (pc) subcutâneo (sc); PQM-162 (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -N'- (4-metoxibenzilideno) acrilidrazida 2 mg/kg/pc sc). Os valores são média \pm desvio padrão (n=5). Barras com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si. Referência para $p \leq 0,05$ (ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

Embora os tratamentos quimioterápicos atuais tenham efeitos positivos na supressão do crescimento tumoral, juntamente com os benefícios clínicos existem deficiências caracterizadas pelos efeitos adversos como a nefrotoxicidade, neurotoxicidade (Acklin *et al.*, 2020), ototoxicidade (Breglio *et al.*, 2017), gonadotoxicidade, toxicidade gastrointestinal (Nardini *et al.*, 2020), atrofia muscular (Moreira-Pais;Ferreira;Gil Da Costa, 2018) e anemia (Zhang *et al.*, 2020). Neste trabalho demonstramos que o tratamento de roedores com melanomas induzidos com PQM-162 apresentou efeito quimioterápêutico significativo sem induzir sinais severos de toxicidade sistêmica e que, a combinação de PQM-162 com o clássico quimioterápico CDDP, além de reduzir os melanomas, demonstrou reduzir efeitos adversos do tratamento.

Resultados prévios obtidos *in vitro* já demonstravam o potencial de PQM-162 em reduzir a proliferação celular de diversas linhagens representativas de tumores como HepG2, A549, MCF7, HT144 e HCT-8 em consequência da parada do ciclo celular e/ou morte celular (De Freitas-Silva *et al.*, 2018; Baptistella *et al.*, 2021). A curcumina e o resveratrol, quando isolados, demonstram vastas evidências de seu potencial antineoplásico (Gundewar *et al.*, 2015; Baek *et al.*, 2016).

A curcumina, sendo uma das precursoras da PQM-162, apresenta evidências positivas como agente quimioterápico contra diferentes tipos de tumores (Patel *et al.*, 2019). Seus efeitos farmacológicos contra o melanoma concentram-se nas principais vias envolvidas na indução de apoptose em células malignas (Shou *et al.*, 2023), bem como na redução da proliferação celular, da invasividade e da metástase (Mirzaei *et al.*, 2016). Em um modelo experimental de melanoma murino em camundongos C57BL/6, Wang *et al.* (2017) demonstraram que o tratamento com curcumina encapsulada em nanopartículas, na dose de 50 mg/kg, resultou na redução da massa tumoral. Além disso, a administração intraperitoneal de curcumina nas doses de 2 mg/kg e 10 mg/kg reduziu a frequência de metástases e a invasão de células tumorais (Shimada *et al.*, 2018).

Nanopartículas contendo resveratrol, administradas por via intraperitoneal em modelo de melanoma, apresentaram efeitos antitumorais por meio da redução da massa tumoral e do potencial imunorregulador nas doses de 5 mg/kg (Carletto *et al.*, 2016) e 40 mg/kg (Davoodvandi *et al.*, 2020). Por meio da regulação da via *p53* e das proteínas *Bcl-2* e *PKM2*, o resveratrol demonstrou capacidade de induzir apoptose, além de reduzir a viabilidade

celular da linhagem B16-F10 (Carletto *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018; Davoodvandi *et al.*, 2020). Os resultados obtidos neste trabalho com a aplicação da molécula híbrida de curcumina-resveratrol PQM-162 permite evidenciar que o processo de hibridização molecular, no qual houve uma racionalização para a síntese de uma molécula com incremento em potência e seletividade antiproliferativa foi mantido, caracterizado pela sua eficiência em reduzir os melanomas com menor toxicidade sistêmica. Experimento de Kumar *et al.* (2017), demonstraram resultados positivos para a coadministração de curcumina e CDDP em câncer de mama baseado na alta atividade antineoplásica e baixa reotoxicidade. A combinação de paclitaxel+curcumina, exibiu redução do tamanho do tumor mamário em camundongos efeito relacionado à modulação de marcadores moleculares como proteína quinase C, telomerase, NF- κ B e HDACs (Roy *et al.*, 2011). A terapia combinada de curcumina e dissulfiram, no trabalho de Fontes *et al.* (2022), inibiu sinergicamente o crescimento de células de melanoma B16-F10 em camundongos C57BL/6.

Considerando a significativa atividade antitumoral aliada à literatura prévia sobre PQM-162 e seus precursores curcumina e resveratrol acerca da capacidade de redução da proliferação celular, investigamos a expressão imuno-histoquímica de PCNA e β -catenina no tecido tumoral parafinizado. O antígeno de PCNA, uma proteína associada à proliferação celular e ao reparo do DNA, foi identificado inicialmente como uma molécula altamente abundante durante a fase S do ciclo celular, apresentando níveis extremamente baixos em células quiescentes e senescentes (Kelman, 1997). Podendo atuar como uma braçadeira deslizante, formando um anel homotrimérico em torno do DNA para ancorar as DNAs polimerases, a PCNA também é reconhecida como um regulador central do ciclo celular. Ela participa ativamente na transição da fase G1 para a fase M e contribui para a degradação de inibidores de CDK, como *p21* e *Xic1* (Choe; Moldovan, 2017; González-Magaña; Blanco, 2020; Zhou *et al.*, 2018). Os níveis de expressão de PCNA nos animais tratados com PQM-162 foram relativamente baixos em comparação aos CI, evidenciando o efeito antiproliferativo nas células tumorais. Congruentemente, o uso concomitante de PQM-162 e CDDP também demonstrou redução sem diferenças estatísticas em relação ao grupo de CDDP nos levando a interpretar que a terapia combinada não apresentou melhores efeitos na inibição de PCNA.

A via Wnt/ β -catenina está intrinsecamente envolvida na patogênese de vários cânceres (Li *et al.*, 2019). No melanoma, sua ativação está associada à progressão tumoral (Gaujox *et al.*, 2011) e à resistência terapêutica (Yi *et al.*, 2016). Evidências sugerem que a β -catenina

modula o microambiente tumoral, promovendo a evasão imune e a manutenção de células-tronco tumorais, características que contribuem para a agressividade da doença (Chien *et al.*, 2009; Klopschinski *et al.*, 2021; Riesenber *et al.*, 2015). Na ausência de estímulo Wnt, a β -catenina é mantida em níveis reduzidos por meio de sua degradação mediada por um complexo multiproteico composto por APC, Axina, *Casein kinase I* (CK1) e *Glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK-3 β). Entretanto, a ativação da via Wnt impede a degradação da β -catenina, permitindo sua translocação para o núcleo, onde atua como fator de transcrição, modulando a expressão de genes-alvo, incluindo os proto-oncogenes c-Myc, Ciclina D1 e PCNA.

Os níveis de β -catenina influenciam a diferenciação tumoral e regulam as vias de sinalização MAPK/Erk e PI3K/Akt. A ativação coordenada das vias Wnt/ β -catenina e AKT tem sido implicada na quimiorresistência e no aumento da capacidade invasiva de linhagens celulares de melanoma (Damsky *et al.*, 2011; Pai *et al.*, 2017). Alterações na expressão de PCNA refletem diretamente a taxa de proliferação celular, enquanto a expressão de β -catenina está mais relacionada a processos de sinalização e adesão celular. Desse modo, a redução na expressão de PCNA e β -catenina (mesmo que discreta), pode indicar PQM-162 como um agente de interesse com capacidade de atuar sobre a proliferação, sobrevivência e quimiorresistência celular. Além disso, o resveratrol e a curcumina já demonstraram reduzir a expressão de β -catenina e PCNA em diversos modelos de estudo e tipos tumorais, o que contribui para justificar os efeitos observados neste trabalho (Frampton *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2019).

