



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E**  
**BIOTECNOLOGIA**

**ANA CAROLINA BATISTA BROCHADO**

**ANÁLISE DA AÇÃO ANTICÂNCER DO ÁLCOOL**  
**PERÍLICO EM CÉLULAS DE**  
**OSTEOSSARCOMA HUMANO**

Tese de Doutorado submetida a  
Universidade Federal Fluminense visando à obtenção do grau de  
Doutor em Ciências e Biotecnologia

**Orientador(es): Gutemberg Gomes Alves**  
**Paulo Emílio Leite**



Niterói  
2025

**ANA CAROLINA BATISTA BROCHADO**

**ANÁLISE DA AÇÃO ANTICÂNCER DO ÁLCOOL PERÍLICO  
EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA HUMANO**

Trabalho desenvolvido na Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário Antônio Pedro, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPERJ, UFF-FOPESQ

Tese de Doutorado submetida a Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências e Biotecnologia

**Orientador(es): Gutemberg Gomes Alves  
Paulo Emílio Leite**

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

B863a Brochado, Ana Carolina Batista  
Análise da ação anticâncer do álcool perílico em  
células de osteossarcoma humano / Ana Carolina Batista  
Brochado. - 2025.  
127 f.: il.

Orientador: Gutemberg Gomes Alves.  
Coorientador: Paulo Emílio Leite.  
Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto  
de Biologia, Niterói, 2025.

1. Álcool perílico. 2. Osteossarcoma. 3. Antineoplásico.  
4. Bioensaio. 5. Produção intelectual. I. Alves, Gutemberg  
Gomes, orientador. II. Leite, Paulo Emílio, coorientador.  
III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia.  
IV. Título.

CDD - XXX

**ANA CAROLINA BATISTA BROCHADO**

**ANÁLISE DA AÇÃO ANTICÂNCER DO ÁLCOOL PERÍLICO  
EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA HUMANO**

Tese de Doutorado submetida a  
Universidade Federal  
Fluminense como requisito  
parcial visando à obtenção do  
grau Doutor em Ciências e  
Biotecnologia

**Banca Examinadora:**

---

**Gutemberg Gomes Alves – Departamento de Biologia Celular e Molecular-  
UFF (Orientador/Presidente)**

---

**Jussara Machado Lagrota Candido– Departamento de Imunobiologia - UFF**

---

**Lídia Maria da Fonte de Amorim– Departamento de Biologia Celular e  
Molecular – UFF**

---

**Marcelo Salabert Gonzalez – Departamento de Biologia Geral - UFF**

---

**Elena Mavropoulos Oliveira Tude – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas**

---

**Jéssica Dornelas da Silva – CEO – NanoOnco3D**

---

**Mariana Rodrigues Pereira – Departamento de Neurobiologia – UFF  
(Suplente)**

---

**Moema Hausen – Faculdade de Ciências Médicas da Saúde - Pontifícia  
Universidade Católica de São Paulo (Suplente)**

---

**Paulo Emílio Leite – Unidade de Pesquisa Clínica – UFF (Coorientador)**

Para todos que foram meus incentivadores e  
fonte de força nessa caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Concluir o doutorado foi, sem dúvida, um dos maiores desafios da minha vida. Chegar até aqui e finalizar este trabalho não seria possível sem o apoio, força e incentivo de tantas pessoas que estiveram ao meu lado ao longo dessa jornada.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Guto, por sua compreensão, paciência e humanidade. Apesar de todas as dificuldades, você confiou em mim e me ajudou a acreditar que seria capaz de terminar este trabalho. Além disso, sou imensamente grata por todo o incentivo ao meu crescimento profissional durante todos esses anos.

Ao meu coorientador, Paulo, deixo minha gratidão por toda a ajuda e pelas conversas que trouxeram calma e ânimo nos momentos mais desafiadores.

Aos meus amigos da UPC, que são mais do que amigos: a família que a vida me deu. Um agradecimento especial a Joice, Luciana, Victor, Sharlene, Jéssica, Yasmin e Margareth. Sem vocês, essa caminhada teria sido muito mais difícil. Obrigada por cada momento de apoio, risadas e companheirismo.

À minha família que me apoiou para que eu alcançasse o tão sonhado título de doutora. Mãe, Ana Lúcia, e minha irmã, Fernanda, obrigada por compreenderem minha ausência em momentos tão importantes e difíceis. Ao meu pai, Luiz Carlos, minha eterna gratidão por sempre me incentivar a estudar e, com tanto orgulho, contar ao mundo que tinha uma filha doutora até em seus últimos momentos.

Eric, meu amor, obrigada por ser meu alicerce em todos os momentos, pelas noites viradas no laboratório, pelo suporte emocional e por estar ao meu lado nesta reta final. Sem você, tudo teria sido muito mais difícil.

Hércules, meu eterno melhor amigo e alma gêmea, obrigada por estar sempre ao meu lado, me apoiar em todos os momentos e encher minha vida de leveza e amor.

Por fim, agradeço aos meus colegas de trabalho no BCRJ, especialmente Antonio, Nívea, Paola e Kátia, por compreenderem minhas ausências e me incentivarem a seguir em frente. Obrigada por acreditarem em mim e me apoiarem até a conclusão deste sonho.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE TABELAS .....	XVII
RESUMO .....	XVIII
ABSTRACT .....	XIX
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER .....	1
1.2 OSTEOSSARCOMA.....	5
1.3 PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DO CÂNCER .....	21
1.4 ÁLCOOL PERÍLICO.....	22
2. OBJETIVO GERAL .....	26
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
3.1 REAGENTES.....	27
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ÁLCOOL PERÍLICO .....	27
3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ÁCIDO PERÍLICO.....	27
3.4 CULTIVO CELULAR.....	28
3.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE .....	28
3.6 MIGRAÇÃO CELULAR (ENSAIO DE RANHURA).....	29
3.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	30
3.8 CICLO CELULAR .....	30
3.9 IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS DE MORTE CELULAR .....	31
3.10 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	31
3.11 ANÁLISE DE MÚLTIPLOS FATORES SECRETADOS .....	32
3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
4. RESULTADOS .....	34
4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA (IC <sub>50</sub> ) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).....	34
4.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	35
4.3 ANÁLISE DOS EFEITOS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	38
4.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR .....	41
4.5 INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE MORTE CELULAR.....	46
4.6 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	53
4.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO .....	55
5. DISCUSSÃO .....	58
5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA (IC <sub>50</sub> ) E SELETIVIDADE DOS TRATAMENTOS NAS LINHAGENS CELULARES.....	59
5.2 EFEITO MIGRATÓRICO DO ÁLCOOL PERÍLICO, ÁCIDO PERÍLICO E CISPLATINA.....	61
5.3 EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E MODULAÇÃO DO CICLO CELULAR PELO ÁLCOOL PERÍLICO, ÁCIDO PERÍLICO E CISPLATINA .....	63

5.4	ANÁLISE DAS VIAS DE MORTE CELULAR .....	72
5.5	ANÁLISE DA INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	75
5.6	ANÁLISE DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO.....	78
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	87
6.1	CONCLUSÕES.....	87
6.2	PERSPECTIVAS .....	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
8.	APÊNDICES E ANEXOS .....	107
8.1	APÊNDICES .....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS

2D - Bidimensional

3D - Tridimensional

AP - ácido perílico

AP-1 - Complexo de proteínas ativadoras 1

BMP-2 - Proteína morfogenética óssea 2

CDKs - Quinases dependentes de ciclinas

CFSE - Éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína

CM-H2DCFDA - 5-(6)-Clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, éster acetil

CTGF - Fator de crescimento do tecido conjuntivo

DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos

DHPA - Ácido di-hidroperílico

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

EROS - Espécies reativas de oxigênio

ET-1- Endotelina-1

FAK - Quinase de adesão focal

FAL – Fosfatase alcalina

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

GST - genes supressores de tumores

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HIF-1 $\alpha$  - Fator induzível por hipóxia 1-alfa

IC<sub>50</sub> - Concentração inibitória média

IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-11 - Interleucina 11

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IMC - índice de massa corporal

IS - Índice de seletividade

LDH - Desidrogenase láctica

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1

MEC - Matriz extracelular

MEK - Proteína quinase quinase ativada por mitógeno

MLKL - Proteína semelhante ao domínio da quinase de linhagem mista

MMPs - Metaloproteinases da matriz

MRP1- Transportador de proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas

MSC - Células-tronco mesenquimais

MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina)

MYC - Homólogo do oncogene viral da mielocitomatose

NCI - National Cancer Institute

NK - Natural killer

NO - Óxido nítrico

N1ICD - Domínio intracelular Notch1

OH - Osteoblastos humanos primários

OS - Osteossarcoma

P-gp - Glicoproteína P

P21 - Inibidor de quinase dependente de ciclina

PARP-1 - poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase

PBS - Tampão fosfato-salino

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PEDF - Fator derivado do epitélio pigmentar

PGE2 - Prostaglandina E2

PKC - Proteína quinase C

POH - Álcool perílico

PTH - Hormônio da paratireóide

PTHrP - Peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide

RANK - Receptor ativador nuclear kappa B

RANKL - Ligante do fator nuclear  $\kappa$ B

RAS - Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato

RB - Retinoblastoma

RIPK1- Receptor Interacting Protein Kinase 1

RIPK3 - Receptor Interacting Protein Kinase 3

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro Fetal Bovino

TAMs - Macrófagos associados ao tumor

TGF - Fator de crescimento transformador

TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformador beta

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

TRK - Receptor quinase da tropomiosina

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VHL - Von Hippel-Lindau

WNT - Família de sites de integração MMTV do tipo Wingless

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura anatômica de um osso longo, destacando suas principais regiões e características estruturais (Adaptado de Lecturio, 2024). .....	8
<b>Figura 2:</b> Superexpressão de fatores de transcrição específicos e desregulação de genes supressores de tumor associados ao desenvolvimento do osteossarcoma. Fonte: Rathore e Van Tine (2021). .....	11
<b>Figura 3:</b> Regulação do ciclo celular mediada pela proteína RB (retinoblastoma). Fonte: Ballatori e Hinds (2016). .....	12
<b>Figura 4:</b> Angiogênese mediada por vias de sinalização envolvendo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Fonte: Ghalehbandi et al., 2023. ....	17
<b>Figura 5:</b> Composição e transdução de sinal da família das integrinas na progressão do osteossarcoma (adaptado de Li et al., 2021). .....	18
<b>Figura 6:</b> Ciclo de ativação osteoclástica entre células tumorais e células ósseas no microambiente do osteossarcoma, destacando as interações que favorecem o desenvolvimento e progressão tumoral. Fonte: Verrecchia e Rédini (2018). .....	20
<b>Figura 7:</b> Ilustração dos múltiplos mecanismos de ação do álcool perílico (POH) em células tumorais, incluindo a indução de apoptose por meio da ativação de caspases (Caspases 3, 6 e 7) e proteínas pró-apoptóticas (BAX, BID, entre outras), a regulação da via do TGF- $\beta$ por SMADs e a parada do ciclo celular por meio da inibição da via Ras/MEK/ERK. O POH também está envolvido na redução da expressão de genes relacionados ao crescimento celular, como c-Myc e c-Fos, além de interferir no metabolismo lipídico pela modulação da síntese de mevalonato. Esses mecanismos contribuem para a citotoxicidade em células tumorais, destacando o POH como uma molécula com múltiplos alvos terapêuticos potenciais. ....	24
<b>Figura 8:</b> Monitoramento da migração celular no ensaio de ranhura ao longo de 24 horas da linhagem tumoral MG-63. As imagens mostram o fechamento da ranhura em células tratadas com diferentes condições experimentais ao longo do tempo. As linhas representam grupos experimentais específicos. A primeira linha refere-se ao controle negativo (células não tratadas) sem exposição prévia à Mitomicina C, a segunda linha refere-se ao controle negativo (células não tratadas) expostas previamente à Mitomicina C. As linhas subsequentes mostram células tratadas com cisplatina, álcool perílico (POH), e ácido perílico (AP). As colunas correspondem	

aos diferentes tempos de análise: 0h, 6h, 12h, 18h, e 24h após a criação da ranhura. As linhas amarelas foram geradas automaticamente pelo ImageJ, e indicam a borda da ranhura. A progressão ao longo do tempo revela a capacidade de migração celular sob diferentes condições de tratamento, com menor fechamento observável nos grupos do POH e AP, sugerindo um efeito inibitório sobre a migração celular. Ensaio realizado em duplicata..... 35

**Figura 9:** Monitoramento da migração celular no ensaio de ranhura ao longo de 24 horas na linhagem tumoral U2-OS. As imagens mostram o fechamento da ranhura em células tratadas com diferentes condições experimentais ao longo do tempo. A primeira linha corresponde ao controle negativo (células não tratadas) sem exposição à Mitomicina C, enquanto a segunda linha representa o controle negativo tratado com Mitomicina C. As linhas subsequentes mostram células tratadas com cisplatina, álcool perílico (POH), e ácido perílico (AP). As colunas indicam os diferentes tempos de análise: 0h, 6h, 12h, 18h, e 24h após a criação da ranhura. As linhas amarelas foram geradas automaticamente pelo ImageJ, e indicam a borda da ranhura. A progressão ao longo do tempo revela a capacidade de migração celular sob diferentes condições de tratamento, com menor fechamento observável nos grupos do POH, AP e cisplatina, sugerindo um efeito inibitório sobre a migração celular. Ensaio realizado em duplicata..... 37

**Figura 10:** Perfis de proliferação celular obtidos através de citometria de fluxo usando o marcador de proliferação CFSE (Carboxyfluoresceína diacetato succinimidil éster). Foram utilizadas diferentes linhagens celulares de osteossarcoma (MG-63, U2-OS) e osteoblastos primários (OH) submetidas a diferentes condições de tratamento: controle de veículo (A), cisplatina (B), ácido perílico (C), álcool perílico (D) e combinação de álcool perílico com cisplatina (E). Cada gráfico representa a distribuição de fluorescência (indicando a divisão celular) em função do tempo de exposição ao tratamento, com tempos de 24h (rosa), 48h (roxo), 72h (azul), 96h (verde) e 120h (vermelho). A redução progressiva na intensidade de fluorescência indica o aumento do número de divisões celulares, refletindo a taxa de proliferação. Ensaio realizado em duplicata. .... 39

**Figura 11:** Análise do ciclo celular por citometria de fluxo com marcação de DNA usando DAPI, em diferentes linhagens celulares após tratamentos específicos. A quantidade de células em cada fase do ciclo celular (G1, S e G2/M) foi avaliada em células tumorais MG-63 (A), U2-OS (B) e em células normais OH (C). Cada painel

representa a distribuição das células nas fases do ciclo celular para os tratamentos controle do veículo, cisplatina, ácido perílico, álcool perílico e a combinação de álcool perílico com cisplatina. As regiões em roxo indicam a fase G1, a fase S é indicada em amarelo e a fase G2 em verde conforme a intensidade de fluorescência do DAPI, que reflete o conteúdo de DNA. Ensaio realizado em triplicata..... 42

**Figura 12:** Análise do ciclo celular por citometria de fluxo após marcação com DAPI em diferentes tipos de células após tratamento por 24 horas com cisplatina, ácido perílico, álcool perílico e a combinação de álcool perílico com cisplatina. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (G1, S e G2) foi determinada em células tumorais MG-63 (A), U2-OS (B) e em células normais OH (C). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) em comparação ao controle. Ensaio realizado em triplicata. .... 44

**Figura 13:** Distribuição de células em diferentes estágios de morte celular analisadas por citometria de fluxo com Anexina V e iodeto de propídio (PI). Os eixos X e Y representam canais de fluorescência verde (FL1-H) e vermelho (FL3-H) e mostram coloração de Anexina V e PI, respectivamente. As análises foram realizadas em duas linhagens tumorais, MG-63 e U2-OS, e em osteoblastos humanos primários, OH. As células foram submetidas a diferentes condições experimentais: A- controle de veículo, B- ácido perílico, C- álcool perílico, D- álcool perílico com cisplatina e E- estaurosporina (controle positivo). Em cada gráfico, as células são classificadas em quatro quadrantes: Q1 (Anexina V-/PI+), indicando células necrosadas; Q2 (Anexina V+/PI+), representando células em apoptose tardia; Q3 (Anexina V+/PI-), correspondendo a células em apoptose inicial; e Q4 (Anexina V-/PI-), indicando células viáveis. Ensaio realizado em triplicata..... 47