A inibição da proliferação celular descontrolada pode estar associada aos mecanismos desencadeadores da morte celular programada, neste sentido, a apoptose pode ser mediada por diversos fatores moleculares e sinalizadas por ativação e inativação de vias importantes para a morte celular regulada (Fuchs e Steller, 2015; Negroni *et al.*, 2015). A *Caspase 3* e *9*, estão correlacionadas em seus mecanismos apoptóticos, sendo uma executora e outra iniciadora (Van; Lamkanfi, 2019) respectivamente. A ativação das caspases ocorre em resposta a danos ou estresses celulares causados por tratamentos. Esse processo começa com a clivagem de proteínas da família BH3, como a BID, desencadeando uma cascata de sinalização. Como consequência, ocorre a liberação do citocromo C das mitocôndrias para o citoplasma. O citocromo C se associa à proteína Apaf1, formando o apoptossomo, que recruta e ativa a pró-caspase-9. A caspase-9, por sua vez, cliva a pró-caspase-3, ativando a caspase-3, que executa a apoptose (Araya *et al.*, 2022).

Liu *et al.* (2018) em análises de *Western blot* demonstraram que o tratamento com resveratrol alterou significativamente a expressão das *caspase-9* e *caspase-3*. A curcumina em células de câncer de pulmão levou a regulação positiva da atividade da caspase 3/9 (Ye *et al.*, 2012). Demonstramos que o tratamento com PQM-162 isolado ou em combinação com CDDP, aumentou a expressão de mRNA das caspases-3 e -9, sugerindo ativação da via apoptótica, enquanto um aumento significativo do mRNA de *p21* e do regulador pró-apoptótico *Bax* foi demonstrada apenas para o grupo tratado com CDDP.

Como consequência dos mecanismos de inibição da proliferação celular, *p21* é conhecido por ser um forte inibidor de cinase dependente de ciclina que facilita a parada do ciclo celular ao interagir com diferentes estímulos, como *p53*, processo de reparo de DNA, CDK, E2F1, MYC, PCNA, STAT3 AP4, proteassomas, K1F, CDX2 e ER- α (Parveen *et al.*, 2016). Seus mecanismos estão intimamente relacionados em sua atuação como gene supressor de tumor quanto como um inibidor de apoptose ao interagir com várias moléculas e fatores de transcrição (Kumar; Vadlamudi, 2002). Outra proteína reguladora do ciclo celular é a *p27*, que opera como um supressor tumoral, inibindo a progressão do ciclo celular na transição da fase G1 para S ao bloquear a atividade dos complexos CDK2/ciclina E e CDK4/ciclina D, valores baixos de *p27* estão correlacionados com prognósticos ruins aos pacientes (Gururaj; Rayala; Kumar, 2005).

A diversidade dos sistemas biológicos e suas implicações uns com os outros, tornam o entendimento e medição das vias apoptóticas complexas, genes como *Bax* e *Bcl-2* estão intimamente relacionados, podendo implicar de forma favorável e desfavorável para a apoptose e/ou proliferação. O gene *Bax* (*Bcl-2* X associado) atua como um agonista da morte, promovendo a apoptose quando superexpresso em resposta a sinais de morte celular. Por outro lado, a expressão de *Bcl-2* (linfoma de células B2) suprime a apoptose por meio de sua heterodimerização com *Bax*, inibindo assim o processo de morte celular. Demonstramos discreto aumento nos níveis de expressão do mRNA de *Bax* e nenhuma diferença entre os níveis mRNA de *Bcl-2* e, conseqüentemente, na razão *Bcl-2/Bax*. No entanto, de acordo com Bargou *et al.* (1996) o aumento da expressão de *Bax* pode promover a sensibilidade das células a agentes apoptóticos, inibindo posteriormente o crescimento do tumor.

Podemos apontar que PQM-162 exerce efeito antitumoral através da redução da proliferação celular. Embora tenha sido demonstrado discreto aumento na expressão de *p21* e *Bax* e ausência de modulação da expressão de *p27* e *Bcl-2* acompanhadas de aumento das *Caspases 3 e 9*, esses achados sugerem que a inibição da proliferação celular ocorre

independente de *p21* e *p27*, muito provavelmente através da indução de apoptose mitocondrial ou interferência em vias mitogênicas e de sobrevivência celular, como PI3K/Akt e NF- κ B, sem ativação de mecanismos compensatórios de resistência.

Os grupos tratados com PQM-162 isolada exibiram aumento significativo no consumo hídrico, o que pode refletir diminuição da toxicidade. A variação no peso dos animais foi evidenciada nos grupos PQM-162 pelo ganho de peso em comparação ao CDDP isolado. Siddiqui *et al.* (2009) demonstraram que camundongos com tumor de cólon MAC16 (adenocarcinoma murino 16) tratados com 100 mg/kg de curcumina obtiveram prevenção da perda de peso. O uso de doses maiores de até 250 mg/kg pc também alcançaram um aumento progressivo do peso corporal em comparação ao controle placebo. O efeito da curcumina isolada para tratamento antitumoral em câncer de mama, foi avaliado por Kumar *et al.* (2017), na qual os resultados expressaram um ganho de peso nos animais tratados com curcumina (120 mg/kg) em comparação aos animais tratados com CDDP (7,5 mg/kg pc). O resveratrol, em xenoinxertos de câncer de próstata demonstrou aumento da massa corporal em comparação ao grupo controle veículo (Dias *et al.*, 2013).

O tratamento combinado de PQM-162+CDDP, apresentou uma redução do peso dos animais ao ser comparada com a CDDP, os dados demonstram que este valor de perda de peso é relativamente menor do que o visto no grupo CDDP. Doses maiores de CDDP (10 mg/kg pc) aplicadas duas vezes no período de 5 dias demonstraram que os animais apresentaram perda de peso acentuada de 13 % (Lee *et al.*, 2023), sendo o percentual próximo ao observado em nosso experimento (17 %). Já os animais tratados com PQM-162 + CDDP, apresentaram perda de peso de aproximadamente 9 %, evidenciando o efeito positivo da molécula teste.

Durante o processo de carcinogênese, ocorrem alterações no metabolismo celular para suprir as necessidades energéticas do tumor (Hanahan, Weinber, 2011). Muitos pacientes oncológicos apresentam estado de caquexia desencadeado a partir de tratamentos oncológicos (Argilés *et al.*, 2014; Baracos *et al.*, 2018; Nishikawa *et al.*, 2021), incluindo tratamentos com CDDP, como já demonstrado em modelos experimentais com roedores (Lee *et al.*, 2023; Patel; Damile, 2013). A caquexia é uma síndrome caracterizada por mudanças metabólicas e redução da ingestão de alimentos, podendo levar à desnutrição e, conseqüentemente, à perda de peso (Schiessel *et al.*, 2023).

A curcumina e o resveratrol mostraram dispor de efeitos benéficos visualizados na preservação dos órgãos, assim como verificado neste estudo. Segundo Goel e Aggarwal (2010), a curcumina embora atue como quimiossensibilizador e radiosensibilizador para

tumores, esta demonstrou proteger órgãos normais como fígado, rins, mucosa oral e coração da toxicidade induzida por quimioterapia e radioterapia. Em cortes histológicos e análise da hematopoiese hepática e renal, a curcumina demonstrou melhorar a hematopoiese extramedular em fígados e baços de camundongos portadores de tumor induzida por VEGF (Zhongping *et al.*, 2015) derivado de tumor. De forma análoga, a curcumina também demonstrou prevenir a formação de metástases em outros órgãos como pulmões (Liu *et al.*, 2023) pela cascata de EROS/KEAP1/NRF2/ *miR-34a/b/c*. *In vivo* o resveratrol demonstrou ação protetiva contra os danos induzidos pela doxorrubicina em modelos cardiovasculares (Kim *et al.*, 2018), efeitos protetores contra doenças neurodegenerativas e aumento secreção de neurotransmissores (Kodali *et al.*, 2015). O resveratrol também demonstrou acelerar a atividade dos osteoblastos e o crescimento ósseo e promover a formação óssea de camundongos C57Bl/6 de forma dependente da Sirt1 (Zhao *et al.*, 2018).

O baço e o fígado são órgãos que desempenham funções essenciais na filtragem do sangue. O baço, por sua vez, promove a reciclagem eficiente do tecido sanguíneo por meio da captura e eliminação de células envelhecidas (Johns; Cristóvão, 2012; Lewis *et al.*, 2019). O fígado é responsável pelo metabolismo de medicamentos, liberando enzimas que inativam os fármacos, os quais são posteriormente transportados aos rins para excreção. De modo semelhante, a insuficiência renal e a atrofia dos rins podem ocorrer devido à alta deposição de CDDP, que frequentemente afeta esses órgãos pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e pela excreção inadequada de metabólitos dos fármacos provenientes do fígado (Ghosh, 2019; Makovec, 2019; Wu *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021).

Em uma análise proteômica para avaliação da hepatotoxicidade induzida por CDDP, Cho *et al.* 2012, identificaram 19 vias de degradação dos hepatócitos. O estudo de Hae-Ran *et al.* (2020) observou que camundongos C57BL/6 tratados com CDDP em um regime de 6 doses de 3 mg/kg da massa corporal ao longo de 20 dias apresentaram uma diminuição significativa na massa do fígado e dos rins, com reduções de 18,98 % e 17,87 %, respectivamente. Esses resultados indicam o impacto adverso da CDDP nesses órgãos, evidenciando seus efeitos tóxicos em longo prazo em modelos animais, confirmado também pelos nossos achados.

Os ensaios bioquímicos são eficientes para a avaliação da função renal e hepática, além de serem de fácil manipulação para o monitoramento dos diferentes tratamentos antineoplásicos (Wang; Ran; Jiang, 2014). Em nosso experimento demonstramos o comprometimento ocasionado pelo tratamento com CDDP, que elevam os valores da

creatinina de aproximadamente três vezes maiores do que o tratamento com PQM-162 isolado e combinado a CDDP, estando, portanto, em consonância outros trabalhos da literatura (Peres e da Cunha 2013; Chen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Em ensaios clínicos randomizados de Abdollahi *et al.* (2023), o resveratrol administrado em concentrações de 8-1000mg/d para análise de biomarcadores de saúde renal demonstra ocasionar diminuição nos níveis séricos de creatinina. Estes resultados corroboram os dados coletados por Batista-Jorge *et al.* (2020) os parâmetros bioquímicos do efeito do resveratrol comparado ao placebo revela que a suplementação com uso de 250mg/dia durante 4 semanas diminuiu os valores da creatinina e ureia, assim como TGO e TGP.

Considerando que o maior acúmulo de CDDP acontece nos rins acarretando toxicidade aguda (Ghosh, 2019) relacionada ao estresse oxidativo gerado pelo aumento de EROs e óxido nítrico (ON) (Babaenezhad *et al.*, 2021; Tohamy, 2016), a manutenção dos níveis adequados de creatinina sérica nos grupos tratados com PQM-162 pode estar relacionada à atividade dos seus precursores. A curcumina e o resveratrol possuem atividades positivas como a capacidade de modular os níveis séricos de creatinina (Gupta *et al.*, 2012), uréia, TGO e TGP, em que provavelmente se relacionam com a inibição de rotas inflamatórias como a IL-6, IL-8 e IL-1 β como já descrito por Kim *et al.* (2005) em modelos de lesão renal com tratamento com curcumina demonstraram redução significativa nos níveis de expressão de marcadores inflamatórios como TNF-k, IL-6 e IL-1 β e restauração da expressão de IL-10 em tecidos renais (Kumar *et al.*, 2017), ou seja, redução da nefrotoxicidade dos tratamentos. O resveratrol também é um potente antioxidante (Wang *et al.*, 2005), em que elimina radicais livres, EROs e ainda apresentam atividade antiproliferativa contra células tumorais, associada à presença dos radicais fenil presentes na molécula (Ruwizhi; Anderibigbe, 2020), e assim inibir a lipoperoxidação celular e danos ao DNA.

De acordo com nossos achados, Cruz *et al.* (2022) observaram que a CDDP (5 mg/kg/p.c.) também foi capaz de reduzir a massa corpórea, do baço, fígado e rins de camundongos machos C57BL/6, aumentando os níveis séricos de creatinina. Ferreira *et al.* (2018) também observaram redução do consumo hídrico, perda de massa corpórea (13 %) e do fígado (44 %) e altos níveis de creatinina em animais C57BL/6 tratados com CDDP (5 mg/kg/p.c.). De forma oposta, camundongos *Swiss* com carcinoma de Ehrlich tratados por 7 dias com CDDP (1 mg/kg/p.c.) não demonstraram diferenças estatísticas quando comparados aos controles. Isso, no entanto, pode ser explicado pela baixa dosagem do fármaco utilizado (Andrade *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos na medula óssea para a avaliação da mutagenicidade evidenciam que os animais tratados com CDDP apresentaram mielossupressão devido ao tratamento, impossibilitando a avaliação desse grupo pela ausência de eritrócitos policromáticos, o que confirma os dados de Florea *et al.* (2011). No estudo de Masubuchi *et al.* (2006) em ratos, a CDDP também induziu insuficiência renal aguda e regulação negativa do citocromo hepático P450 (P450) de maneira seletiva para isoenzimas. Peres *et al.* (2013) descrevem a atividade citotóxica da CDDP, a qual ocorre devido ao grau de "platinação", que está mais comumente associado à entrada da CDDP no núcleo celular, seguida pelo acúmulo do fármaco. A ligação entre a platina e o DNA gera "adutos", ou novos compostos que ativam várias respostas celulares, incluindo a sinalização do dano ao DNA, pontos de checagem do ciclo celular, reparo do DNA e morte celular. No entanto, os animais tratados com PQM-162 e os grupos controle exibiram menor supressão celular na medula óssea do que aqueles tratados com CDDP.

O ensaio do micronúcleo tem como objetivo avaliar a mutagenicidade e citotoxicidade provenientes dos tratamentos, bem como sua capacidade de alterar efeitos mutagênicos e citotóxicos e, conseqüentemente, a carcinogênese. Observamos em nossos estudos que animais com tumores e sem tratamento também apresentaram um número considerável de micronúcleos, demonstrando que o microambiente tumoral é altamente heterogêneo e caracterizado por uma instabilidade genômica contínua. Estudos recentes de Guscott *et al.* (2022) relatam que os micronúcleos participam ativamente do início e desenvolvimento do câncer. Anteriormente, acreditava-se que os micronúcleos fossem estruturas passivas, resultantes de algum dano genético; no entanto, evidências atuais demonstram que esses também estão envolvidos na resposta imune por meio da via cGAS-STING, além de participarem ativamente da progressão tumoral.