**Figura 14:** A figura apresenta a porcentagem das células MG-63, U2-OS e OH (osteoblastos humanos primários) em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose após tratamento com diferentes condições: controle de veículo, ácido perílico, álcool perílico e álcool perílico combinado com cisplatina (CISP). Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo utilizando os marcadores Anexina V e iodeto de propídio, permitindo a distinção entre células viáveis, apoptóticas e necróticas. (A) Linhagem MG-63: mostra uma resposta significativa nas condições com álcool perílico e sua combinação com cisplatina, com aumento na apoptose inicial e tardia, além de uma elevação na necrose em comparação ao controle. (B) Linhagem U2-

OS: há uma resposta menos pronunciada, com diferenças significativas observadas apenas na apoptose inicial após o tratamento com ácido perílico e álcool perílico. (C) Linhagem OH: há uma tendência de aumento na apoptose inicial, tardia e necrose, especialmente na combinação de álcool perílico com cisplatina, embora sem diferenças estatisticamente significativas. O eixo y representa a % de células e o eixo x os diferentes tratamentos. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão, e as marcações de significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) indicam comparações significativas entre as condições de tratamento. Ensaio realizado em triplicata. .... 50

**Figura 15:** Níveis de apoptose e necrose entre as linhagens de osteossarcoma MG-63 e a célula normal, OH após tratamentos com ácido perílico (AP), álcool perílico (POH) e álcool perílico combinado com cisplatina (POH + CISP). As análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando Anexina V e iodeto de propídio para identificar as diferentes fases da morte celular. (A) Efeito do AP sobre apoptose inicial, apoptose tardia e necrose entre as linhagens celulares. A linhagem MG-63 apresenta um aumento significativo na necrose em comparação com OH. (B) Efeito do POH sobre apoptose inicial, apoptose tardia e necrose entre as linhagens. Observa-se uma diferença significativa na apoptose inicial e tardia para a linhagem MG-63 em relação a célula normal. (C) Efeito da combinação de POH + CISP sobre apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. A combinação induz apoptose tardia e necrose de maneira mais pronunciada na linhagem MG-63 em comparação com OH. O eixo y representa a % de células e o eixo x as diferentes linhagens celulares. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão, com marcações de significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ), indicando diferenças significativas entre as linhagens celulares. Ensaio realizado em triplicata. .... 52

**Figura 16:** (A) Histograma representando a intensidade de fluorescência do marcador H2CMDCFA para detecção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células MG-63 sob diferentes condições de tratamento. Observa-se um aumento na intensidade de fluorescência nas células tratadas, sugerindo um aumento na produção de EROS. (B) Dados quantitativos da produção de EROS em células MG-63. O eixo y representa a média geométrica da intensidade de fluorescência e o eixo x os diferentes tratamentos. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão, e as marcações de significância estatística (\* $p < 0,05$ ) indicam comparações

significativas entre as condições de tratamento com relação ao controle. Ensaio realizado em triplicata. .... 53

**Figura 17:** (A) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência do marcador H2CMDCEFA nos diferentes grupos experimentais na célula U2-OS. O deslocamento do pico para a direita indica um aumento na produção de EROS. (B) Média geométrica da intensidade de fluorescência para cada grupo experimental. O controle do veículo apresentou baixa fluorescência, enquanto o controle positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induziu um aumento expressivo na produção de EROS. O tratamento com ácido perílico levou a um aumento significativo na intensidade de fluorescência, atingindo valores comparáveis ao controle positivo. A cisplatina induziu um leve aumento na produção de EROS, enquanto o álcool perílico e a combinação de álcool perílico com cisplatina não apresentaram variações significativas em relação ao controle do veículo. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (EPM). \*p < 0,05 em relação ao controle do veículo. Ensaio realizado em triplicata. .... 55

**Figura 18:** Heatmap representando as concentrações (em pg/mL) de 20 analitos em células MG-63, U2-OS e OH sob diferentes tratamentos (Controle, POH, PA e Cisplatina). Cada linha corresponde a um analito específico, enquanto as colunas refletem os diferentes tipos celulares e condições experimentais. Tons de azul mais escuros indicam concentrações mais altas de analitos, enquanto tons mais claros representam concentrações mais baixas. A escala de cores à direita fornece uma referência para a variação de concentração. .... 56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores da concentração inibitória 50% (IC <sub>50</sub> ) e índice de seletividade (IS) do álcool perílico, ácido perílico e cisplatina nas linhagens de células ósseas. Ensaio realizado em quadruplicata.....	34
<b>Tabela 2:</b> Porcentagem de fechamento da ranhura nos diferentes grupos experimentais utilizando a linhagem MG-63 ao longo de 24 horas. ....	36
<b>Tabela 3:</b> Porcentagem de fechamento da ranhura nos diferentes grupos experimentais utilizando a linhagem U2-OS ao longo de 24 horas. ....	38
<b>Tabela 4:</b> Porcentagem de retenção de fluorescência do marcador CFSE nas linhagens celulares MG-63, U2-OS e OH ao longo de 120 horas sob diferentes condições experimentais. ....	40
<b>Tabela 5:</b> Distribuição percentual das células nos quadrantes Q1, Q2, Q3 e Q4 nas células MG-63, U2-OS e OH após diferentes tratamentos.....	48

## RESUMO

O osteossarcoma é o tumor maligno ósseo mais comum, com alta taxa de metástase e resistência aos tratamentos disponíveis. Apesar dos avanços em oncologia, não há desenvolvimento de novos medicamentos há décadas, reforçando a necessidade de novas abordagens terapêuticas. Produtos naturais têm se mostrado fontes promissoras de compostos bioativos com potencial anticâncer. Nesse contexto, este estudo investigou os efeitos do álcool perílico (POH), um monoterpene vegetal, e seu metabólito ácido perílico (AP) em linhagens de osteossarcoma (MG-63, U2-OS) e osteoblastos humanos primários (OH). Foram realizados ensaios de citotoxicidade, proliferação, ciclo celular, morte celular, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), migração celular e análise multiplex de citocinas e fatores de crescimento. O POH e AP apresentaram índice de seletividade <3 para ambas as linhagens tumorais, mas reduziram a migração e proliferação celular sem efeitos significativos nas células normais. A combinação de POH com cisplatina foi mais eficaz na inibição da proliferação, especialmente na U2-OS. POH induziu parada do ciclo celular em G1 (U2-OS), enquanto AP apresentou esse efeito na MG-63; já a combinação com cisplatina causou parada em G2. O POH induziu apoptose, necrose e possível necroptose na MG-63, enquanto AP induziu apoptose exclusivamente. Ambos aumentaram a produção de EROS, com maior efeito para POH. Além disso, modularam mediadores inflamatórios como MIP-1 $\beta$ , IL-5, TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-10, reduzindo sua produção, e aumentaram IL-6 e IL-1ra. O POH destacou-se pela redução de IL-8 e VEGF, associados à angiogênese e progressão tumoral. Esses achados sugerem que POH e AP têm potencial terapêutico ao modular inflamação, angiogênese e interação imune, contribuindo para limitar a progressão e disseminação metastática do osteossarcoma.

**Palavras-chave:** Álcool perílico, ácido perílico, osteossarcoma, câncer, testes *in vitro*.

## ABSTRACT

Osteosarcoma is the most common malignant bone tumor, characterized by a high metastasis rate and resistance to available treatments. Despite advances in oncology, no new drugs have been developed for decades, reinforcing the need for novel therapeutic approaches. Natural products have emerged as promising sources of bioactive compounds with anticancer potential. In this context, this study investigated the effects of perillyl alcohol (POH), a plant-derived monoterpene, and its metabolite perillic acid (PA) on osteosarcoma cell lines (MG-63, U2-OS) and primary human osteoblasts (OH). Cytotoxicity, proliferation, cell cycle, cell death, reactive oxygen species (ROS) production, cell migration, and multiplex analysis of cytokines and growth factors were assessed. POH and PA exhibited a selectivity index  $<3$  for both tumor cell lines but reduced cell migration and proliferation without significant effects on normal cells. The combination of POH with cisplatin was more effective in inhibiting proliferation, particularly in U2-OS. POH induced G1 cell cycle arrest in U2-OS, while PA had this effect in MG-63; the combination with cisplatin, however, caused G2 arrest. POH induced apoptosis, necrosis, and possible necroptosis in MG-63, whereas PA exclusively induced apoptosis. Both compounds increased ROS production, with POH exhibiting a stronger effect. Furthermore, POH and PA modulated inflammatory mediators such as MIP-1 $\beta$ , IL-5, TNF- $\alpha$ , MCP-1, and IL-10 by reducing their levels, while increasing IL-6 and IL-1ra. Notably, POH reduced IL-8 and VEGF levels, which are associated with angiogenesis and tumor progression. These findings suggest that POH and PA possess therapeutic potential by modulating inflammation, angiogenesis, and immune interactions, contributing to the limitation of osteosarcoma progression and metastatic spread.

**Keywords:** Perillyl alcohol, perillic acid, osteosarcoma, cancer, *in vitro* assays.

# 1. INTRODUÇÃO

O câncer permanece como uma das maiores ameaças à saúde global. Em 2022, foram registrados cerca de 20 milhões de novos casos da doença e 9,7 milhões de mortes. Estima-se que aproximadamente 1 em cada 5 pessoas desenvolverá câncer ao longo da vida, com cerca de 1 em cada 9 homens e 1 em 12 mulheres morrendo em decorrência da doença. Até 2050, espera-se um aumento de 77% nos casos de câncer, ultrapassando 35 milhões de novos diagnósticos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2024). Esse crescimento global do número de casos é impulsionado pelo envelhecimento populacional e pelo crescimento demográfico. Além disso, a era do Antropoceno traz desafios adicionais, com o aumento da influência humana sobre fatores ambientais que, aliados a mudanças no estilo de vida e na dieta, elevam a exposição a riscos. Muitos desses fatores estão associados ao desenvolvimento socioeconômico (IZBICKA E STREEPER, 2023).

## 1.1 FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER

O câncer é uma doença complexa caracterizada pelo aumento da sinalização de proliferação celular, instabilidade genética e escape da morte celular programada. Como resultado, há uma proliferação descontrolada, que pode culminar na invasão de tecidos e órgãos saudáveis, além da disseminação para outras partes do corpo (SINKALA, 2023). Esse crescimento desregulado é provocado pelo acúmulo de mutações em diversos genes que regulam o funcionamento celular (SINKALA, 2023). Estas mutações podem ser desencadeadas por uma variedade de fatores, como erros aleatórios durante as divisões celulares (LEDFOURD, 2017), agressões ao DNA induzidas por agentes ambientais, como radiação (BEHJATI *et al.*, 2016), e mutações hereditárias (MENDIRATTA *et al.*, 2021).

O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplas etapas, que envolve o acúmulo de mutações e a seleção de células com capacidades progressivamente aumentadas de proliferação, sobrevivência, invasão e metástase (KONTOMANOLIS *et al.*, 2020). A primeira etapa desse processo, chamada de iniciação do tumor, é geralmente resultado de uma alteração genética que leva à proliferação anormal de uma célula única. Esta célula, por sua vez, gera uma

população clonada de células tumorais (KONTOMANOLIS *et al.*, 2020). A progressão do tumor ocorre à medida que mutações adicionais proporcionam vantagens seletivas, como crescimento acelerado, permitindo que estas células se tornem dominantes na população tumoral. Esse processo de evolução tumoral, conhecido como seleção clonal, contribui para o crescimento acelerado e a malignidade crescente dos tumores (KONTOMANOLIS *et al.*, 2020).

### **1.1.1 Oncogênese**

Cada caso de câncer possui uma composição genética única (MENDIRATTA *et al.*, 2021; NCI, 2021). Mesmo no interior de um tumor, células distintas podem apresentar perfis genéticos diferentes (NCI, 2021). As mutações genéticas que contribuem para o desenvolvimento do câncer geralmente afetam três categorias primárias de genes: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes envolvidos na reparação do DNA (NCI, 2021).

Os proto-oncogenes são genes que codificam proteínas essenciais para a regulação de processos celulares como a divisão, a diferenciação e a apoptose (MALEBARY *et al.*, 2021). Esses processos são fundamentais tanto para o desenvolvimento humano normal quanto para a manutenção de tecidos e órgãos. Por isso, muitos proto-oncogenes desempenham papéis cruciais durante a embriogênese. Os exemplos mais conhecidos de proto-oncogenes são RAS, WNT, MYC, ERK e TRK (BOTEZATU *et al.*, 2016).

Quando um proto-oncogene sofre uma mutação ou é amplificado, ele pode se tornar hiperativo, transformando-se em um oncogene (MALEBARY *et al.*, 2021). Oncogenes são conhecidos por promover a divisão celular excessiva, inibir a diferenciação e suprimir a apoptose, características fundamentais das células cancerosas (BOTEZATU *et al.*, 2016). Os oncogenes podem ser ativados por diferentes mecanismos, tais como:

I- Mutação genética: Algumas mutações podem ativar, permanentemente, um oncogene (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022), e este, por sua vez, pode levar a uma mudança na estrutura da proteína codificada, aumentando sua atividade transformadora (BOTEZATU *et al.*, 2016). Essas mutações podem ser herdadas ou adquiridas durante a vida, muitas vezes ocorrendo durante a divisão celular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

II- Alterações epigenéticas: Modificações químicas no DNA ou RNA, como a metilação, podem afetar a expressão de genes, levando à ativação indevida de oncogenes (ZHU *et al.*, 2023).

III- Rearranjos cromossômicos: Durante a divisão celular, rearranjos na sequência de DNA podem posicionar um gene regulador ao lado de um proto-oncogene, ativando-o de forma anormal (DI MARCO *et al.*, 2022; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

IV- Amplificação Gênica: A presença de múltiplas cópias de um gene pode resultar na produção excessiva de proteínas oncogênicas (BAGCI E KURTGÖZ, 2015).

Esses mecanismos tornam os oncogenes alvos-chave no desenvolvimento de terapias anticâncer (CHIAL, 2008; DANESI *et al.*, 2021).

Os genes supressores de tumores (GSTs) são uma categoria de genes essenciais para garantir que o crescimento celular seja cuidadosamente regulado. Estes permitem que as células se dividam apenas quando necessário e em resposta a sinais externos específicos, como os fatores de crescimento (GREGORY E COPPLE, 2022). Além disso, desencadeiam a apoptose quando as células sofrem estresse, como danos ao DNA, e impedem que as células migrem e invadam outros tecidos (DAKAL *et al.*, 2024). Quando esses genes não funcionam corretamente, podem levar à quebra desses processos celulares críticos. Em consequência, há proliferação celular descontrolada, falha em sofrer apoptose em resposta a danos e potencial das células invadirem os tecidos circundantes com metástase para outras partes do corpo (DAKAL *et al.*, 2024; GREGORY E COPPLE, 2022).

Um notável exemplo de GST é o gene TP53, que codifica a proteína p53. Esta proteína é crucial para manutenção da estabilidade genômica por meio do reparo do DNA, para induzir a parada do ciclo celular, apoptose e senescência (FEROZ E SHEIKH, 2020). Mutações que inativam o TP53 são comuns no processo de tumorigênese, ocorrendo em mais de 50% dos tumores primários humanos (CHEN *et al.*, 2022). Mutações herdadas no TP53 estão associadas à síndrome de Li-Fraumeni, que aumenta o risco de vários tipos de câncer, incluindo osteossarcoma (CHIAL, 2008).

Os genes de reparo de DNA são responsáveis por manter a integridade genômica através da codificação de proteínas que identificam e corrigem danos ao DNA (KARAKAIDOS *et al.*, 2020). Quando esta correção não é possível, estes genes induzem a apoptose (CHATTERJEE E WALKER, 2017). Mutações nos genes de reparo de DNA podem resultar no acúmulo de mutações em outras regiões do genoma, contribuindo para o aumento da instabilidade genética e, conseqüentemente, progressão do tumor (SOUSA *et al.*, 2019). Quando o tumor está estabelecido, a atividade de reparo sofre reativação, o que evita o colapso celular, permitindo a progressão do tumor e aumentando a resistência aos tratamentos (SOUSA *et al.*, 2019). Assim como outras mutações, alterações nos genes de reparo de DNA podem ser herdadas ou adquiridas. Exemplos importantes incluem os genes BRCA1 e BRCA2, cujas mutações estão associadas a um maior risco de câncer de mama e ovário (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

### **1.1.2 Fisiopatologia do microambiente tumoral**

Assim como nos tecidos normais, os tumores sólidos necessitam de um fornecimento contínuo de oxigênio e nutrientes, além de mecanismos eficientes para a remoção dos resíduos do metabolismo celular. No estágio inicial do desenvolvimento tumoral, essas necessidades são supridas pelo sistema vascular normal do órgão hospedeiro (YANG *et al.*, 2024). No entanto, à medida que o tumor cresce, o suprimento vascular torna-se insuficiente para sustentar a demanda metabólica crescente. Em resposta, os tumores iniciam a formação de seu próprio suprimento vascular funcional por meio do processo de angiogênese (YANG *et al.*, 2024). Contudo, essa nova vascularização é frequentemente desorganizada e disfuncional. Isso resulta em um microambiente tumoral caracterizado por má perfusão, hipoxia, deficiência de nutrientes, acidez elevada, e alta pressão do fluido intersticial (HORSMAN E VAUPEL, 2016).

Apesar dessas condições adversas, as células tumorais conseguem sobreviver nesse microambiente hostil. Para isso, elas aumentam a expressão de diversos genes e intensificam a biossíntese de proteínas, o que não apenas favorece sua sobrevivência, mas também pode elevar a agressividade do tumor e sua capacidade metastática (YANG *et al.*, 2024). Além disso, essas condições microambientais desfavoráveis podem tornar as células tumorais mais resistentes

às terapias convencionais contra o câncer, incluindo a radioterapia e quimioterapia (HORSMAN E VAUPEL, 2016).

## **1.2 OSTEOSSARCOMA**

O osteossarcoma (OS) é o tipo mais comum de tumor ósseo maligno primário, derivado de células mesenquimais que produzem tecido ósseo imaturo ou osteoide (PRATER E MCKEON, 2023). O OS pode ser primário, quando ocorre devido a uma anormalidade no desenvolvimento ósseo, ou secundário, quando é resultado de outra condição (SHOAIB *et al.*, 2022). Os OS primários são mais comuns em crianças e adolescentes cujos ossos ainda estão fase de crescimento, enquanto os OS secundários geralmente ocorrem em adultos cujos ossos estão totalmente formados (PRATER E MCKEON, 2023).

O OS é responsável por aproximadamente 2,4% dos cânceres pediátricos, sendo a oitava malignidade mais comum da infância (PRATER E MCKEON, 2023). O OS tem uma distribuição de idade bimodal, tendo um pico inicial na faixa etária de 10 a 14 anos e um segundo pico em adultos com mais de 65 anos (PRATER E MCKEON, 2023). A taxa de incidência de osteossarcoma em todas as raças e sexos é de cinco casos por ano por milhão de pessoas na faixa etária de 0 a 19 anos (PRATER E MCKEON, 2023). Os negros são o grupo étnico mais afetado pelo OS, com uma incidência de 6,8 casos por milhão de pessoas a cada ano (MARGIONO E ANDREANI, 2023). Em seguida, estão os hispânicos, com uma taxa de 6,5 casos anuais por milhão (MARGIONO E ANDREANI, 2023). Já entre os indivíduos brancos, essa malignidade ocorre em 4,6 casos por milhão de pessoas anualmente (MARGIONO E ANDREANI, 2023). Além disso, o OS ocorre mais frequentemente em homens do que em mulheres (MARGIONO E ANDREANI, 2023). Embora incomum, o OS é extremamente agressivo, pois apenas aproximadamente 20% dos pacientes apresentam metástase detectável no diagnóstico. Além disso, presume-se que quase todos os pacientes com a doença localizada já possuem micrometástase e quase metade deles progredirá para metástase clínica (SHENG *et al.*, 2021).

O principal desafio no tratamento do OS reside nos pacientes que apresentam resposta insuficiente à quimioterapia (TIPPETT *et al.*, 2023). Embora os mecanismos exatos que levam ao desenvolvimento da quimiorresistência ainda

sejam pouco compreendidos, essa resistência pode ser classificada como adquirida ou intrínseca (TIPPETT *et al.*, 2023). A resistência adquirida ocorre quando o tumor, após uma resposta inicial positiva à quimioterapia, desenvolve alterações genéticas adaptativas, gerando uma subpopulação de células resistentes. Por outro lado, a resistência intrínseca refere-se a tumores que não respondem ao tratamento desde o início, sugerindo a presença de subpopulações celulares pré-existentes com vantagens de sobrevivência devido à heterogeneidade tumoral (TIPPETT *et al.*, 2023). Em ambos os casos, a complexidade biológica do OS e sua capacidade de adaptação aos agentes terapêuticos representam obstáculos significativos na busca por tratamentos mais eficazes.

### **1.2.1 Prognóstico**

O prognóstico do OS é influenciado por diversos fatores, como idade, sexo, biomarcadores, localização e tamanho do tumor, características histológicas, resposta à quimioterapia, fraturas patológicas e índice de massa corporal (IMC). Pacientes com mais de 60 anos tendem a ter um prognóstico pior, geralmente devido à recusa de quimioterapia e cirurgia radical (PRATER E MCKEON, 2023). Homens também apresentam piores resultados, com menor resposta ao tratamento e maior taxa de recorrência (XIN E WEI, 2020). Biomarcadores elevados, como fosfatase alcalina (FAL) sérica e desidrogenase láctica (LDH), particularmente em casos de metástase, estão associados a desfechos menos favoráveis (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2024).

Tumores localizados no esqueleto axial, especialmente no fêmur, apresentam um prognóstico pior, assim como tumores grandes (maiores que 15 cm ou com volume superior a 200 mL), que estão relacionados a maior morbidade e maior risco de amputação (SMELAND *et al.*, 2019). Do ponto de vista histológico, tumores com diferenciação fibroblástica tendem a ter um prognóstico mais favorável, enquanto os tumores condroides estão associados a piores resultados (PRATER E MCKEON, 2023). A necrose tumoral induzida pela quimioterapia é um dos principais preditores de sobrevivência: uma taxa de necrose de 90% ou mais está fortemente associada a um excelente prognóstico (XIN E WEI, 2020). Pacientes com fraturas patológicas, especialmente se ocorrerem durante a quimioterapia pré-operatória, enfrentam um risco aumentado de recorrência e menor sobrevida

(PRATER E MCKEON, 2023). Em geral, a taxa de sobrevivência relativa em 5 anos é 59%, segundo a Sociedade Americana de Câncer.

### **1.2.2 Tratamentos disponíveis**

Os tratamentos disponíveis para pacientes com OS não sofreram grandes mudanças nos últimos 40 anos, apesar de até 68% dos pacientes serem considerados respondedores fracos ao tratamento de primeira linha (TIPPETT *et al.*, 2023). Além disso, não há uma terapia de segunda linha estabelecida para esses pacientes, resultando em um prognóstico desfavorável (TIPPETT *et al.*, 2023).

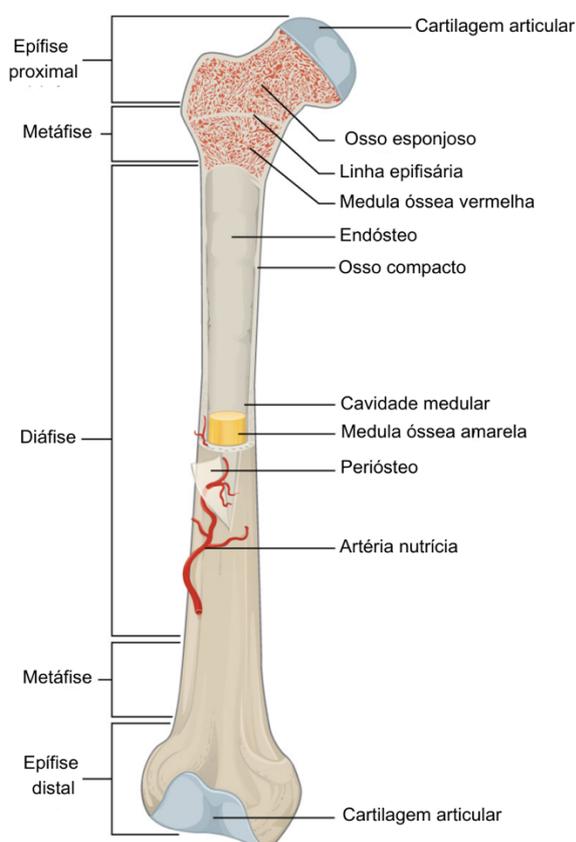
O tratamento de primeira linha é a primeira opção terapêutica oferecida ao paciente após o diagnóstico, geralmente porque se acredita que tenha a melhor combinação de eficácia e segurança (NCI, 2024). Esse tratamento é baseado em estudos clínicos e evidências científicas, sendo o protocolo padrão para cada tipo específico de câncer. Para o osteossarcoma, o tratamento de primeira linha para a maioria dos pacientes costuma ser a quimioterapia, juntamente com cirurgia de preservação de membro para remover o tumor primário (HARRIS E HAWKINS, 2022). Na quimioterapia, é comum a administração conjunta de dois ou mais medicamentos. Algumas combinações frequentemente utilizadas incluem: altas doses de metotrexato, doxorrubicina e cisplatina (conhecido como MAP), ocasionalmente acompanhado de ifosfamida, sendo esse esquema mais frequente em crianças, adolescentes e adultos jovens (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). Para adultos mais velhos, uma combinação comum é doxorrubicina e cisplatina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). Outras opções incluem ifosfamida com etoposídeo, ou ifosfamida com cisplatina (ou carboplatina) e epirrubicina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O tratamento de segunda linha é administrado de forma alternativa quando o de primeira linha não apresenta resultados satisfatórios. Isso ocorre porque o tumor não respondeu de maneira adequada, a doença recidivou ou os efeitos colaterais do tratamento inicial foram intoleráveis para o paciente (NCI, 2024). No caso de quimiorresistência, a terapia de segunda linha é necessária. No entanto, em muitos casos de tipos agressivos de câncer, como o osteossarcoma, pode haver pouca ou

nenhuma terapia de segunda linha estabelecida, o que complica o manejo da doença (TIPPETT *et al.*, 2023).

### 1.2.3 Fisiopatologia do Osteossarcoma

A estrutura óssea é composta por uma camada externa de osso compacto, também conhecido como osso cortical, e uma camada interna de osso esponjoso ou trabecular (SHOAIB *et al.*, 2022). A metáfise, localizada próxima às placas de crescimento ósseo, é formada, predominantemente, por osso trabecular, com uma fina camada de osso cortical (Figura 1). O OS, geralmente surge nesta região metafisária dos ossos longos, originando-se dentro da cavidade intramedular (SHOAIB *et al.*, 2022).



**Figura 1:** Estrutura anatômica de um osso longo, destacando suas principais regiões e características estruturais (Adaptado de Lecturio, 2024).

Estudos sugerem uma correlação entre o crescimento ósseo acelerado durante a puberdade e o surgimento do OS (ARORA E SHAIKH, 2023). As regiões do fêmur distal e da tíbia proximal, onde estão localizadas as placas de crescimento epifisárias responsáveis por grande parte do aumento de altura durante a

adolescência, são os locais de maior incidência da doença. A idade de pico para o desenvolvimento do OS é ligeiramente mais precoce em meninas, o que pode ser explicado pelo início antecipado do surto de crescimento puberal em relação aos meninos (OTTAVIANI E JAFFE, 2009).

O desenvolvimento do OS está intimamente ligado a mudanças profundas na estrutura do osso afetado. Esse processo é marcado por uma intensa atividade osteoclástica, que leva à reabsorção óssea excessiva. Como resposta, os osteoblastos tentam reparar o dano ao depositar matriz extracelular osteoide, que consiste em tecido ósseo imaturo e desorganizado (ROTHZERG *et al.*, 2023).

O OS pode ser classificado em diferentes subtipos com base na localização do tumor, nas características histológicas e nos perfis genéticos (ROTHZERG *et al.*, 2023). A classificação histológica do OS é dividida em dois grandes grupos: tumores centrais (intramedular) e tumores superficiais (periosteal/cortical) (ROTHZERG *et al.*, 2023; PRATER E MCKEON, 2023). No grupo dos tumores centrais, os subtipos incluem osteossarcoma convencional, telangiectásico, de baixo grau e de pequenas células. Já os tumores superficiais são classificados como parosteais, periosteais e superficiais de alto grau, cada um com suas particularidades clínicas e prognósticas (ROTHZERG *et al.*, 2023; PRATER E MCKEON, 2023).

### **1.2.3.1 Alterações cromossômicas**

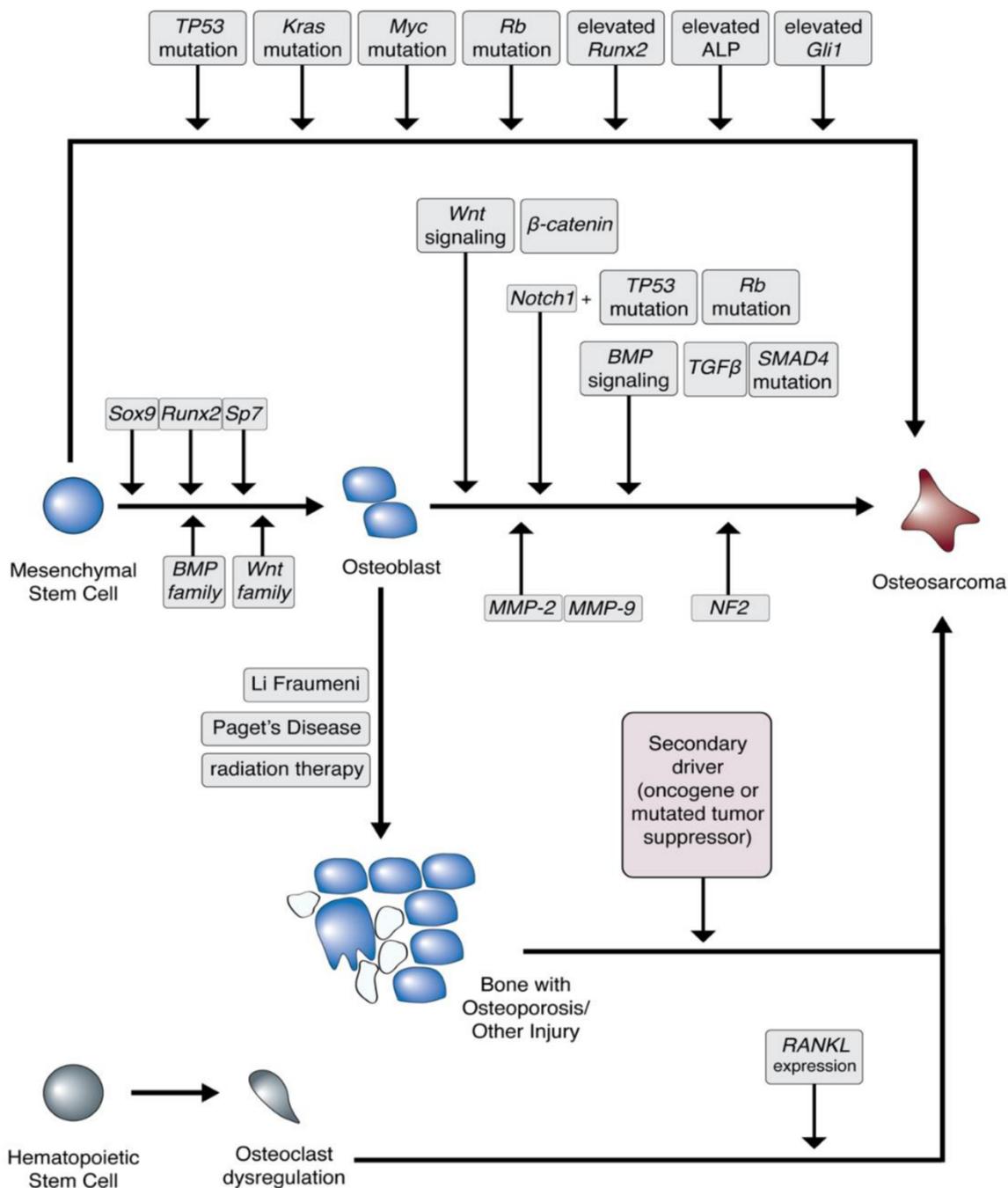
Várias alterações cromossômicas têm sido associadas ao OS. As anormalidades cromossômicas numéricas é uma delas, como a perda dos cromossomos 9, 10, 13 e 17, e ganho do cromossomo 1 (MORROW E KHANNA, 2015). Essas alterações podem impactar genes importantes para o controle do ciclo celular e a regulação do crescimento tumoral, o que contribui para a agressividade do OS. Outras alterações associadas são as amplificações dos cromossomos 6p21, 8q24 e 12q14, bem como a perda de heterozigosidade de 10q21.1 (ROTHZERG *et al.*, 2023). Essas regiões estão associadas a genes que regulam a proliferação celular, como o MYC (8q24), o que pode aumentar a progressão do tumor. Além disso, a presença de milhares de rearranjos cromossômicos agrupados é observada em 25% das amostras clínicas de OS humano em comparação com 2-3% dos cânceres em geral (LIN *et al.*, 2017). Isso destaca a complexidade genética

do OS e reforça seu caráter altamente instável do ponto de vista genético. Isso pode ser um dos motivos pelos quais o OS é tão resistente ao tratamento e apresenta um comportamento agressivo.