Na contagem da frequência de micronúcleos na medula óssea, foi possível identificar uma quantidade significativa de MN no grupo tratado com CDDP, demonstrando os efeitos citotóxicos desse tratamento. Entre os animais tratados com a molécula híbrida, observou-se uma redução na frequência média de MNEPCs. Em outra perspectiva, estudos de Corona-Rivera *et al.* (2007) indicam que a curcumina exerceu efeito protetor contra a formação de MN em camundongos submetidos à exposição ao cobre por um período de 48 horas. Shafaghati *et al.* (2014) incubaram linfócitos humanos com curcumina em doses de 5, 10 e 50 µg/mL para investigar seus efeitos radioprotetores contra danos genotóxicos em linfócitos periféricos. Após uma hora, os linfócitos foram incubados com I-131 (100 µCi/1,5

mL) por duas horas, e os efeitos protetores máximos na frequência de micronúcleos foram observados na dose de 50 $\mu\text{g/mL}$ de curcumina, resultando em uma redução de 52 %.

Ao investigar a genotoxicidade dos tratamentos pelo ensaio cometa, demonstramos que o tratamento com PQM-162 apresentou uma taxa reduzida de danos no DNA quando comparado a CDDP e que a combinação com CDDP não revelou potencial aumento. De forma semelhante a curcumina, administrada em dose única de 80 mg/kg diminuiu os efeitos genotóxicos induzido (Eke *et al.*, 2017). No estudo de Dobrzyńska e Gajowik (2021), o tratamento de linfócitos humanos com resveratrol 1 hora antes ou imediatamente após a exposição à radiação mostrou proteção contra danos ao DNA induzidos pela radiação. Os resultados, obtidos no ensaio, juntamente com a interpretação dos resultados obtidos no teste de micronúcleo reforçam a questão de que PQM-162 atua de maneira seletiva.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo indicam que o tratamento com PQM-162 reduziu significativamente a massa tumoral, de forma comparável à cisplatina (CDDP). A coadministração de PQM-162 com CDDP potencializou essa redução, sugerindo efeito terapêutico sinérgico, além de não apresentar toxicidade sistêmica ao ser avaliado pelo consumo hídrico, perda/ganho de massa corporal e órgãos. Biomarcadores hepáticos e renais permaneceram estáveis com PQM-162 isolado, enquanto sua associação com CDDP reduziu os níveis séricos de creatinina e ureia, sugerindo efeito protetor renal. Além disso, PQM-162 diminuiu a citotoxicidade da CDDP, evidenciada pela redução de EPCMNs e melhora na razão EPC/EPC+ENC.

Em adição, os dados coletados da IHC onde sugere-se inibição da proliferação celular, além da interferência na sinalização tumoral. A análise de mRNA foi visto que houve uma redução da proliferação podendo estar ligada à apoptose mitocondrial ou à modulação de vias como PI3K/Akt e NF- κ B, de forma independente de p21/p27.

Em resumo, PQM-162 demonstrou potencial terapêutico ao modular biomarcadores de proliferação e apoptose sem causar toxicidade relevante. Sua combinação com CDDP atenuou efeitos colaterais, especialmente a nefrotoxicidade, indicando seu potencial como agente complementar em terapias oncológicas, ressaltando que em efeitos comparativos do tratamento isolado e a combinação de PQM-162+CDDP, essa demonstra-se mais efetiva na resposta terapêutica. Contudo, estudos adicionais são necessários para explorar melhor suas vias de ação e eficácia em modelos pré-clínicos mais abrangentes.

REFERÊNCIAS

- ACKLIN, S., et al. Neurotoxicity associated with cisplatin treatment: Pathophysiology and potential strategies for prevention. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Alemanha, v. 86, n. 6, p. 839-850, 2020. DOI:10.1007/s00280-020-04236-2.
- ALI, S. F., SHAIKH, F. M., & SIDDIQUI, N. A. Toxicity evaluation of a new pharmacological compound using OECD guidelines. **Journal of Applied Toxicology**, Inglaterra, v. 40, n. 9, p. 1183-1193, 2020.
- ALUYEN, Julia Kristine; TON, Quynhanh N.; TRAN, Thuytram; *et al.* Resveratrol: potential as anticancer agent. **Journal of Dietary Supplements**, Inglaterra, v. 9, n. 1, p. 45–56, 2012.
- ARAYA, L. E. et al. Deorphanizing Caspase-3 and Caspase-9 Substrates In and Out of Apoptosis with Deep Substrate Profiling. **ACS Chemical Biology**, Washington v. 16, n. 11, p. 2280–2296, 2021.
- ARGILÉS, J. M., et al. Cachexia: Definition, diagnosis, and treatment. **Cancer**, Atlanta, v. 120, n. 16, p. 2140-2149, 2014. DOI:10.1002/cncr.28892.
- AVAN, A., et al. Neurotoxicity of chemotherapeutic agents used in cancer treatment. **Frontiers in Oncology**, Suíça, v. 5, n. 160, 2015. DOI:10.3389/fonc.2015.00160.
- BAPTISTELLA, M. M. et al. A synthetic resveratrol–curcumin hybrid derivative exhibits chemopreventive effects on colon pre-neoplastic lesions by targeting Wnt/ β -catenin signaling, anti-inflammatory and antioxidant pathways. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Inglaterra, 2023. DOI: 10.1093/jpp/rgad077.
- BARABAS, K. et al. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. **Veterinary and Comparative Oncology**, Virginia, v. 6, n. 1, p. 1–18, 1 mar. 2008.
- BARACOS, V. E., et al. Cancer cachexia: Understanding the molecular mechanisms and implications for therapy. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, Estados Unidos, v. 21, n. 5, p. 263-269, 2018. DOI:10.1097/MCO.0000000000000482.
- BAROUDJIAN B, Pagès C, Lebbé C. Mélanomes, du diagnostic à la prise en charge Melanoma, from diagnosis to treatment. **Rev Infirm.**, Paris, v. 219, p. 8-16, 2016. DOI: 10.1016/j.revinf.2015.12.022.
- BARGOU, R. C. et al. Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. **Journal of Clinical Investigation**, Estados Unidos, v. 97, n. 11, p. 2651–2659, 1996.
- BELLINA, Fabio; GUAZZELLI, Nicola; LESSI, Marco; *et al.* Imidazole analogues of resveratrol: synthesis and cancer cell growth evaluation. **Tetrahedron**, California, v. 71, n. 15, p. 2298–2305, 2015.
- BOUDREAU, M. W.; PEH, J.; HERGENROTHER, P. J. Procaspase-3 Overexpression in Cancer: A Paradoxical Observation with Therapeutic Potential. **ACS Chemical Biology**, Chicago, v. 14, n. 11, p. 2335–2348, 2019.

BRAEUER, R. R. et al. Why is melanoma so metastatic? **Pigment cell & melanoma research**, Londres, v. 27, n. 1, p. 19–36, 2014. DOI: 10.1111/pcmr.12172.

BREGLIO, A. M., et al. Cisplatin-induced ototoxicity and the role of the SLC22A4 transporter. **Hearing Research**, California, v. 343, p. 165-171, 2017. DOI: 10.1016/j.heares.2017.06.010.

BREUSS, Johannes M.; ATANASOV, Atanas G. ; UHRIN, Pavel. Resveratrol and Its Effects on the Vascular System. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 20, n. 7, 2019.

BUHRMANN, Constanze; YAZDI, Mina; POPPER, Bastian; *et al.* Resveratrol Chemosensitizes TNF- β -Induced Survival of 5-FU-Treated Colorectal Cancer Cells. **Nutrients**, Estados Unidos, v. 10, n. 7, p. 888, 2018.