### **1.2.3.2 Mutações nos genes supressores de tumor**

No OS, várias alterações nos genes supressores de tumor desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e progressão da doença (Figura 2). Quando eles são alterados, a célula perde mecanismos de controle, facilitando o crescimento tumoral descontrolado. Os principais genes supressores de tumor afetados no OS são os genes TP53 e RB (DE AZEVEDO *et al.*, 2020). O gene TP53, que codifica a proteína p53, é um dos mais importantes genes supressores de tumor. Ele é responsável por induzir reparo de danos no DNA, controle do ciclo celular e promover a apoptose em células danificadas (DE AZEVEDO *et al.*, 2020). A mutação neste gene pode promover crescimento celular descontrolado, inibir a senescência e a morte celular por apoptose. Estas modificações levam a um acúmulo de mutações e sobrevivência celular, aumentando, por sua vez, o risco de transformação maligna (DE AZEVEDO *et al.*, 2020). O gene TP53 está mutado em 50% de todos os cânceres e 22% dos OS (MORROW E KHANNA, 2015). Variações estruturais no TP53 são frequentes no OS pediátrico, resultando na perda da expressão deste gene (CZARNECKA *et al.*, 2020).

Mutações no gene da proteína p53 podem resultar tanto na perda de sua função quanto em um ganho de função da proteína mutada. Um exemplo de mutação com ganho de função é a R175H, de caráter dominante negativo, amplamente observada em diversos tipos de câncer, incluindo o OS (SYNORADZKI *et al.*, 2021). A expressão do p53 mutante R175H leva à redução da apoptose celular (SYNORADZKI *et al.*, 2021). Outro mutante, R273H, está associado ao aumento da frequência de ampliações genéticas, possivelmente devido à sua interação com a topoisomerase I (CZARNECKA *et al.*, 2020). Essas ampliações e rearranjos genômicos podem contribuir para o desenvolvimento de resistência a tratamentos quimioterápicos (SYNORADZKI *et al.*, 2021). A síndrome de Li-Fraumeni é uma condição hereditária rara causada, principalmente, por mutações germinativas no gene TP53. Com isso, os portadores dessa síndrome possuem pré-disposição ao desenvolvimento de uma variedade de tumores malignos, como o OS (EL-NAGGAR *et al.*, 2019).

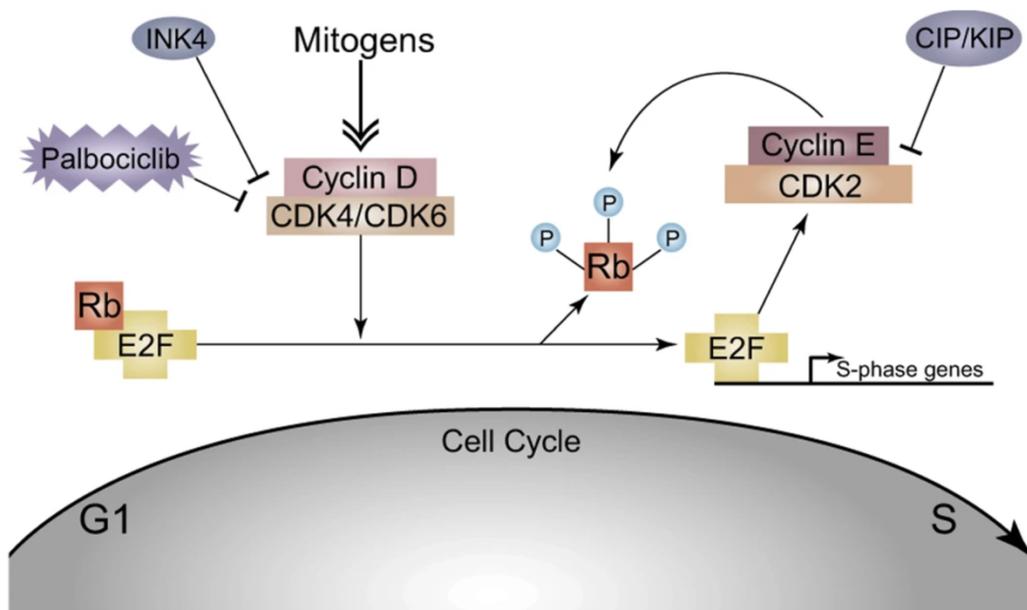


**Figura 2:** Superexpressão de fatores de transcrição específicos e desregulação de genes supressores de tumor associados ao desenvolvimento do osteossarcoma. Fonte: Rathore e Van Tine (2021).

No desenvolvimento do tecido ósseo, células-tronco mesenquimais (MSCs) são a fonte de células progenitoras osteogênicas que se diferenciam em osteoblastos (YAO *et al.*, 2023). Mutações no gene TP53 nessas células desempenham um papel crucial ao interferir na proliferação e maturação celular, comprometendo processos essenciais, como a osteogênese (YAO *et al.*, 2023). Isso ocorre devido à regulação alterada de genes importantes que codificam fatores de transcrição

essenciais para os estágios iniciais da diferenciação osteogênica, incluindo Runx2 e Osterix. Normalmente, a expressão de Runx2 e Osterix é rigorosamente controlada durante a diferenciação de células progenitoras osteogênicas em osteoblastos e osteócitos, o que garante a remodelação óssea adequada (DE AZEVEDO *et al.*, 2020). No entanto, em experimentos *in vitro*, o silenciamento do gene TP53 em fibroblastos embrionários de camundongos leva ao aumento da expressão de Runx2 e Osterix em MSCs. Isso acaba prejudicando a maturação dos osteoblastos em osteócitos totalmente diferenciados, afetando negativamente a remodelação óssea (DE AZEVEDO *et al.*, 2020).

O gene RB1 codifica a proteína retinoblastoma (pRb), que regula o ciclo celular, controlando a transição da fase G1 para a fase S (Figura 3). A perda da função de RB1 resulta na progressão descontrolada do ciclo celular (ENGELAND, 2022). Este gene está frequentemente alterado em pacientes com OS, principalmente envolvendo variações estruturais, enquanto mutações pontuais são menos comuns (CZARNECKA *et al.*, 2020). Mutações no gene RB ocorrem em cerca de 70% dos casos esporádicos de OS (CZARNECKA *et al.*, 2020). O gene RB é fundamental para o controle do ciclo celular, pois a proteína RB regula o ciclo celular ligando-se ao fator de transcrição E2F. E2F é mantido inativo por RB até que o complexo CDK4 / ciclina D fosforila RB. Por esta razão, mutações neste gene permitem o ciclo celular contínuo (MORROW E KHANNA, 2015).



**Figura 3:** Regulação do ciclo celular mediada pela proteína RB (retinoblastoma). Fonte: Ballatori e Hinds (2016).

Outro gene supressor de tumor alterado no OS é o PTEN, que atua regulando negativamente a via de sinalização PI3K/AKT, uma das principais responsáveis pelo crescimento e sobrevivência celular. A perda da proteína PTEN é observada em quase 65% das amostras de OS, o que aumenta o risco de metástase e piores prognósticos (ZHENG *et al.*, 2020).

### **1.2.3.3 Alterações em fatores de transcrição**

Um dos mecanismos centrais envolvidos na patogênese do OS é a desregulação da transcrição do DNA, um processo crucial que converte o DNA de fita dupla em RNA mensageiro (mRNA) de fita simples (RATHORE E VAN TINE, 2021; NATURE, 2014). Fatores de transcrição se ligam a sequências específicas no DNA, recrutando a maquinaria transcricional, coativadores e modificadores de cromatina para formar um complexo transcricional que inicia a transcrição genética (JHA *et al.*, 2023). A produção excessiva de fatores de transcrição ou a geração de versões hiperativas destes pode ocorrer devido a rearranjos gênicos.

Um exemplo proeminente é o complexo de proteínas ativadoras 1 (AP-1), um regulador chave da transcrição, que controla a proliferação celular, a diferenciação e o metabolismo ósseo (BROADHEAD *et al.*, 2011). No câncer, proteínas alteradas da família AP-1 promovem a sobrevivência e progressão tumoral de várias maneiras, incluindo a sustentação da sinalização de proliferação, resistência à apoptose, indução de angiogênese e invasão tumoral (WU *et al.*, 2021). As proteínas AP-1 estão significativamente aumentadas em OS de alto grau quando comparadas a lesões osteoblásticas benignas e OS de baixo grau. Essa elevação está correlacionada com uma maior propensão à metástase (WU *et al.*, 2021).

Outro fator de transcrição fundamental na patogênese do OS é o C- MYC. A família de genes MYC regula processos celulares essenciais para o crescimento e proliferação celular (MILLER *et al.*, 2012). A amplificação de C-MYC desempenha um papel crucial no desenvolvimento do OS, promovendo a invasão celular por meio da ativação da via MEK–ERK (CZARNECKA *et al.*, 2020). Amostras metastáticas apresentam uma regulação positiva significativamente maior deste gene em comparação com amostras não metastáticas, sugerindo sua relevância na metástase (CZARNECKA *et al.*, 2020).

Além disso, alterações em C-MYC estão associadas à resistência a quimioterápicos (JHA *et al.*, 2023). A amplificação deste gene foi observada em diferentes linhagens celulares de OS, como a U2-OS, que apresenta maior resistência à doxorrubicina, e a SAOS-2, que demonstra resistência ao metotrexato (BROADHEAD *et al.*, 2011). Dada sua importância tanto na progressão tumoral quanto na resistência aos tratamentos convencionais, o MYC tem sido investigado como um alvo terapêutico promissor no tratamento do OS (MILLER *et al.*, 2012).

#### **1.2.3.4 Alterações nos fatores de crescimento**

Os fatores de crescimento desempenham um papel central na fisiopatologia do OS, exercendo efeitos autócrinos e parácrinos que contribuem para a proliferação tumoral. A expressão desregulada de fatores como o fator de crescimento transformador (TGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) resulta em proliferação celular acelerada. Além disso, os receptores desses fatores frequentemente estão superexpressos e são ativados de forma contínua, potencializando a progressão tumoral (BROADHEAD *et al.*, 2011).

O fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), codificado pelo gene TGFB, regula processos celulares essenciais como diferenciação, proliferação, apoptose e produção de matriz extracelular. No tecido ósseo, o TGF- $\beta$ , juntamente com a proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), é crucial para a formação de osteoblastos (RATHORE E VAN TINE, 2021). No contexto do câncer, o papel do TGF- $\beta$  muda conforme o estágio da doença. Em tumores precoces, pode atuar como supressor tumoral, aumentando a expressão de inibidores de quinase dependentes de ciclina, como p21, e/ou reduzindo a expressão dos genes reguladores, como C-MYC. Já em estágios avançados, promove a progressão tumoral e a metástase. OS de alto grau expressam significativamente mais TGF- $\beta$ 1 do que os de baixo grau (CZARNECKA *et al.*, 2020). O TGF- $\beta$ , assim como outros fatores liberados pelas células tumorais como IL-6 e IL-11, modula os osteoclastos via RANK, contribuindo para a progressão do OS ao diminuir a reabsorção óssea (RATHORE E VAN TINE, 2021).

Os fatores IGF-I e IGF-II também são frequentemente superexpressos no OS, ativando as vias de transdução de sinal PI3K/AKT e RAS/MAPK. Esse processo

aumenta a proliferação celular e inibe a apoptose, promovendo a sobrevivência das células tumorais (TZANAKAKIS *et al.*, 2021).

Já o CTGF, que atua nas vias de sinalização das integrinas, desempenha múltiplas funções, como adesão, migração, proliferação e angiogênese. No OS, o CTGF aumenta a migração e a capacidade metastática das células tumorais, além de regular positivamente a expressão de metaloproteinasas (MMPs), que são responsáveis pela degradação da matriz extracelular. Ele também está associado à resistência à apoptose induzida por quimioterápicos, como paclitaxel e cisplatina (LI-HONG *et al.*, 2017).

Outro componente importante é o hormônio da paratireóide (PTH), seu peptídeo relacionado (PTHrP) e o receptor PTHR1, que têm sido associados à progressão e metástase do OS. Estudos sugerem que o PTHrP está envolvido na quimiorresistência ao bloquear a sinalização da p53 e vias mitocondriais de apoptose (BROADHEAD *et al.*, 2011).

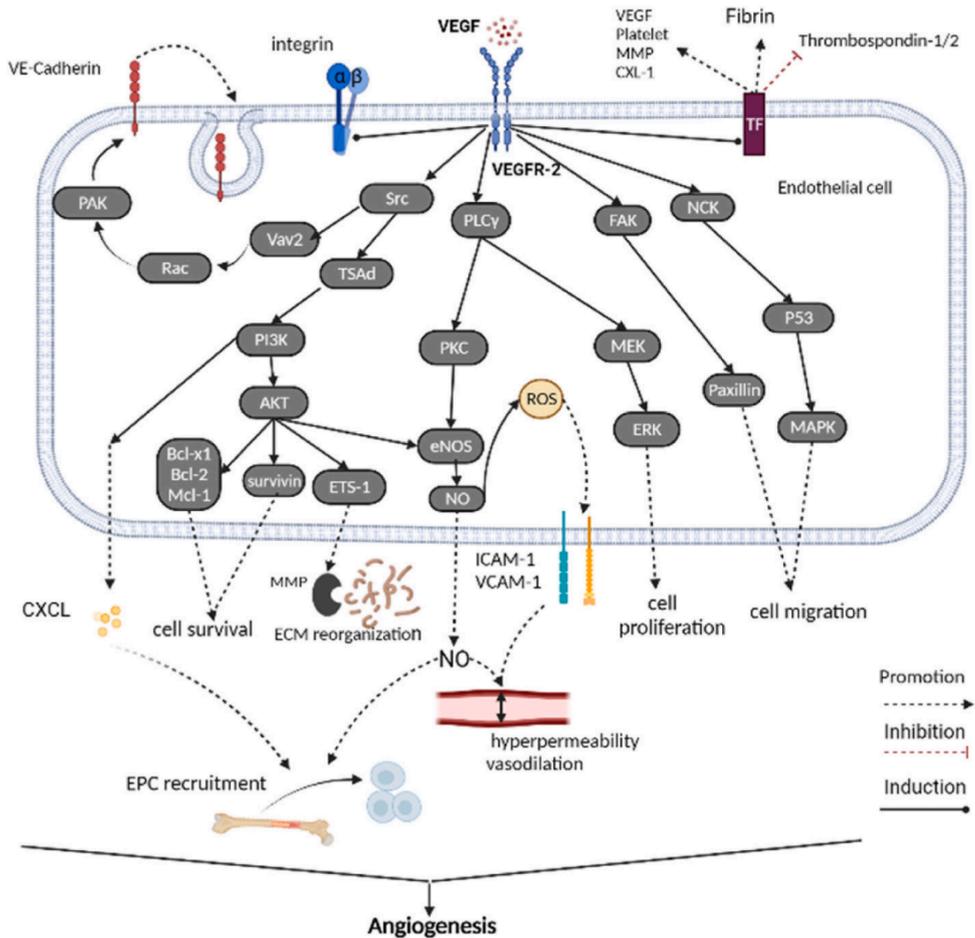
Assim, esses fatores de crescimento e seus receptores desempenham papéis fundamentais tanto na progressão tumoral quanto na resistência aos tratamentos, sendo alvos potenciais para terapias mais eficazes contra o OS.

### **1.2.3.5 Angiogênese**

A angiogênese tumoral é um processo crucial para o desenvolvimento e progressão do OS. Ela é controlada por um equilíbrio dinâmico entre fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos. No contexto tumoral, esse equilíbrio é rompido, favorecendo a neovascularização, que é estimulada por condições como hipóxia, acidose, ativação oncogênica e a perda da função de genes supressores de tumor (XIE *et al.*, 2017). Essas condições do microambiente tumoral levam à desregulação de várias vias moleculares, incluindo a deubiquitinação da proteína von Hippel-Lindau (VHL), um evento central no controle da resposta à hipóxia (KAELIN, 2018). Quando essa proteína é deubiquitinada, há um acúmulo do fator induzível por hipóxia 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ ), que se liga ao promotor do gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo sua expressão aumentada (KAELIN, 2018).

O VEGF desempenha um papel central na angiogênese, estimulando a proliferação e migração das células endoteliais, além de promover a maturação dos

vasos sanguíneos recém-formados, como observado na Figura 4 (GHALEHBANDI *et al.*, 2023). As células endoteliais ativadas liberam óxido nítrico (NO), que contribui para a vasodilatação e aumenta a permeabilidade vascular, facilitando o crescimento tumoral (XIE *et al.*, 2017). Além disso, o VEGF induz a reorganização do citoesqueleto de actina nas células endoteliais, um processo necessário para sua migração. Isso resulta na formação de uma rede vascular imaturo, irregular e altamente permeável (XIE *et al.*, 2017). Essa rede de vasos é, frequentemente, disfuncional e não consegue atender às demandas metabólicas do tumor, levando a novos episódios de hipóxia e promovendo um ciclo de retroalimentação que aumenta ainda mais a angiogênese (GHALEHBANDI *et al.*, 2023). A expressão de VEGF-A no OS tem sido associada a um maior risco de metástase pulmonar e menor sobrevida (ASSI *et al.*, 2021). Além disso, o VEGF regula positivamente a atividade das MMPs e da plasmina, proteases que degradam a matriz extracelular (MEC), liberando o VEGF armazenado na MEC (XIE *et al.*, 2017). O VEGF também induz a expressão de fatores antiapoptóticos, como Bcl-2, garantindo a sobrevivência e proliferação endotelial contínua (GHALEHBANDI *et al.*, 2023). Juntamente com o VEGF, outros fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), também são secretados pelas células tumorais. A liberação desses fatores intensifica o processo angiogênico no OS (XIE *et al.*, 2017).



**Figura 4:** Angiogênese mediada por vias de sinalização envolvendo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Fonte: Ghalehbandi *et al.*, 2023.

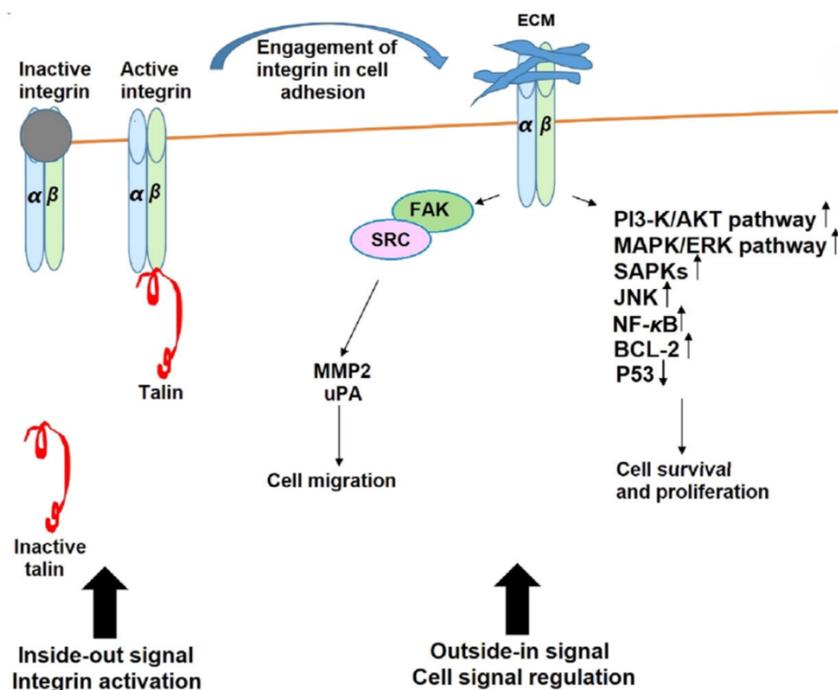
Em contraste, os fatores antiangiogênicos, como TGF- $\beta$ , troponina I e o fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF), são regulados negativamente no OS (XIE *et al.*, 2017). Em condições fisiológicas, essas moléculas desempenham papéis importantes na embriogênese e na cicatrização de feridas. No entanto, no contexto tumoral, atuam como inibidores da angiogênese, suprimindo o crescimento do tumor. A supressão dessas moléculas no OS reduz o controle sobre a angiogênese descontrolada, permitindo a progressão tumoral (XIE *et al.*, 2017).

### 1.2.3.6 Migração e invasão celular

O OS é um dos tumores ósseos mais agressivos e altamente metastático, com as metástases pulmonares representando a principal causa de mortalidade associada à doença (SHENG *et al.*, 2021). O processo metastático envolve uma série de etapas coordenadas e altamente reguladas, começando com a dissociação das células tumorais do sítio primário. Essas células desprendem-se do tumor

inicial, aderem à MEC, migram localmente, invadem os tecidos circundantes e, eventualmente, alcançam outros órgãos, como os pulmões (SHENG *et al.*, 2021). Essa capacidade de metástase é fortemente dependente de interações complexas entre as células tumorais e a matriz extracelular. Além disso, a metástase também é dependente das interações entre diferentes células dentro do microambiente tumoral (BROADHEAD *et al.*, 2011).

A MEC desempenha um papel essencial no suporte estrutural do tumor, além de facilitar a angiogênese e a disseminação metastática. A MEC é composta por diversas proteínas, incluindo fibronectina, colágenos, proteoglicanos e lamininas, que formam uma rede tridimensional de suporte (ELGUNDI *et al.*, 2020). As células do OS aderem aos componentes da matriz por meio de receptores de superfície celular, que não servem apenas como pontos físicos de ligação, mas também como mediadores de importantes sinais intracelulares (ELGUNDI *et al.*, 2020). Esses receptores, especialmente as integrinas, estabelecem uma conexão funcional entre as proteínas da matriz e o citoesqueleto das células tumorais. Dessa forma, desempenham um papel fundamental na migração celular e sobrevivência tumoral (ELGUNDI *et al.*, 2020) como observado na Figura 5.



**Figura 5:** Composição e transdução de sinal da família das integrinas na progressão do osteossarcoma (adaptado de Li *et al.*, 2021).

As integrinas são as principais proteínas receptoras envolvidas nesse processo e são cruciais para a transdução de sinais que promovem a migração e invasão celular (BROADHEAD *et al.*, 2011). Uma vez ligadas à MEC, as integrinas ativam uma série de vias de sinalização intracelular, envolvendo proteínas quinases que são essenciais para a motilidade e proliferação das células tumorais (ELGUNDI *et al.*, 2020). Entre essas proteínas quinases, destacam-se a quinase de adesão focal (FAK), a proteína quinase C (PKC), a PI3 quinase, a Src e as GTPases da família Rho, como a RhoA. Todas elas estão envolvidas na regulação da morfologia celular, dinâmica do citoesqueleto e migração celular (CUI *et al.*, 2020).

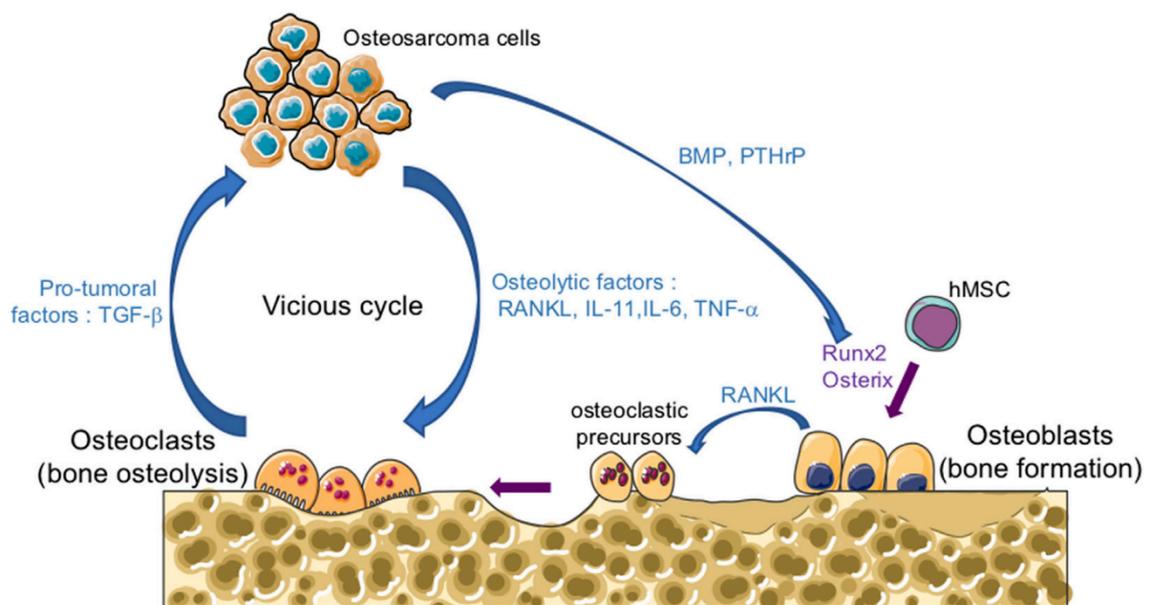
Além disso, a invasão de outros tecidos pelo OS envolve a degradação da MEC através da ativação das MMPs (CUI *et al.*, 2020). As MMPs desempenham um papel crucial na quebra do colágeno extracelular, facilitando a invasão tanto de células tumorais quanto de células endoteliais (BROADHEAD *et al.*, 2011). O remodelamento das paredes vasculares mediada pelas MMPs resulta em uma rede vascular fina e permeável, permitindo a passagem de células tumorais para a corrente sanguínea e facilitando, assim, a disseminação metastática (CUI *et al.*, 2020). Níveis elevados de MMP-2, MMP-9 e MMP-13 estão presentes no OS (CUI *et al.*, 2020).

O microambiente tumoral no OS apresenta características distintas em comparação ao tecido conjuntivo normal. O estroma tumoral é notavelmente mais rígido, o que resulta em um aumento na agregação das integrinas e na ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular (BROADHEAD *et al.*, 2011). Essa rigidez aumenta a tensão mecânica dentro do tumor, reduzindo os contatos célula a célula e, ao mesmo tempo, estimulando o crescimento e a progressão do tumor (CUI *et al.*, 2020). A sinalização mediada pelas integrinas, além de promover a migração celular, também favorece a sobrevivência das células tumorais, contribuindo para a resistência ao tratamento e para a propagação metastática (CUI *et al.*, 2020).

Portanto, a metástase no OS não é apenas um processo passivo de disseminação celular, mas um evento altamente regulado, dependente de interações bioquímicas e biomecânicas entre as células tumorais e o ambiente extracelular.

### 1.2.3.7 Papel das células ósseas na invasão tumoral

A invasão tumoral no OS é amplamente regulada por interações complexas entre as células tumorais, a matriz óssea e as células ósseas, como osteoblastos e osteoclastos (DAI *et al.*, 2022). Essas interações são essenciais para o avanço do tumor e sua capacidade de invadir o tecido ósseo adjacente. Inicialmente, o processo de invasão é desencadeado pela degradação da matriz óssea, o que libera fatores de crescimento como o TGF- $\beta$ , que atua diretamente nas células do OS (DAI *et al.*, 2022). O TGF- $\beta$ , por sua vez, estimula a liberação de PTHrP, IL-6 e IL-11, promovendo um ciclo de ativação osteoclástica (SHENG *et al.*, 2021) (Figura 6). Esse conjunto de citocinas contribui para a degradação óssea contínua, facilitando a invasão tumoral (SHENG *et al.*, 2021).



**Figura 6:** Ciclo de ativação osteoclástica entre células tumorais e células ósseas no microambiente do osteossarcoma, destacando as interações que favorecem o desenvolvimento e progressão tumoral. Fonte: Verrecchia e Rédini (2018).

Os osteoblastos desempenham um papel crítico como mediadores no processo de reabsorção óssea. Em resposta ao microambiente tumoral, caracterizado por acidose e hipóxia, as células de OS liberam endotelina-1 (ET-1), VEGF e PDGF, que estimulam diretamente os osteoblastos (DAI *et al.*, 2022). Além disso, as citocinas PTHrP e IL-11 também promovem a atividade osteoblástica, aumentando a expressão do receptor ativador do ligante do fator nuclear  $\kappa$ B (RANKL) nos osteoblastos (GAO *et al.*, 2023). O RANKL é um mediador fundamental da

diferenciação e ativação dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea (GAO *et al.*, 2023).

Uma vez ativados, os osteoclastos liberam proteases que degradam os componentes não mineralizados da matriz óssea, facilitando ainda mais a invasão tumoral (GAO *et al.*, 2023). Esse ciclo de ativação osteoblástica e osteoclástica, impulsionado por fatores secretados pelas células do OS e pelas citocinas do microambiente tumoral, contribui para a progressão da doença, ampliando a destruição óssea e a capacidade invasiva do tumor (SHENG *et al.*, 2021).

### **1.3 PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DO CÂNCER**

Com o advento da quimioterapia adjuvante e neoadjuvante, a taxa de sobrevivência de pacientes com OS melhorou gradualmente (ZHANG *et al.*, 2018). Contudo, 20 a 40% dos pacientes ainda apresentam recorrência local ou metástases, destacando as limitações dos tratamentos atuais (ZHANG *et al.*, 2018). Além disso, os medicamentos de primeira linha disponíveis para o OS geram uma série de efeitos colaterais imediatos e a longo prazo. Entre os efeitos adversos imediatos estão complicações gastrointestinais, alopecia, fadiga severa, supressão da medula óssea, neurotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, além de problemas cardíacos e auditivos (HECKER-NOLTING *et al.*, 2021). Já os efeitos a longo prazo são, em muitos casos, irreversíveis e podem incluir cardiomiopatias, infertilidade, comprometimento renal permanente, perda auditiva irreversível, neuropatias persistentes, e deterioração cognitiva. Também há o risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias secundárias devido ao efeito mutagênico das drogas quimioterápicas (HECKER-NOLTING *et al.*, 2021).

Esses desafios clínicos evidenciam a necessidade urgente de novas terapias que sejam mais eficazes e menos agressivas, proporcionando um melhor prognóstico e melhoria da qualidade de vida para os pacientes com OS (ZHANG *et al.*, 2018). Nesse contexto, compostos bioativos derivados de produtos naturais emergem como alternativas promissoras, especialmente por sua característica de baixa toxicidade. Neste sentido, oferecem a oportunidade de mitigar os efeitos colaterais graves associados às terapias convencionais (ALI ABDALLA *et al.*, 2022).

A exploração de produtos naturais no desenvolvimento de agentes anticancerígenos não é novidade na oncologia. Algumas das drogas quimioterápicas mais bem-sucedidas historicamente foram derivadas de fontes naturais (ALI ABDALLA *et al.*, 2022). Exemplos marcantes incluem o paclitaxel, isolado da casca do teixo (*Taxus* spp.), e os alcaloides da vinca, extraídos da planta *Catharanthus roseus*. Ambos são comprovadamente eficazes no tratamento de uma variedade de tipos de câncer (VÉLÈZ *et al.*, 2022; ABOUZEID *et al.*, 2019). O sucesso desses compostos ressalta a importância da investigação contínua de moléculas bioativas oriundas de plantas, microrganismos marinhos e outros organismos naturais (NAEEM *et al.*, 2022).

Essas moléculas exercem suas atividades anticancerígenas por meio de diversos mecanismos. Por exemplo, há a inibição da proliferação celular, indução de apoptose, modulação de vias de sinalização celular e inibição da angiogênese, processos essenciais para a progressão tumoral (NAEEM *et al.*, 2022). Além disso, os avanços recentes em biotecnologia e química medicinal têm permitido o desenvolvimento mais eficiente dessas moléculas, desde o isolamento até a modificação estrutural, visando à otimização de suas propriedades terapêuticas (ATANASOV *et al.*, 2021).