BURLINSON, Brian; TICE, Raymond R.; SPEIT, Günter; *et al.* Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Brasil, v. 627, n. 1, p. 31–35, 2007.

CARLETTO, B. et al. Resveratrol-loaded nanocapsules inhibit murine melanoma tumor growth. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, Holanda, v. 144, p. 65–72, 2016. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.04.001.

CARR, S; SMITH, C; WERNBER, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surg. Clin. North Am.**, Minnesota, v. 100, n. 01, p. 1 – 12. 2020. DOI: 10.1016/j.suc.2019.09.005.

CARTER, Lindsay G; D’ORAZIO, John A ; PEARSON, Kevin J. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. **Endocrine-Related Cancer**, Turquia, v. 21, n. 3, p. R209–R225, 2014.

CHEMSKETCH, version 2023.1.1, Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs), 2023, Toronto.

CHEN M.F., YANG C. M., SU M. C & HU M. L. Vitamin C Protects Against Cisplatin Induced Nephrotoxicity and Damage Without Reducing Its Effectiveness in C57BL/6 Mice Xenografted with Lewis Lung Carcinoma, **Nutrition and Cancer**, Dubai, v. 66, n. 7, p. 1085-1091, 2014. DOI: 10.1080/01635581.2014.948211.

CHEN, Qiao-Hong. Curcumin-Based Anti-Prostate Cancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 138–156, 2015.

COLLINS, Andrew; MØLLER, Peter; GAJSKI, Goran; *et al.* Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. **Nature Protocols**, v. 18, n. 3, p. 929–989, 2023.

CORONA-RIVERA, A., Urbina-Cano, P., Bobadilla-Morales, L. et al. Efeito protetor in vivo da curcumina na genotoxicidade do cobre avaliada por ensaios cometa e micronúcleo. **Journal Appl Genet**, v. 48, p. 389–396 2007. DOI:10.1007/BF03195238

CROWE, Alexandra ; YUE, Wei. Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol.

BIO-PROTOCOL, v. 9, n. 24, 2019.

CRONA, J., et al. Hepatotoxicity associated with cancer chemotherapy: A review. **Hepatology Research**, v. 47, n. 9, p. 974-983, 2017. DOI:10.1111/hepr.12847.

CRUZ, R. C. R. et al. Watermelon reduces the toxicity of cisplatin treatment in C57BL/6 mice with induced melanoma. **Nutrition and cancer**, Dubai, v. 74, n. 3, p. 1097–1105, 2022. DOI: 10.1080/01635581.2021.1918731.

DAMSKY, WILLIAM E. et al. β -Catenin Signaling Controls Metastasis in Braf-Activated Pten-Deficient Melanomas. **Cancer Cell**, Atlanta, v. 20, n. 6, p. 741–754, dez. 2011.

DASARI, S., et al. Cisplatin and its anticancer properties: A comprehensive review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, India, v. 18, n. 4, p. 694-704, 2022. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_918_21.

DAVOODVANDI, A. et al. The therapeutic potential of resveratrol in a mouse model of melanoma lung metastasis. **International immunopharmacology**, Estados Unidos, v. 88, n. 106905, p. 106905, 2020. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106905.

DE FREITAS SILVA, M. et al. Synthetic resveratrol-curcumin hybrid derivative inhibits mitosis progression in estrogen positive MCF-7 breast cancer cells. **Toxicology in Vitro**, Praga, v. 50, p. 75–85, 2018.

DEHELEAN, C. A. et al. Plant-Derived Anticancer Compounds as New Perspectives in **Drug Discovery and Alternative Therapy Molecules**, Estados Unidos, v. 26, n. 4, 2021. DOI: 10.3390/molecules26041109

DE MOURA, L. D. et al. Docetaxel and Lidocaine Co-Loaded (NLC-in-Hydrogel) Hybrid System Designed for the Treatment of Melanoma. **Pharmaceutics**, Emirados Árabes, v. 13, n. 10, p. 1552, 2021.

DHANYAMRAJU, P. K.; PATEL, T. N. Melanoma therapeutics: a literature review. **Journal of Biomedical Research**, Nigéria, v. 36, n. 2, p. 77, 2022. DOI: 10.7555/JBR.36.20210163.

DILDAR M, et al. Skin Cancer Detection: A Review Using Deep Learning Techniques. **Int J Environ Res Public Health**, Indonésia, v. 18, n. 10, p. 5479, 2021. DOI 10.3390/ijerph18105479.

DOBRZYŃSKA, M. M.; GAJOWIK, A. Protection and Mitigation by Resveratrol of DNA Damage Induced in Irradiated Human Lymphocytes In Vitro. **Radiation research**, Londres, v. 197, n. 2, p. 149–156, 2022.

DUTTA, S., et al. Natural compounds in cancer therapy: A review of their efficacy and mechanisms. **Phytotherapy Research**, Napóles, v. 33, n. 5, p. 1367-1380, 2019. DOI:10.1002/ptr.6320.

EKE, D. et al. Apoptotic gene expression profiles and DNA damage levels in rat liver treated with perfluorooctane sulfonate and protective role of curcumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdã, v. 104, p. 515–520, 2017.

ERNST, M.; GIUBELLINO, A. The current state of treatment and future directions in cutaneous malignant melanoma. **Biomedicines**, Kansas, v. 10, n. 4, p. 822, 2022. DOI: 10.3390/biomedicines10040822.

FAGUET, G. B. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. **International Journal of Cancer**, Alemanha, v. 136, n. 9, p. 2022–2036, 2015. DOI: 10.1002/ijc.29134.

FERREIRA, N. H. et al. Europium (III)-doped yttrium vanadate nanoparticles reduce the toxicity of cisplatin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Estados Unidos, v. 182, p. 9–17, 2018. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.01.014.

FLOREA, A.-M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers**, Atlanta, v. 3, n. 1, p. 1351–1371, 2011. DOI: 10.3390/cancers3011351.

FONTES, A. C. S.; et al. Combined therapy of curcumin and disulfiram synergistically inhibits the growth of B16-F10 melanoma cells in C57BL6 mice. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 23, n. 15, p. 8504, 2022. DOI: 10.3390/biom12111600

GAUJOUX, S. et al. β -Catenin Activation Is Associated with Specific Clinical and Pathologic Characteristics and a Poor Outcome in Adrenocortical Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, California, v. 17, n. 2, p. 328–336, 2011.

GALANSKI, M. S.; JAKUPEC, M. A.; KEPPLER, B. K. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: Novel design strategies and innovative analytical approaches. **Current Medicinal Chemistry**, Emirados Árabes, v. 12, n. 18, p. 2075–2094, 2005. DOI: 10.2174/0929867054637626.

GHOSH, P. et al. Effects of organoselenium compound 2-(5-selenocyanato-pentyl)-benzo[de]isoquinoline 1,3-dione on cisplatin induced nephrotoxicity and genotoxicity: an investigation of the influence of the compound on oxidative stress and antioxidant enzyme system. **BioMetals**, Hong Kong, v. 26, n. 1, p. 61–73, 30 out. 2012.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, Estados Unidos, v. 88, p. 102925, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **Global Cancer Observatory**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>.

GUSCOTT, M, Akash, Saha., Jovanna, Maharaj., Sarah, E., McClelland. The multifaceted role of micronuclei in tumour progression: A whole organism perspective. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Inglaterra, v. 152, 2022. DOI: 10.1016/j.biocel.2022.106300

GUPTA, A.; GOMES, F.; LORIGAN, P. The role for chemotherapy in the modern management of melanoma. **Melanoma Management**, Londres, v. 4, n. 2, p. 125–136, 2017. DOI: 10.2217/mmt-2017-0003.