Esses avanços tecnológicos expandem as possibilidades para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, tanto para uso isolado quanto em combinação com terapias convencionais (NAEEM *et al.*, 2022). Isso oferece abordagens inovadoras para superar a resistência aos tratamentos atuais, melhorando, significativamente, a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes com OS e outros tipos de câncer.

## 1.4 ÁLCOOL PERÍLICO

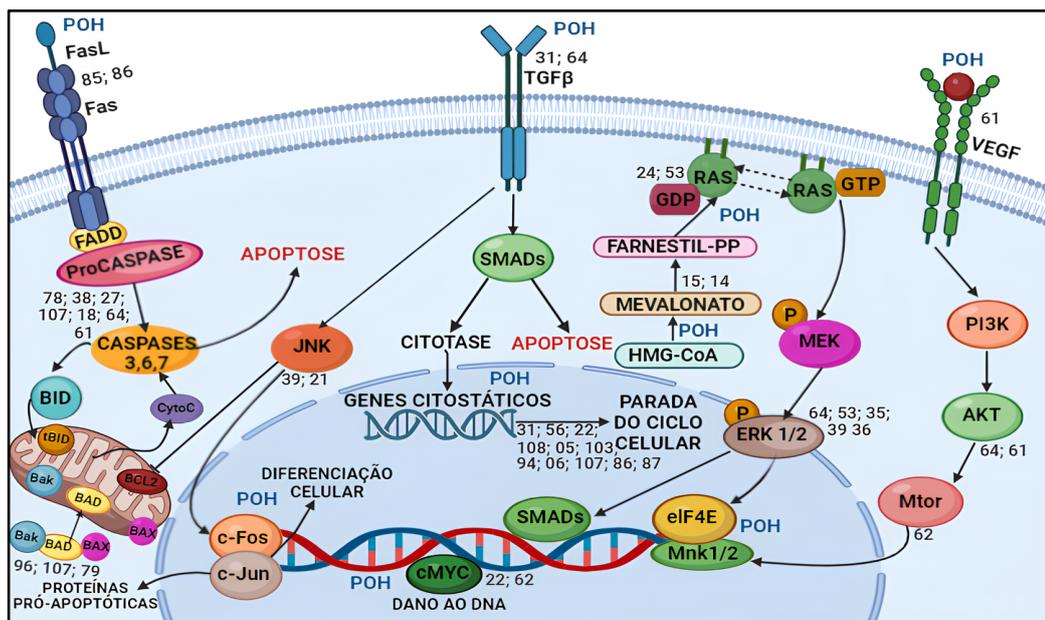
O álcool perílico (POH) é um monoterprenoide natural derivado do Limoneno que tem despertado grande interesse na pesquisa farmacológica devido ao seu potencial terapêutico, particularmente no tratamento do câncer (CHEN *et al.*, 2021). Quimicamente, o POH é caracterizado por um anel cicloexeno com uma ramificação isopropenil e um grupo hidroxila (-OH), conferindo-lhe a fórmula molecular  $C_{10}H_{16}O$  e um peso molecular de 152,23 g/mol (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2024). Essa estrutura confere ao POH

propriedades lipofílicas e hidrofílicas, permitindo sua interação eficiente com membranas celulares e sua penetração em diversos tecidos biológicos (DA FONSECA *et al.*, 2016). O POH é um composto volátil, facilmente extraído por destilação a partir de óleos essenciais. A sua boa solubilidade em solventes orgânicos como etanol, mas baixa solubilidade em água refletem na sua farmacocinética e biodisponibilidade (CHEN *et al.*, 2021). No corpo humano, o POH é rapidamente metabolizado, sendo o ácido perílico (AP) o metabólito mais abundante no plasma sanguíneo (YERUVA *et al.*, 2007).

Este monoterprenoide é encontrado, predominantemente, em plantas aromáticas, sendo um metabólito secundário presente nos óleos essenciais de espécies como *Mentha piperita* (hortelã-pimenta), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Lavandula angustifolia* (lavanda) e *Cinnamomum camphora* (cânfora) (SU *et al.*, 2019). Sua origem natural está associada às funções ecológicas das plantas que o produzem, incluindo defesa contra herbívoros e patógenos, bem como atração de polinizadores (ZHAO *et al.*, 2024).

As propriedades bioativas do POH têm sido amplamente investigadas em diversos modelos experimentais, com destaque para seus efeitos antitumorais, anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos (MUKHTAR *et al.*, 2018). Os efeitos biológicos do POH no câncer são amplos e diversificados, como demonstrado na Figura 7 (BATISTA *et al.*, 2024). Estudos demonstram que o POH reduz a proliferação celular por meio da indução de parada no ciclo celular, modulando componentes cruciais desse processo. Ele diminui os níveis de ciclinas, inibe a atividade de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), e regula positivamente o inibidor de ciclina p21, elementos chave no controle do ciclo celular (BATISTA *et al.*, 2024). O POH também atenua a fosforilação da AKT, uma via de sinalização essencial para processos como crescimento celular, sobrevivência, metabolismo e proliferação (BATISTA *et al.*, 2024). Além disso, o POH intensifica a clivagem da PARP-1 (poli [adenosina difosfato-ribose] polimerase), uma enzima vital no reparo de danos ao DNA que pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de tumores. Ao estimular a atividade das caspases e a sensibilidade ao receptor FAS e seu ligante FASL, o POH não apenas limita o crescimento celular, mas também promove a apoptose (BATISTA *et al.*, 2024).

Outro alvo relevante do POH é a bomba de sódio-potássio (Na/K-ATPase), que desempenha um papel crítico no transporte ativo de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, além de atuar em vias de sinalização que influenciam diferenciação, proliferação e apoptose celular (BATISTA *et al.*, 2024). No câncer, a Na/K-ATPase pode estar envolvida na promoção da sobrevivência, crescimento e metástase das células tumorais. O POH também interfere na via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK, ao inibir a isoprenilação e a expressão de proteínas RAS e seus correlatos. Além disso, reduz a fosforilação de MEK e ERK, elementos-chave na proliferação celular (BATISTA *et al.*, 2024). O POH também exerce efeitos antitumorais ao reduzir os níveis de VEGF e aumentar os níveis do homólogo pro-apoptótico BAK e do fator de crescimento TGF-β, como demonstrado por MUKHTAR *et al.* (2018). Esses achados reforçam o impacto multifacetado do POH nas vias de sinalização celular e no comportamento de células tumorais.



**Figura 7:** Ilustração dos múltiplos mecanismos de ação do álcool perílico (POH) em células tumorais, incluindo a indução de apoptose por meio da ativação de caspases (Caspases 3, 6 e 7) e proteínas pró-apoptóticas (BAX, BID, entre outras), a regulação da via do TGF-β por SMADs e a parada do ciclo celular por meio da inibição da via Ras/MEK/ERK. O POH também está envolvido na redução da expressão de genes relacionados ao crescimento celular, como c-Myc e c-Fos, além de interferir no metabolismo lipídico pela modulação da síntese de mevalonato. Esses mecanismos contribuem para a citotoxicidade em células tumorais, destacando o POH como uma molécula com múltiplos alvos terapêuticos potenciais.

O POH já foi testado em uma ampla gama de linhagens celulares, incluindo câncer pancreático (MATOS *et al.*, 2008), carcinoma hepatocelular e pulmonar

(OTURANEL *et al.*, 2017), câncer de mama (CHEN *et al.*, 2014), e glioblastoma (DE SALDANHA *et al.*, 2011). Em particular, para o glioblastoma, os estudos já avançaram para ensaios clínicos (CHEN *et al.*, 2021). Embora a literatura evidencie um crescente interesse e investigação deste monoterpene em diversas linhagens celulares e modelos animais, há uma lacuna no conhecimento referente à sua ação sobre células tumorais de origem óssea, como o OS.

Nesse contexto, o presente trabalho propõe a hipótese de que o POH e seu derivado AP possam exercer efeitos anticâncer em linhagens tumorais de OS, com potencial para inibir a progressão do tumor ou reduzir a capacidade metastática do OS.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a ação anticâncer do álcool perílico e de seu derivado, o ácido perílico, em células de linhagem de osteossarcoma humano.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) e o índice de seletividade do álcool perílico (POH) e do ácido perílico (AP) em cultivos bidimensionais de células tumorais (MG-63 e U2-OS) e não tumorais (osteoblastos primários);
- Avaliar o impacto do POH e AP na migração celular;
- Analisar os efeitos do POH e AP na proliferação celular;
- Verificar a influência do POH e AP no ciclo celular;
- Investigar as diferentes vias de morte celular induzidas pelo POH e AP;
- Avaliar o efeito de estresse oxidativo induzido pelo POH e AP;
- Investigar os efeitos do POH e AP sobre a produção e liberação de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios relevantes para o tratamento de câncer.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados neste estudo foram Álcool perílico, 96%, Sigma-Aldrich (EUA); Ácido perílico, 95%, Sigma-Aldrich (EUA); Cisplatina, 1 mg/mL, Accord Farmacêutica Ltda (Brasil); Mitomicina-C de *Streptomyces caespitosus*, Sigma-Aldrich (EUA); Estaurosporina, ≥98%, Sigma-Aldrich (EUA) ; Peróxido de hidrogênio, 30%, P.A., Proquímios (Brasil); Etanol, 98%, P.A., Sigma-Aldrich (EUA); DMSO, >99.5%, Thermo Scientific (EUA); Colagenase, tipo 1, isolada de *Clostridium histolyticum*, Gibco™ (EUA); Tripsina, 1:250, derivada de pâncreas porcino, Gibco™ (EUA); TrypLE, Gibco™ (EUA), Soro Fetal Bovino (SFB), Gibco™ (EUA); DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sem fenol, Sigma-Aldrich (EUA); DMEM baixa glicose, Cultilab (Brasil).

### 3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ÁLCOOL PERÍLICO

O POH foi diluído em etanol imediatamente antes de cada experimento para posterior mistura com os respectivos meios de cultura das células. Foram avaliadas diferentes concentrações para determinação da concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>), ou seja, a concentração que reduz 50% da viabilidade celular. Para determinar o valor de IC<sub>50</sub> foi realizado um ensaio preliminar com concentrações amplas do composto, chamado de *range finder*. Esta etapa identifica o intervalo em que o composto gera efeitos mínimos (nenhuma morte celular) e máximos (100% de morte celular), delimitando as concentrações para o ensaio principal. O *range finder* foi realizado com as concentrações de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM e 10 mM de POH. Após achar a faixa de interesse, foi realizado o teste principal com uma curva de 8 pontos entre as concentrações de 0,5 mM e 5mM de POH.

### 3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE ÁCIDO PERÍLICO

O AP foi diluído em etanol, imediatamente antes de cada experimento para posterior mistura com os respectivos meios de cultura das células. Foram avaliadas diferentes concentrações para determinação do IC<sub>50</sub>. O teste de *range finder* foi realizado com as concentrações de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1

mM e 10 mM de AP. Após achar a faixa de interesse, foi realizado o teste principal com uma curva de 8 pontos entre as concentrações de 0,5 mM e 15 mM de AP.

### **3.4 CULTIVO CELULAR**

As linhagens MG-63 e U2-OS foram escolhidas para este trabalho devido às suas características distintas, embora ambas sejam derivadas de OS, buscando refletir a heterogeneidade da doença encontrada em pacientes. A linhagem MG-63 foi originada a partir do tecido ósseo de um paciente do sexo masculino de 14 anos com OS metastáticos (CELLOSAURUS, 2024). Por outro lado, a linhagem U2-OS foi derivada de um OS moderadamente diferenciado *in situ* na tíbia de uma paciente do sexo feminino de 15 anos (CELLOSAURUS, 2024). Em termos morfológicos, as células MG-63 apresentam uma morfologia fibroblástica, enquanto as células U2-OS possuem uma morfologia epitelial. O cariótipo das células MG-63 é hipotriploide, contendo 66 cromossomos (ECACC, 2024). Já as células U2-OS possuem um cariótipo poliploide, com um número cromossômico variando entre 69 e 80 cromossomos (RAFTOPOULOU *et al.*, 2020). Além disso, as células MG-63 não possuem um gene p53 funcional, enquanto as células U2-OS apresentam uma forma funcional do gene p53, conferindo-lhes diferentes respostas a estímulos celulares e tratamentos (HO *et al.*, 2021).

Os osteoblastos humanos primários (OH) foram obtidos da coleção da UPC-HUAP (CAAE: 57080116.0.0000.5243), e as células de OS, MG-63 e U2-OS, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB e mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células OH foram utilizadas entre a segunda e sexta passagem, a MG-63 entre a passagem 120 e 126, e a U2-OS entre as passagens 50 e 58. Os testes foram realizados com as células com a viabilidade acima de 97%.

### **3.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE**

Os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do NCI (National Cancer Institute, EUA). As células foram semeadas na densidade de  $2 \times 10^4$  células / poço, em quadruplicata, em placa de 96 poços. Após o período de incubação de 24 horas, as células foram expostas às soluções contendo POH e AP em diferentes concentrações. O controle positivo utilizado foi o SDS (200 mg/mL)

enquanto o controle negativo foi poliestireno (200 mg/mL). Em todos os ensaios foi realizado o controle do veículo com 0,5% de etanol em meio de cultura. Após a adição das soluções, a placa foi incubada novamente por 24 horas. Após esse período, foi realizado o teste de MTT para verificação da viabilidade celular e posterior cálculo do IC<sub>50</sub>. O IC<sub>50</sub> foi calculado a partir da equação da reta dos gráficos gerados em pelo menos 3 testes independentes. Além disso, foi calculado o índice de seletividade (IS) para as células tumorais, que indica a capacidade do composto de induzir a morte, preferencialmente, de células tumorais em relação às células normais. O IS foi calculado como a razão entre o IC<sub>50</sub> das células normais e o IC<sub>50</sub> das células tumorais.

Após o período de exposição, os poços foram lavados duas vezes com 200µl de PBS a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 100µl da solução estoque de MTT (Sigma-Aldrich, EUA) a uma concentração de 0,5mg/mL (diluída em meio de cultura sem soro). Após isso, a placa foi incubada por duas horas na incubadora a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> sob abrigo de luz. Após o período de incubação, a solução de MTT foi retirada e 100µl de DMSO foi adicionado aos poços. Posteriormente, foi realizada a leitura no espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific) a 540nm.

### **3.6 MIGRAÇÃO CELULAR (ENSAIO DE RANHURA)**

Para analisar a migração celular com as células de OS, foi realizado o ensaio de ranhura (*scratch assay*). Para isso,  $7 \times 10^4$  células por poço foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas por 48 horas para alcançar a confluência adequada. Após esse período, as células foram incubadas por 1 hora com Mitomicina C na concentração de 2 µg/mL (com exceção do grupo controle sem mitomicina C). A exposição à Mitomicina C foi realizada para impedir que as células entrassem em mitose, reduzindo a influência da proliferação na análise da migração celular. Posteriormente, as células foram lavadas 2x com PBS e incubadas por 3 horas com DMEM suplementado com 0,3% de SFB. Após esse período de incubação, foi feita a ranhura linear na monocamada de células utilizando uma ponteira de 200 µL. Os poços foram lavados novamente com PBS, seguido de adição de DMEM suplementado com 0,3% de SFB. Foram adquiridas fotos no microscópio das culturas no tempo de 0h, seguido de exposição das células ao IC<sub>50</sub>

do POH, PA e Cisplatina. A migração das células para fechar a ranhura foi monitorada em intervalos de 6 horas durante 24 horas utilizando um microscópio de campo claro (Axio Observer A1, Zeiss). As imagens das células foram capturadas em cada intervalo de tempo, e a área da ranhura restante foi quantificada usando o software de análise de imagem ImageJ. A taxa de migração celular foi então calculada como a porcentagem de fechamento da ranhura ao longo do tempo.

### **3.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR**

As células foram tripsinizadas, contadas e transferidas para um microtubo cônico na densidade necessária para plaquear todos os grupos experimentais com  $5 \times 10^4$  células/poço. As células foram, então, incubadas por 20 minutos a 37 °C com o marcador CFSE (Invitrogen, EUA) na concentração de 2,5  $\mu$ M. Posteriormente, as células foram lavadas 1x com DMEM contendo 10% de SFB. Em seguida, as células foram ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de SFB, plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas. Após a incubação, as células foram expostas por 24 horas aos grupos experimentais. A Mitomicina C na concentração de 2  $\mu$ g/mL foi utilizada como controle positivo e o DMEM suplementado com 10% SFB como controle negativo. Um grupo de células não marcadas (branco) foi utilizado para descontar a autofluorescência das células. As células foram incubadas por até 5 dias, sendo que, a cada 24 horas, a réplica de cada grupo experimental foi analisada no citômetro de fluxo. Para isso, as células foram tripsinizadas e transferidas para microtubos cônicos. As células foram centrifugadas a 300g por 8 minutos, e ressuspensas em PBS. As amostras foram analisadas imediatamente no citômetro de fluxo (Cytoflex, Beckman Coulter, EUA), usando a excitação de 488 nm (azul) com filtros *BandPass* de 525/40. As análises dos resultados foram feitas através do software FlowJo™ v10.8 (BD Life Sciences).