HANAHAN D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. Estados Unidos, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

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

HANSSANPOUR, S, H; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal Cancer Res Pract**, China, v. 4, n. 4, 2017. DOI: 10.1016/j.jcrpr.2017.07.001

HASHEM, S. et al. Targeting cancer signaling pathways by natural products: Exploring promising anti-cancer agents. **Biomedicine & pharmacotherapy**, Hong Kong, v. 150, n. 113054, p. 113054, 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113054.

HAYASHI, M; MACGREGOR, J T; GATEHOUSE, D G; *et al.* In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and molecular mutagenesis**, California, v. 35, n. 3, p. 234–52, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10737958/>>.

HODIS, E; WATSON, IR; KRYUKOV, GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. **Cells**, Suíça, v. 150, p. 251–263, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.024.

IJAZ, S. et al. Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Hong Kong, v. 103, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.113

ILIEKA, KM; CORREA, I; JOSEPH, DH, et al. Effects of BRAF mutations and BRAF inhibition on murine responses to melanoma. **Molecular Cancer Therapeutics**, Boston, v. 13, n. 12, p. 2769-2783, 2014. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0290.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de 2023: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **Inca**, Brasil, 162 p., 2022. ISBN: 978-65-88517-10-9.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer Tomorrow**. IARC, 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer Tomorrow**. IARC, 2022.

ISMAIL, N. I. et al. The Curcumin Analogue, MS13 (1,5-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one), Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Primary and Metastatic Human Colon Cancer Cells. **Molecules**, Belim, v. 25, n. 17, p. 37-98, 2020.

JANG, M. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218-220, 1997. DOI: 10.1126/science.275.5297.218

JAIN, A. K.; PANDE, A. K. In Vivo Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow. In: Dhawan, A., Bajpayee, M. (eds) **Genotoxicity Assessment. Methods in Molecular Biology**, India, v. 2031, 2019. DOI: 10.1007/978-1-4939-9646-9_7

JACKUBCZYK, K., et al. Curcumin and its derivatives: A review of their biological activities. **Pharmacological Reports**, Polônia, v. 72, n. 1, p. 139-150, 2020. DOI: 10.1007/s43440-020-00026-7.

JEON, H.-J. et al. Antimelanogenic effects of curcumin and its dimethoxy derivatives: Mechanistic investigation using B16F10 melanoma cells and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Foods**, Canadá, v. 12, n. 5, p. 926, 2023. DOI: 10.3390/foods12050926.

JEONG, W.-J.; RO, E. J.; CHOI, K.-Y. Interaction between Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of β -catenin and RAS by targeting the Wnt/ β -catenin pathway. **Precision Oncology**, Rússia, v. 2, n. 1, 20 fev. 2018.

JIN, S.-G.; PADRON, F.; PFEIFER, G. P. UVA radiation, DNA damage, and melanoma. **ACS Omega**, Washington, v. 7, n. 37, p. 32936–32948, 2022. DOI: 10.1021/acsomega.2c04424.

KALRA, Neetu; ROY, Preeti; PRASAD, Sahdeo; *et al.* RETRACTED: Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis. **Life Sciences**, Estados Unidos, v. 82, n. 7-8, p. 348–358, 2008.

KHAN, A. Q. *et al.* Curcumin-Mediated Apoptotic Cell Death in Papillary Thyroid Cancer and Cancer Stem-Like Cells through Targeting of the JAK/STAT3 Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, Hong Kong, v. 21, n. 2, p. 438, 2020.

KIM, C.; KIM, B. Anti-Cancer Natural Products and Their Bioactive Compounds Inducing ER Stress-Mediated Apoptosis: **A Review**. **Nutrients**, Washington, v. 10 n.8, 2018. DOI: 10.3390/nu10081021

KUMAR, D; SARMA, P; BHADRA, M, P; TANGUTUR, A, D. Impacto f hybrid-polar Histone deacetylase inhibitor m-carbozycinnamic acid bis-hydroxyamide on human pancreatic adenocarcinoma cells. **Anticancer Agents Med Chem**, Estados Unidos, n. 19, v. 6, p. 750 – 759. 2019. DOI: 10.2174/1871520619666190101115034

KUMAR, P; NAGARAJAN, A; UCHIL, P, P. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harb Protocol**, Estados Unidos, v. 1, 2018. DOI: 10.1101/pdb.prot095505

LAN, X.; CHEN, L.; WEI, X. Targeting TNF- α in cancer therapy: A comprehensive review. **International Journal of Molecular Sciences**, Hong Kong, v. 22, n. 20, p. 11053, 2021.

LEE, M. J., *et al.* Cisplatin-induced cachexia in rodent models: Mechanisms and potential therapeutic strategies. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, Kansas, v. 14, n. 1, p. 24-39, 2023. DOI:10.1002/jcsm.12785.

LEE, B. Y. *et al.* GDNF family receptor alpha-like antagonist antibody alleviates chemotherapy-induced cachexia in melanoma-bearing mice. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, Kansas, v. 14, n. 3, p. 1441–1453, 2023. DOI: 10.1002/jcsm.13219.

LEONARDI, G. *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, Japão, v. 52, n. 4, p. 1071-1080, 2018. DOI: 10.3892/ijo.2018.4287.

LI, X. *et al.* WNT/ β -Catenin Signaling Pathway Regulating T Cell-Inflammation in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, Suíça, v. 10, 2019.

LIN, S.-R. *et al.* Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. **British Journal of Pharmacology**, Inglaterra, v. 177, n. 6, p. 1409–1423, 2020. DOI: 10.1111/bph.14816.

LINARES MA, ZAKARIA A, NIZRAN P. Skin Cancer. **Prim Care.**, Estados Unidos, v. 42, n. 4, p. 645-59, 2015. DOI: 10.1016/j.pop.2015.07.006.

LIU, Z. *et al.* Resveratrol enhances cisplatin-induced apoptosis in human hepatoma cells via glutamine metabolism inhibition. **BMB Reports**, Inglaterra, v. 51, n. 9, p. 474–479, 2018.

MARGHOOB NG, Liopyris K, Jaimes N. Dermoscopy: A Review of the Structures That Facilitate Melanoma Detection. **Journal Am Osteopath Assoc**, Chicago, v. 119, n. 6, p. 380-390, 2019. DOI: 10.7556/jaoa.2019.067.

MBEMI, A. et al. Impact of gene–environment interactions on cancer development. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Londres, v. 17, n. 21, p. 8089, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17218089.

MIRZAEL, H. et al. Curcumin: A new candidate for melanoma therapy? **International Journal of Cancer**, Alemanha, v. 139, n. 8, p. 1683–1695, 2016. DOI: 10.1002/ijc.30224.

MISHRA, H. et al. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Alemanha, v. 144, n. 12, p. 2283–2302, 1 dez. 2018.

MOREIRA-PAIS, A., Ferreira, J., & Gil da Costa, R. Muscle atrophy associated with cisplatin treatment: Mechanisms and potential therapeutic interventions. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, Suécia, v. 9, n. 5, p. 821-833, 2018. DOI:10.1002/jcsm.12385.

NABAVI, S. M. et al. Curcumin and melanoma: From chemistry to medicine. **Nutrition and cancer**, Dubai, v. 70, n. 2, p. 164–175, 2018. DOI: 10.1080/01635581.2018.1412485.

NARDINI, M., et al. Gastrointestinal toxicity induced by cisplatin: A review of mechanisms and management strategies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Estados Unidos, v. 85, n. 3, p. 453-464, 2020. DOI:10.1007/s00280-019-04083-1.

NISHIKAWA, H., et al. Cisplatin-induced cachexia: An updated review. **Frontiers in Oncology**, Suíça, v. 11, p.746-683, 2021. DOI:10.3389/fonc.2021.746683.

O'NEIL, C, H; SCOGGINS, C, R. Melanoma. **Journal Sug Oncol**. Estados Unidos da América. v.120, n. 05, p. 873-88, 2019. DOI: 10.1002/jso.25604.

OECD, Genetic toxicology:mammalian erythrocytemicronucleus test, in: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD Paris, **Test Guideline 474**, Paris, 1997. DOI: 10.1787/9789264264762-en

OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, **OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4**, OECD Publishing, Paris. 2016. Available online: DOI: 10.1787/9789264264762

OLIVEIRA, C. et al. Combination of vitamin D and probiotics inhibits chemically induced colorectal carcinogenesis in Wistar rats. **Life Sciences**, Estados Unidos, v. 322, p. 121617–121617, 1 abr. 2023.

OLIVEIRA, P. et al. Antioxidant, antimutagenic, and hypoglycemic properties of flours by different parts of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) seeds: Film and almond. **Food Research International**, Canadá, v. 196, p. 115-155, 2024.

OTTO, G. P. et al. Clinical Chemistry Reference Intervals for C57BL/6J, C57BL/6N, and C3HeB/FeJ Mice (*Mus musculus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, Estados Unidos, v. 55, n. 4, p. 375, jul. 2016.

PAI, S. G. et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response.

Journal of Hematology & Oncology, Europa, v. 10, n. 1, 2017.

PATEL, N., & DAMILE, J. Experimental models of cisplatin-induced cachexia: A review. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, Inglaterra, v. 32, n. 51, 2013. DOI:10.1186/1756-9966-32-51.

PARK, H.-R. et al. Synergistic anti-cancer activity of MH-30 in a Murine melanoma model treated with cisplatin and its alleviated effects against cisplatin-induced toxicity in mice. **In vivo**, Grécia, v. 34, n. 4, p. 1845–1856, 2020. DOI: 10.21873/invivo.11979.

PARK, S. Y. et al. Aromatic-turmerone inhibits α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways. **Archives of Dermatological Research**, Alemanha, v. 303, n. 10, p. 737–744, 2011. DOI: 10.1007/s00403-011-1155-7.

PEREIRA, S.; CURADO, M. P.; RIBEIRO, A. M. Q. Multiple skin neoplasms in subjects under 40 years of age in Goiania, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, Brasil, v. 49, n. 0, 2015.

PERES, L. A. B.; CUNHA JÚNIOR, A. D. DA. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: mecanismos moleculares. **Brazilian Journal of Nephrology**, Brasil, v. 35, n. 4, p. 332–340, 2013. DOI: 10.5935/0101-2800.20130052.

PEREZ M, Abisaad JA, Rojas KD, Marchetti MA, Jaimes N. Skin cancer: Primary, secondary, and tertiary prevention. Part I. **Journal Am Acad Dermatol**, Europa, v. 2, p. 255-268, 2022. DOI: 10.1016/j.jaad.2021.12.066.

PETERLE L, et al. The Role of Nutraceuticals and Functional Foods in Skin Cancer: Mechanisms and Therapeutic Potential. **Foods**, Canadá v. 12, n. 13, p. 26-29, 2023. DOI: 10.3390/foods12132629.

PETERS, J, M; GONZALEZ, F, J. The evolution of carcinogenesis. **Toxicol Sci.**, Pensilvânia, n. 165, v. 2, 2018. DOI: 10.1093/toxsci/kfy184.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. e45, 2001. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.

PIOTROWSKA, Hanna; KUCINSKA, Malgorzata; MURIAS, Marek. Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Inglaterra, v. 750, n. 1, p. 60–82, 2012.

POSEY, Karen L. Curcumin and Resveratrol: Nutraceuticals with so Much Potential for Pseudoachondroplasia and Other ER-Stress Conditions. **Biomolecules**, Estados Unidos, v. 14, n. 2, p. 154, 2024. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10886985/>>.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. **Molecular Nutrition & Food Research**, Amsterdam, v. 58, n. 5, p. 746-759, 2014. DOI:10.1002/mnfr.201200646.

RAUF, Abdur; IMRAN, Muhammad; BUTT, Masood Sadiq; *et al.* Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Estados Unidos, v. 58, n. 9, p. 1428–1447, 2017.

RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002. DOI: 10.1016/s0167-7799(02)02080-2.

- REN, B. et al. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. **Cancer Letters**, Irlanda, v. 515, p. 63–72, 2021. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.05.001.
- RINALDI-NETO, Francisco; RIBEIRO, Arthur Barcelos; FERREIRA, Natália Helen; *et al.* Anti-melanoma effect of ruthenium(II)-diphosphine complexes containing naphthoquinone ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Estados Unidos, v. 222, p. 111497, 2021.
- ROCHA-GONZÁLEZ, H. I.; AMBRIZ-TUTUTI, M.; GRANADOS-SOTO, V. Resveratrol: A Natural Compound with Pharmacological Potential in Neurodegenerative Diseases. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, Reino Unido, v. 14, n. 3, p. 234–247, 2008.
- RODRÍGUEZ, R. et al. Entendiendo las terapias actuales en melanoma metastásico. **Revista médica de Chile**, Chile, v. 144, n. 11, p. 1448–1458, 2016.
- ROY, M. et al. Paclitaxel and curcumin combination therapy reduces mammary tumor size in mice through suppression of molecular markers such as protein kinase C, telomerase, NF- κ B, and HDACs. **Cancer Biology & Therapy**, Inglaterra, v. 12, n. 5, p. 437-445, 2011. DOI: 10.3390/ijms23042144.
- SALEHI, B. et al. Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. **Biomedicines**, Reino Unido, v. 6, n. 3, p. 91, 2018. DOI: 10.3390/biomedicines6030091.
- SAMPLE, A.; HE, Y.-Y. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 34, n. 1, p. 13–24, 2018. DOI: 10.1111/phpp.12329.
- SASAKI, Yu F; TSUDA, Shuji; IZUMIYAMA, Fusako; *et al.* Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Inglaterra, v. 388, n. 1, p. 33–44, 1997.
- SCHADENDORF, D et al. Melanoma. **LANCET.**, Londres, v. 392, n. 10151, p. 971 – 984. 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30361-7.
- SCHIESSEL, R., et al. Cachexia and malnutrition in cancer patients: Causes and management. **Nutrients**, Estados Unidos, v. 15, n. 3, p. 617, 2023. DOI:10.3390/nu15030617.
- SETHI, G.; et al. TNF- α , inflammation, and cancer: How are they linked? **Biochemical Pharmacology**, Estados Unidos, v. 76, n. 11, p. 1409-1421, 2008. DOI: 10.2741/3066.
- SHAFAGHATI, N.; et al. Curcumin's protective effect on micronucleus formation in mice exposed to copper for 48 hours. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Inglaterra, v. 770, p. 109-113, 2014. DOI: 10.4103/0973-1296.131020
- SHEN, D.-W. et al. Cisplatin resistance: A cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. **Pharmacological Reviews**, Reino Unido, v. 64, n. 3, p. 706–721, 2012. DOI: 10.1124/pr.111.005637.
- SHIMADA, K. et al. Pulmonary administration of curcumin inhibits B16F10 melanoma lung metastasis and invasion in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, França, v. 82, n. 2, p. 265–273, 2018. DOI: 10.1007/s00280-018-3616-6.