### **3.8 CICLO CELULAR**

Foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células/poço, em triplicata, em placas de 24 poços. As placas foram incubadas por 24 horas para ocorrer a adesão das células. Após esse período, as células foram expostas por 24 horas aos grupos experimentais. Posteriormente, as células foram destacadas das placas com TrypLE (Gibco™), transferidas para microtubos cônicos e centrifugadas a 300 g por 5 min a 10 °C. As

células foram lavadas 1 vez com PBS gelado, e depois ressuspensas em etanol 70% gelado para fixação. Após 24 horas em geladeira, o etanol foi retirado por centrifugação, e as amostras foram marcadas com DAPI (1 µg/ mL) por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram analisadas imediatamente no citômetro (Cytoflex, Beckman Coulter, EUA), usando a excitação de 405 nm (violeta) com filtros *BandPass* de 450/45, e modo linear. As análises dos resultados foram feitas através do software FlowJo™ v10.8 (BD Life Sciences), utilizando a ferramenta de ciclo celular com o modelo Dean-Jett-Fox.

### **3.9 IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS DE MORTE CELULAR**

Foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células/poço, em triplicata, em placas de 24 poços. As placas foram incubadas por 24 horas para ocorrer a adesão das células. Após esse período, as células foram expostas por 24 horas ao IC<sub>50</sub> do POH, IC<sub>50</sub> do PA, IC<sub>50</sub> da Cisplatina, IC<sub>25</sub> do POH + IC<sub>25</sub> da Cisplatina e aos controles. Foi utilizado como controle positivo de apoptose 1 µM de estaurosporina, e o DMEM suplementado com 10% SFB como controle negativo. Um grupo de células não marcadas (branco) foi utilizado para descontar a autofluorescência das células. Posterior a exposição, as células foram destacadas utilizando TrypLE (Gibco™) e transferidas para microtubos cônicos. As células foram centrifugadas a 300g por 8 minutos, lavadas com PBS 1 vez e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado, e as células ressuspensas em 100 µL de *binding buffer* (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, e 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4). Foram adicionados 2 µL da solução de Anexina V (FITC) (Invitrogen, EUA) e 1 µL iodeto de propídio (Invitrogen, EUA) a 100 µg/mL por tubo. As amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente protegidas da luz. Após a incubação foram adicionados 400 µL de *binding buffer* aos tubos para chegar ao volume final de 500 µL, e as amostras foram analisadas imediatamente no citômetro (Cytoflex, Beckman Coulter, EUA), usando a excitação de 488 nm (azul) com filtros *BandPass* de 525/40 (anexina) e 585/42 (iodeto de propídio). As análises dos resultados foram feitas através do software FlowJo™ v10.8 (BD Life Sciences).

### **3.10 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO**

A exposição das células foi feita em microtubos cônicos. Para isso, foram distribuídas  $1 \times 10^5$  células por microtubo. As células foram centrifugadas a 300g por

8 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L do marcador CM-H2DCFDA (Invitrogen, EUA) a 5  $\mu$ M e incubadas a 37 °C por 30 minutos. A solução com o marcador foi removida, e as células foram expostas aos grupos experimentais durante 1 hora e 30 minutos. Foi utilizado como controle positivo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 10 mM para a célula MG-63 e 1 mM para a célula U2-OS. Após a exposição, as células foram centrifugadas, lavadas 1 vez com PBS e depois ressuspensas em PBS para análise. As amostras foram analisadas no citômetro (Cytoflex, Beckman Coulter, EUA) usando a excitação de 488 nm (azul) com filtros *BandPass* de 525/40. As análises dos resultados foram feitas através do software FlowJo™ v10.8 (BD Life Sciences).

### **3.11 ANÁLISE DE MÚLTIPLOS FATORES SECRETADOS**

Os sobrenadantes foram coletados após 24 horas de exposição das células MG-63, U2-OS e OH aos compostos testados (POH, PA e cisplatina) para a análise de múltiplos analitos secretados. Um painel abrangente de 27 analitos (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay #M500KCAF0Y, Biorad) foi avaliado, classificados em quatro categorias: citocinas pró-inflamatórias, citocinas anti-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento. As análises foram conduzidas utilizando o sistema Bio-Plex MAGPIX (Bio-Rad), com suporte de uma lavadora automatizada, seguindo rigorosamente os protocolos recomendados pelo fabricante. Os resultados obtidos foram visualizados em um *heatmap* gerado pelo software GraphPad Prism 10, permitindo uma análise comparativa e detalhada dos perfis de secreção entre os diferentes tratamentos.

### **3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism, versão 10.3.1 para Mac OS X (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). Inicialmente, foram aplicados testes de normalidade para verificar a distribuição dos dados. Para os ensaios que apresentaram distribuição normal, conforme o teste de Shapiro-Wilk, as comparações entre os grupos foram realizadas por meio de análises de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, conforme apropriado, seguidas do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Para os ensaios que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de

Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA (IC<sub>50</sub>) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

Os valores de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória 50%) para cada composto foram avaliados em duas linhagens de células tumorais, MG-63 e U2-OS, e em uma linhagem de células normais de osteoblastos primários humanos, OH. Além disso, foi calculado o índice de seletividade (IS) para as células tumorais.

Como pode ser observado na Tabela 1, o IC<sub>50</sub> do álcool perílico (POH) para a linhagem MG-63 foi de 3,2 mM, enquanto para a U2-OS foi de 3,5 mM. Já para a linhagem de células normais (OH), o valor de IC<sub>50</sub> foi de 3,7 mM. O índice de seletividade calculado para MG-63 foi de 1,16 e para U2-OS foi de 1,06, indicando que o POH apresentou maior seletividade para a linhagem MG-63. Similarmente, os valores de IC<sub>50</sub> do ácido perílico (AP) para as linhagens MG-63, U2-OS e OH foram 7,55, 10 e 11,1 mM, respectivamente. O índice de seletividade para MG-63 foi de 1,46 e para U2-OS foi 1,11. Esses resultados sugerem que o AP também foi mais seletivo para a linhagem MG-63. Para a cisplatina, os valores de IC<sub>50</sub> observados foram de 0,124 mM para MG-63, 0,081 mM para U2-OS e 0,224 mM para OH. O índice de seletividade resultante para as células MG-63 foi 1,8 e para U2-OS foi 2,76, sugerindo maior seletividade para linhagem U2-OS.

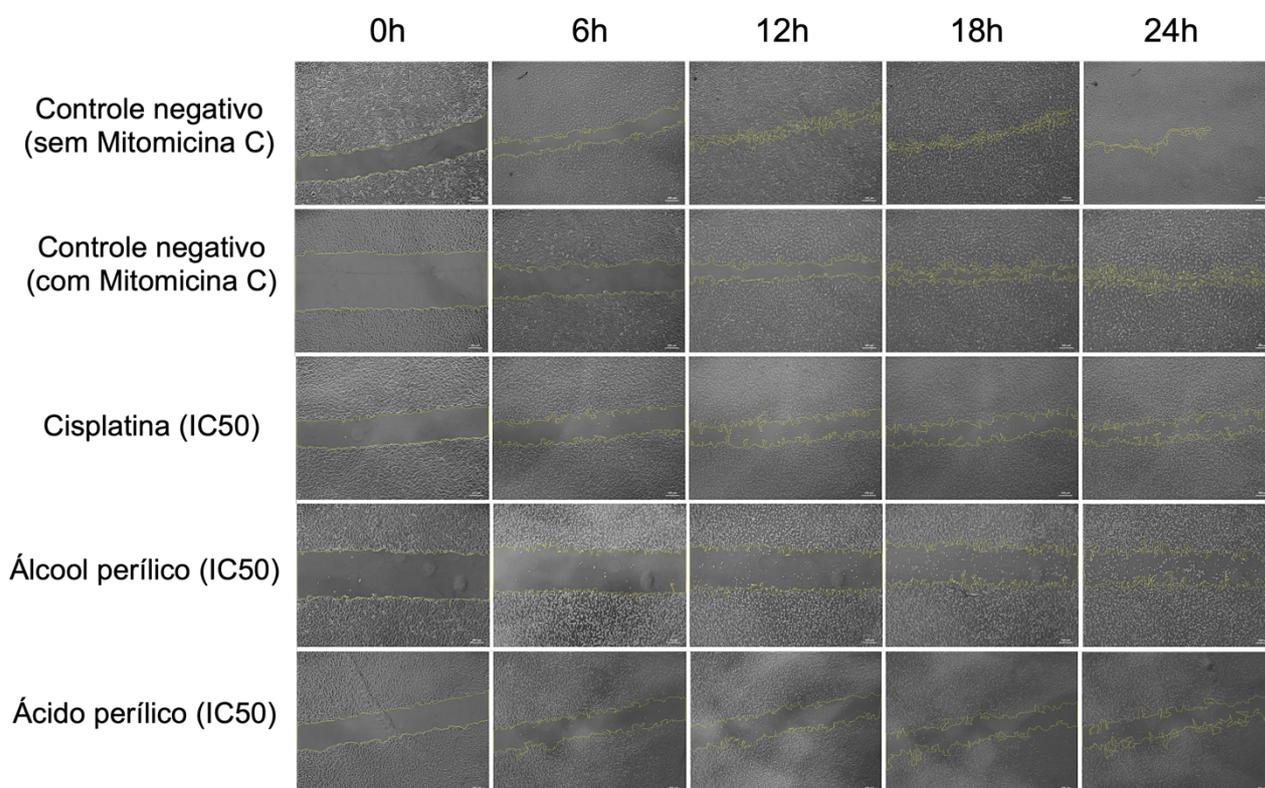
**Tabela 1:** Valores da concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS) do álcool perílico, ácido perílico e cisplatina nas linhagens de células ósseas. Ensaio realizado em quadruplicata.

Composto	IC <sub>50</sub> (mM)	IC <sub>50</sub> (mM)	IC <sub>50</sub> (mM)	IS MG-63	IS U2-OS
	MG-63	U2-OS	OH		
Álcool Perílico	3,2	3,5	3,7	1,16	1,06
Ácido Perílico	7,6	10	11,1	1,46	1,11
Cisplatina	0,124	0,081	0,224	1,8	2,76

*O índice de seletividade foi calculado como a razão entre o IC<sub>50</sub> da célula normal e o IC<sub>50</sub> de cada célula tumoral.*

## 4.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar a capacidade de migração celular, foi realizado um ensaio de ranhura (*scratch assay*) utilizando as linhagens celulares MG-63 e U2-OS. Os efeitos na migração das células MG-63 são apresentados qualitativamente na Figura 8 e quantitativamente na Tabela 2. No grupo controle negativo, que não foi exposto à mitomicina, houve um fechamento mais significativo da ranhura após 24 horas (92%) em comparação ao grupo controle negativo exposto à mitomicina (84%). Esses resultados evidenciam uma redução na proliferação celular causada por esse composto. Como esperado, o grupo tratado com cisplatina mostrou uma diminuição acentuada na migração celular, com fechamento de apenas 35,4% da ranhura. As células tratadas com POH e AP apresentaram uma migração ainda mais reduzida em relação ao grupo controle (não tratado). Enquanto o grupo controle fechou cerca de 84% da ranhura em 24 horas, as células tratadas com POH fecharam apenas 29,8%, e as tratadas com AP fecharam 22,3%. Esses dados sugerem que esses compostos inibem efetivamente a migração celular.



**Figura 8:** Monitoramento da migração celular no ensaio de ranhura ao longo de 24 horas da linhagem tumoral MG-63. As imagens mostram o fechamento da ranhura em células tratadas com diferentes condições experimentais ao longo do tempo. As linhas representam grupos experimentais específicos. A primeira linha refere-se ao controle

negativo (células não tratadas) sem exposição prévia à Mitomicina C, a segunda linha refere-se ao controle negativo (células não tratadas) expostas previamente à Mitomicina C. As linhas subsequentes mostram células tratadas com cisplatina, álcool perílico (POH), e ácido perílico (AP). As colunas correspondem aos diferentes tempos de análise: 0h, 6h, 12h, 18h, e 24h após a criação da ranhura. As linhas amarelas foram geradas automaticamente pelo ImageJ, e indicam a borda da ranhura. A progressão ao longo do tempo revela a capacidade de migração celular sob diferentes condições de tratamento, com menor fechamento observável nos grupos do POH e AP, sugerindo um efeito inibitório sobre a migração celular. Ensaio realizado em duplicata.

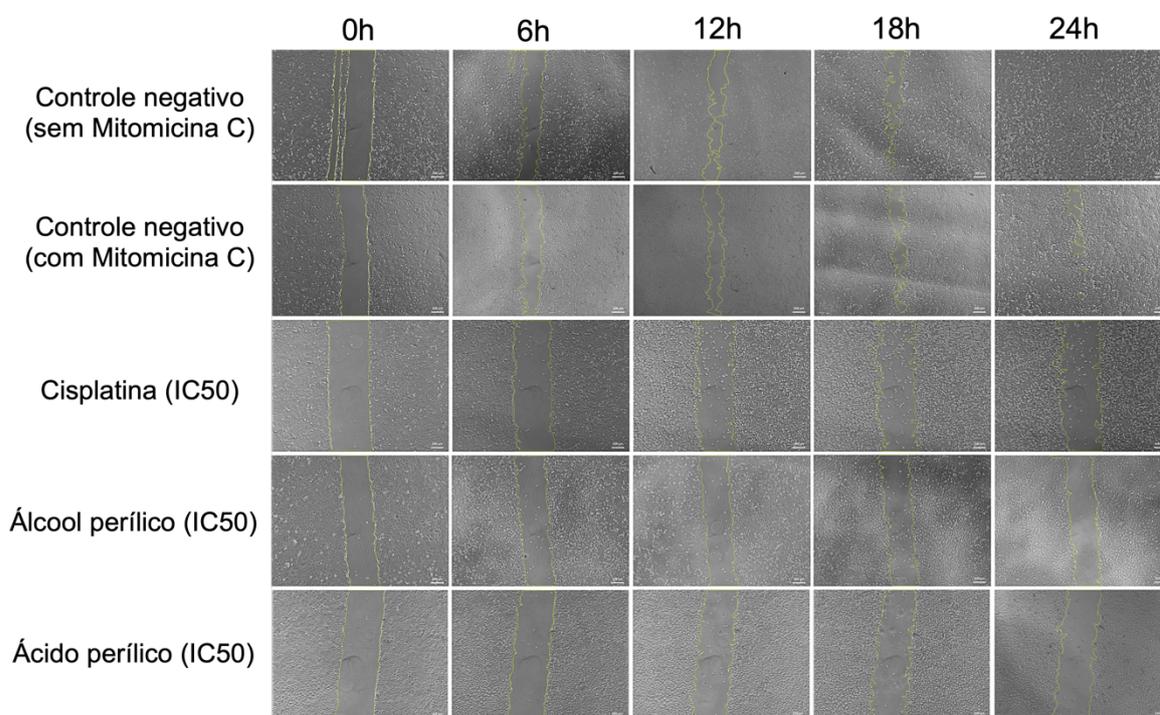
**Tabela 2:** Porcentagem de fechamento da ranhura nos diferentes grupos experimentais utilizando a linhagem MG-63 ao longo de 24 horas.