- SHIMADA, K.; et al. Intraperitoneal administration of curcumin reduces metastasis and tumor cell invasion in a murine melanoma model using C57BL/6 mice. **Cancer Research**, Reino Unido, v. 78, n. 9, p. 2566-2578, 2018.
- SHOU, J.; et al. Pharmacological effects of curcumin on melanoma: Targeting key pathways to induce apoptosis in malignant cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Alemanha, v. 149, n. 3, p. 789-798, 2023.
- SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, Reino Unido, v. 22, n. 47, p. 7265–7279, 2003. DOI: 10.1038/sj.onc.1206933.
- SIDDIQUI, M. S., et al. Curcumin inhibits the growth of MAC16 colon tumors and prevents weight loss in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Londres, v. 20, n. 10, p. 757-765, 2009. DOI:10.1016/j.jnutbio.2008.05.007.
- SIEGEL RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. **CA Cancer Journal Clin.**, Estados Unidos, v. 70, n. 1, p. 7-30, 2020. DOI: 10.3322/caac.21590.
- SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Estados Unidos, v. 74, n. 1, p. 12–49, 17 jan. 2024.
- SINNBERG, T. et al. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR Signaling Sensitizes Melanoma Cells to Cisplatin and Temozolomide. **The journal of investigative dermatology/Journal of investigative dermatology**, Inglaterra, v. 129, n. 6, p. 1500–1515, 1 jun. 2009.
- SILVA, M. F. Síntese e avaliação da atividade antiproliferativa de novos compostos planejados por hibridação molecular da Curcumina e do Resveratrol. 2016. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - **Universidade Federal de Alfenas**, Alfenas, MG, 2016.
- SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. Planning for tomorrow: Global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. **Nature Reviews Clinical Oncology**, Reino Unido, v. 18, n. 10, p. 663–672, 2021.
- SOMMER, Sylwester; BURACZEWSKA, Iwona; KRUSZEWSKI, Marcin. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 21, n. 4, p. 1534, 2020. DOI: 10.3390/ijms21041534.
- STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A. Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials. **Antioxidants & Redox Signaling**, Estados Unidos, v. 10, n. 3, p. 511–546, 2008. DOI: 10.1089/ars.2007.1769
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; *et al.* Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Índia, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.
- TOMEH, M.; HADIANAMREI, R.; ZHAO, X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. **International journal of molecular sciences**, Suíça, v. 20, n. 5, p. 1033, 2019. DOI: 10.3390/ijms20051033.
- TOKUŞOĞLU, Ö.; ÜNAL, M. K.; YEMİŞ, F. Determination of the Phytoalexin Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) in Peanuts and Pistachios by High-Performance Liquid Chromatographic Diode Array (HPLC-DAD) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Estados Unidos, v. 53, n. 12, p.

5003–5009, 2005.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; *et al.* Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, Praga, v. 21, n. 8, p. 1650–1655, 2007.

VANNI, I., *et al.* Alterations in signaling pathways in cancer: MAPK, PIK3CA, KIT signaling pathways, and apoptosis/senescence." **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Alemanha, v. 146, n. 6, p. 1431-1444, 2020. DOI:10.1007/s00432-020-03312-6.

WANG *et al.* Pharmacological inhibition of NADPH oxidase protects against cisplatin induced nephrotoxicity in mice by two step mechanism. **Food and Chemical Toxicology**, Reino Unido, v. 83, p. 251–260, 2015 DOI: 10.1016/j.fct.2015.05.007

WANG, B. *et al.* Improving antimelanoma effect of curcumin by biodegradable nanoparticles. **Oncotarget**, Reino Unido, v. 8, n. 65, p. 108624–108642, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.20585.

WANG, T. Y.; CHEN, J. X. Effects of curcumin on vessel formation: Insight into the Pro- and antiangiogenesis of curcumin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Ásia, v. 2019, p. 1-11, 2019. DOI: 10.1155/2019/1390795.

WICK MR, SANTA CRUZ DJ, GRU AA. Non-lymphoid lesions that may mimic cutaneous hematopoietic neoplasms histologically. **Semin Diagn Pathol.**, Estados Unidos v. 34 ,n. 1,p. 99-107, 2017. DOI: 10.1053/j.semdp.2016.11.008.

WU, Xiao-Yu; ZHAI, Jing; HUAN, Xiang-Kun; *et al.* A Systematic Review of the Therapeutic Potential of Resveratrol During Colorectal Cancer Chemotherapy. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Emirados Árabes Unidos, v. 23, n. 10, p. 1137–1152, 2023.

YA, Z. *et al.* Mouse model for pre-clinical study of human cancer immunotherapy. **Current protocols in immunology**, Londres, v. 108, n. 1, p. 20.1.1-20.1.43, 2015. DOI: 10.1002/0471142735.im2001s108.

YANG, K. *et al.* Current Molecular Markers of Melanoma and Treatment Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 21, n. 10, 2020.

YANG, Q. *et al.* In vivo efficacy of nano hyaluronan-conjugated cisplatin for treatment of murine melanoma. **Journal of Drugs in Dermatology**, Estados Unidos, v. 13, n. 3, p. 283–287, 2014. PMID: 24595572.

YI, G. *et al.* Akt and β -catenin contribute to TMZ resistance and EMT of MGMT negative malignant glioma cell line. **Journal of the Neurological Sciences**, Suécia, v. 367, p. 101–106, 2016.

ZHANG, L., *et al.* Cisplatin-induced neurotoxicity: A review of clinical and experimental evidence. **Frontiers in Oncology**, Suíça, v. 10, n. 178, 2020. DOI:10.3389/fonc.2020.00178.

ZHANG, Y.; WANG, X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, Estados Unidos, v. 13, n. 1, 2020.

ZHANG, Y. P. *et al.* Effect of curcumin on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of human melanoma A375 cells. **Genetics and Molecular Research**, Europa, v. 14,

n. 1, p. 1056–1067, 2015. DOI: 10.4238/2015.

ZHAO, H. et al. Resveratrol induces apoptosis in human melanoma cell through negatively regulating Erk/PKM2/Bcl-2 axis. **OncoTargets and Therapy**, Reino Unido, v. 11, p. 8995–9006, 2018. DOI: 10.2147/OTT.S186247.

ZHOU, X.; HANSSON, G. K. Effect of sex and age on serum biochemical reference ranges in C57BL/6J mice. **Comparative medicine**, Espanha, v. 54, n. 2, p. 176–8, 2004.

ZHONGPING, X., et al. Curcumin improves extramedullary hematopoiesis in livers and spleens of tumor-bearing mice. **International Journal of Molecular Medicine**, Inglaterra, v. 36, n. 3, p. 617-624, 2015. DOI:10.3892/ijmm.2015.2197.

ANEXO A - Certificado De Aprovação Da Comissão De Ética No Uso De Animais

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS À ATIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPOSTOS SINTÉTICOS EM MELANOMA**, registrada com o nº **0003/2022**, sob a responsabilidade de **Pollyanna Francielli de Oliveira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **20/03/2022 a 20/03/2026**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

| Espécie/linhagem/raça | Total de animais | Total de machos | Total de fêmeas | Origem |
|-----------------------|------------------|-----------------|-----------------|---|
| Camundongo / C57bl6 | 274 | 274 | 0 | Centro de bioterismo da universidade federal de alfenas |

Alfenas, 03 de Setembro de 2024

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 7f3513a67d06078cd785ca4e8fa5db5c