<b>Grupo experimental</b>	<b>0h</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>18h</b>	<b>24h</b>
Controle sem Mitomicina C	0%	45,2%	74,5%	83,9%	92%
Controle com Mitomicina C	0%	46,8%	72,6%	81,4%	84%
Cisplatina (IC <sub>50</sub> )	0%	17,3%	31,2%	34,9%	35,4%
Álcool Perílico (IC <sub>50</sub> )	0%	6,8%	10,9%	19,7%	29,8%
Ácido Perílico (IC <sub>50</sub> )	0%	15,6%	16%	22,6%	22,3%

*A tabela apresenta a porcentagem de fechamento da ranhura nos diferentes grupos experimentais ao longo de 24 horas, utilizando a linhagem tumoral MG-63. Os valores foram obtidos por análise de imagens capturadas em intervalos regulares após a criação da ranhura inicial. Todos os grupos foram tratados com Mitomicina-C (exceto o grupo controle sem Mitomicina) para minimizar a interferência da proliferação celular na análise de migração. Os valores (em porcentagem) representam o fechamento da ranhura ao longo do tempo.*

Os efeitos na migração celular na linhagem tumoral U2-OS são apresentados na Figura 9 e na Tabela 3, com resultados semelhantes ao observado nas células MG-63. O grupo controle negativo tratado com mitomicina mostrou um fechamento menor da ranhura (82,7%) em comparação ao controle negativo não tratado, que exibiu um fechamento completo (100%) após 24 horas, indicando que a mitomicina reduziu a proliferação celular. Os compostos POH e AP causaram

uma redução ainda mais significativa na migração dessa linhagem, resultando em fechamentos de apenas 11,7% e 13,2%, respectivamente. De forma semelhante, o tratamento com cisplatina levou a um fechamento de 13,2% após 24 horas, confirmando seu efeito inibitório sobre a migração celular.



**Figura 9:** Monitoramento da migração celular no ensaio de ranhura ao longo de 24 horas na linhagem tumoral U2-OS. As imagens mostram o fechamento da ranhura em células tratadas com diferentes condições experimentais ao longo do tempo. A primeira linha corresponde ao controle negativo (células não tratadas) sem exposição à Mitomicina C, enquanto a segunda linha representa o controle negativo tratado com Mitomicina C. As linhas subsequentes mostram células tratadas com cisplatina, álcool perílico (POH), e ácido perílico (AP). As colunas indicam os diferentes tempos de análise: 0h, 6h, 12h, 18h, e 24h após a criação da ranhura. As linhas amarelas foram geradas automaticamente pelo ImageJ, e indicam a borda da ranhura. A progressão ao longo do tempo revela a capacidade de migração celular sob diferentes condições de tratamento, com menor fechamento observável nos grupos do POH, AP e cisplatina, sugerindo um efeito inibitório sobre a migração celular. Ensaio realizado em duplicata.

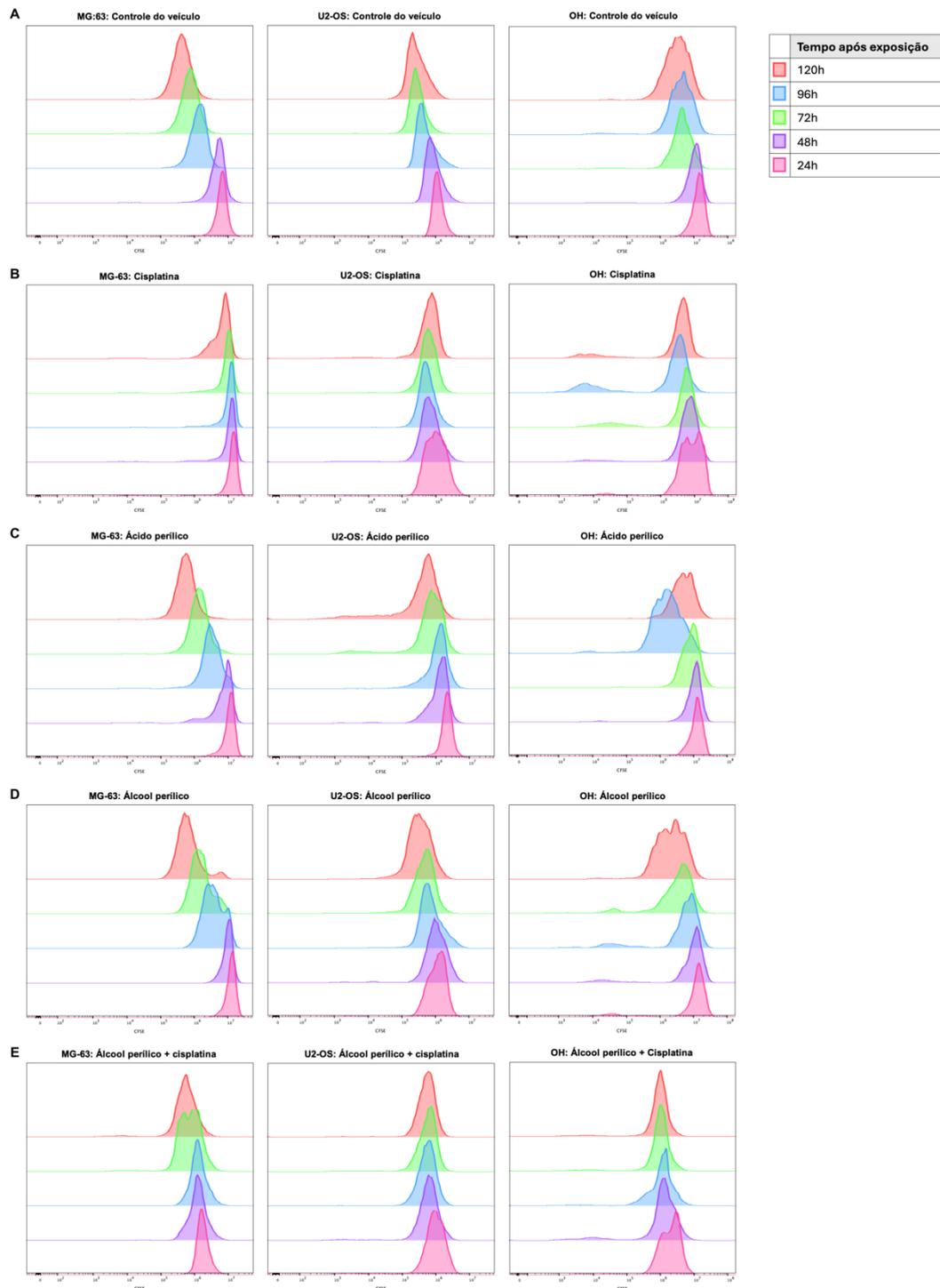
**Tabela 3:** Porcentagem de fechamento da ranhura nos diferentes grupos experimentais utilizando a linhagem U2-OS ao longo de 24 horas.

<b>Grupo experimental</b>	<b>0h</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>18h</b>	<b>24h</b>
Controle sem Mitomicina C	0%	43,7%	61,5%	75,9%	100%
Controle com Mitomicina C	0%	31,4%	48,7%	67,3%	82,7%
Cisplatina (IC <sub>50</sub> )	0%	6,2%	8,9%	11,4%	13,2%
Álcool Perílico (IC <sub>50</sub> )	0%	5,7%	9,4%	9,7%	11,7%
Ácido Perílico (IC <sub>50</sub> )	0%	2,2%	12%	11,6%	13,2%

A tabela apresenta a porcentagem de fechamento da ranhura em diferentes grupos experimentais ao longo de 24 horas, utilizando a linhagem tumoral U2-OS. As porcentagens foram calculadas a partir da análise de imagens capturadas em intervalos regulares após a criação da ranhura. Todos os grupos, exceto o controle sem Mitomicina-C, foram tratados com Mitomicina-C para minimizar a interferência da proliferação celular, permitindo uma avaliação mais precisa da migração. Os valores representam a proporção de fechamento da ranhura ao longo do tempo, indicando a capacidade de migração celular sob cada condição experimental.

### **4.3 ANÁLISE DOS EFEITOS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR**

A análise de proliferação celular utilizando o marcador CFSE foi realizada em células normais (OH) e em células tumorais (MG-63 e U2-OS), tratadas com diferentes compostos (cisplatina, ácido perílico, álcool perílico e a combinação de álcool perílico com cisplatina) ao longo de 120 horas. Esse ensaio permite monitorar a divisão celular pela redução da fluorescência. O CFSE, incorporado inicialmente nas células-mãe, é diluído pela metade a cada divisão celular, diminuindo a intensidade de fluorescência nas células-filhas. Os histogramas da citometria de fluxo da Figura 10 apresentam visualmente os resultados, demonstrando maior redução da fluorescência ao longo do tempo nos grupos em que houve aumento da proliferação celular. Dessa forma, o pico de fluorescência é deslocado para a esquerda.



**Figura 10:** Perfis de proliferação celular obtidos através de citometria de fluxo usando o marcador de proliferação CFSE (Carboxyfluoresceína diacetato succinimidil éster). Foram utilizadas diferentes linhagens celulares de osteossarcoma (MG-63, U2-OS) e osteoblastos primários (OH) submetidas a diferentes condições de tratamento: controle de veículo (A), cisplatina (B), ácido perílico (C), álcool perílico (D) e combinação de álcool perílico com cisplatina (E). Cada gráfico representa a distribuição de fluorescência (indicando a divisão celular) em função do tempo de exposição ao tratamento, com tempos de 24h (rosa), 48h (roxo), 72h (azul), 96h (verde) e 120h (vermelho). A redução progressiva na intensidade de fluorescência indica o aumento do número de divisões celulares, refletindo a taxa de proliferação. Ensaio realizado em duplicata.

A Tabela 4 apresenta a porcentagem relativa de diminuição da média de fluorescência ao longo do tempo, tomando como referência as 24 horas de cada tratamento específico. Nesse contexto, uma redução na fluorescência indica aumento na proliferação celular, pois a diluição do marcador CFSE ocorre proporcionalmente à divisão celular.

**Tabela 4:** Porcentagem de retenção de fluorescência do marcador CFSE nas linhagens celulares MG-63, U2-OS e OH ao longo de 120 horas sob diferentes condições experimentais.

Tipo celular	Tempo após a exposição	Controle do veículo	Cisplatina	Ácido perílico	Álcool perílico	Álcool perílico + cisplatina
MG-63	24h	100%	100%	100%	100%	100%
	48h	76,2%	125,6%	99,3%	98,3%	68,7%
	72h	21%	123,9%	55,6%	43,7%	70,2%
	96h	12,4%	123,9%	25,9%	19,6%	41,5%
	120h	7,4%	87,9%	10,9%	8,2%	30,4%
U2-OS	24h	100%	100%	100%	100%	100%
	48h	63,1%	90,9%	46,5%	95,6%	123,8%
	72h	39,1%	81,8%	45,4%	84,0%	135,9%
	96h	22,1%	93,9%	27,2%	51,4%	154,9%
	120h	21,2%	84,3%	11,3%	40,5%	123,4%
OH	24h	100%	100%	100%	100%	100%
	48h	86,3%	98,9	90,7%	118,8%	55,9%
	72h	43,3%	54,3%	90%	74,2%	60,6%
	96h	43%	43,8%	61,7%	53,3%	50,6%
	120h	34,9%	21,5%	21,2%	45,4%	46%

*A tabela apresenta a porcentagem de retenção de fluorescência do marcador CFSE após 24 horas de exposição às condições experimentais: controle de veículo, cisplatina, ácido perílico, álcool perílico e a combinação de álcool perílico com cisplatina. A fluorescência do CFSE é inversamente proporcional à taxa de divisão celular, indicando que maior retenção de fluorescência reflete menor proliferação celular. Os valores foram calculados a partir da média geométrica da fluorescência.*

Na linhagem celular tumoral MG-63, a cisplatina demonstrou atividade antiproliferativa ao longo do tempo, com valores elevados de porcentagem de fluorescência até 96 horas (123,9%). Esses dados indicam que a cisplatina teve efeito de redução da proliferação celular durante este período de tratamento. No entanto, em 120 horas, observou-se uma diminuição para 87,9%, sugerindo uma leve recuperação na proliferação celular. O ácido perílico também apresentou efeito

antiproliferativo até 96 horas, período em que manteve a média de fluorescência o dobro do grupo controle. No entanto, após esse período houve recuperação da proliferação celular. O álcool perílico mostrou um padrão similar ao do ácido perílico, sugerindo uma atividade transitória na proliferação celular. Já a combinação do álcool perílico com cisplatina manteve a redução da proliferação celular até 120 horas, mantendo 4 vezes o valor da fluorescência em comparação ao grupo controle. Entretanto, a atividade antiproliferativa foi menor comparado à cisplatina isolada (Tabela 4).

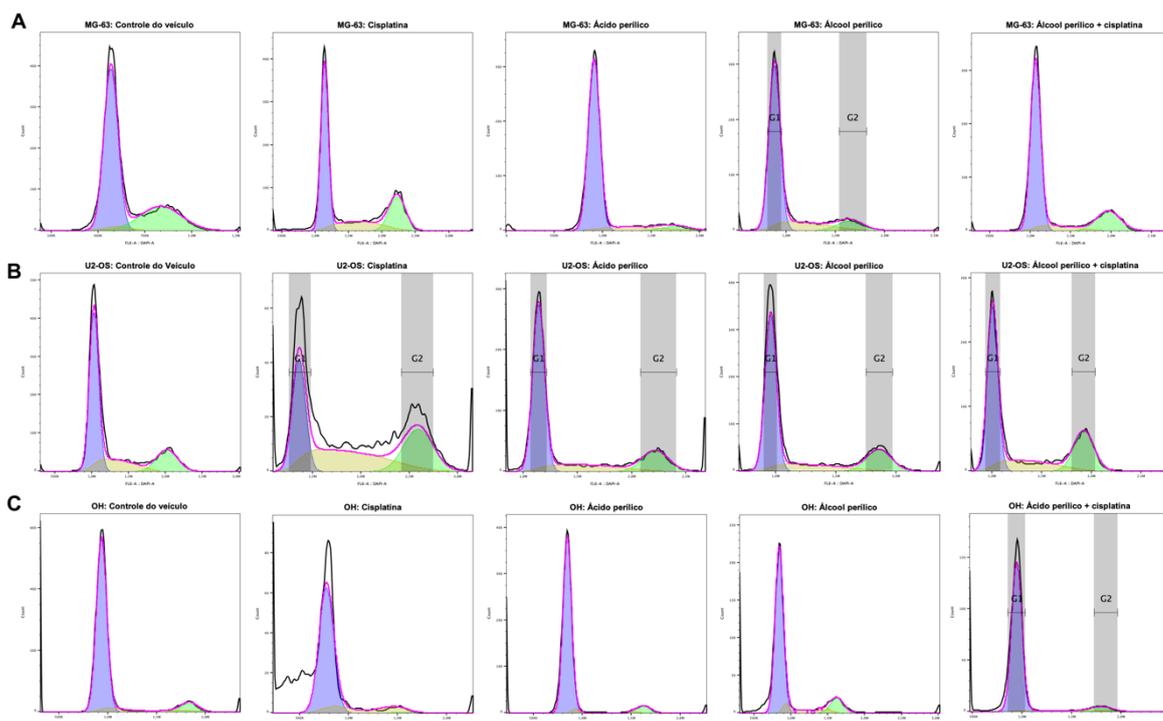
Na célula tumoral U2-OS, a cisplatina também apresentou efeito antiproliferativo com porcentagem de fluorescência relativamente alta ao longo do tempo, atingindo 84,3% em 120 horas. O ácido perílico manteve o padrão de decaimento da fluorescência similar ao grupo controle, sugerindo ausência de atividade antiproliferativa nesta linhagem. No grupo do álcool perílico isolado, houve redução da porcentagem de fluorescência ao longo do tempo, atingindo, ao final do período de tratamento, 2 vezes mais fluorescência que o grupo controle. Isso indica que houve atividade antiproliferativa nesta linhagem induzida pelo POH. Na combinação de álcool perílico e cisplatina, houve um aumento na atividade antiproliferativa com a porcentagem de fluorescência em 123,4% em 120 horas. Esse resultado sugere que esta combinação de tratamento pode ser mais eficaz em reduzir a proliferação em células U2-OS do que os compostos isolados (Tabela 4).

Nas células normais OH, todos os grupos se comportaram de forma similar ao grupo controle, indicando baixa influência antiproliferativa em células normais pelos compostos analisados (Tabela 4).

#### **4.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR**

Para analisar a influência da cisplatina, do ácido perílico, do álcool perílico e da combinação de álcool perílico com cisplatina nas fases G1, S e G2 do ciclo celular das células MG-63, U2-OS e OH, foi realizado o ensaio por citometria de fluxo utilizando marcação com DAPI. A análise de uma população de células coradas com marcador de DNA gera um histograma característico (Figura 11). Nesse perfil, as células na fase G0/G1, que apresentam conteúdo diploide (2N), exibem metade da quantidade de DNA em comparação com as células na fase G2/M, que possuem

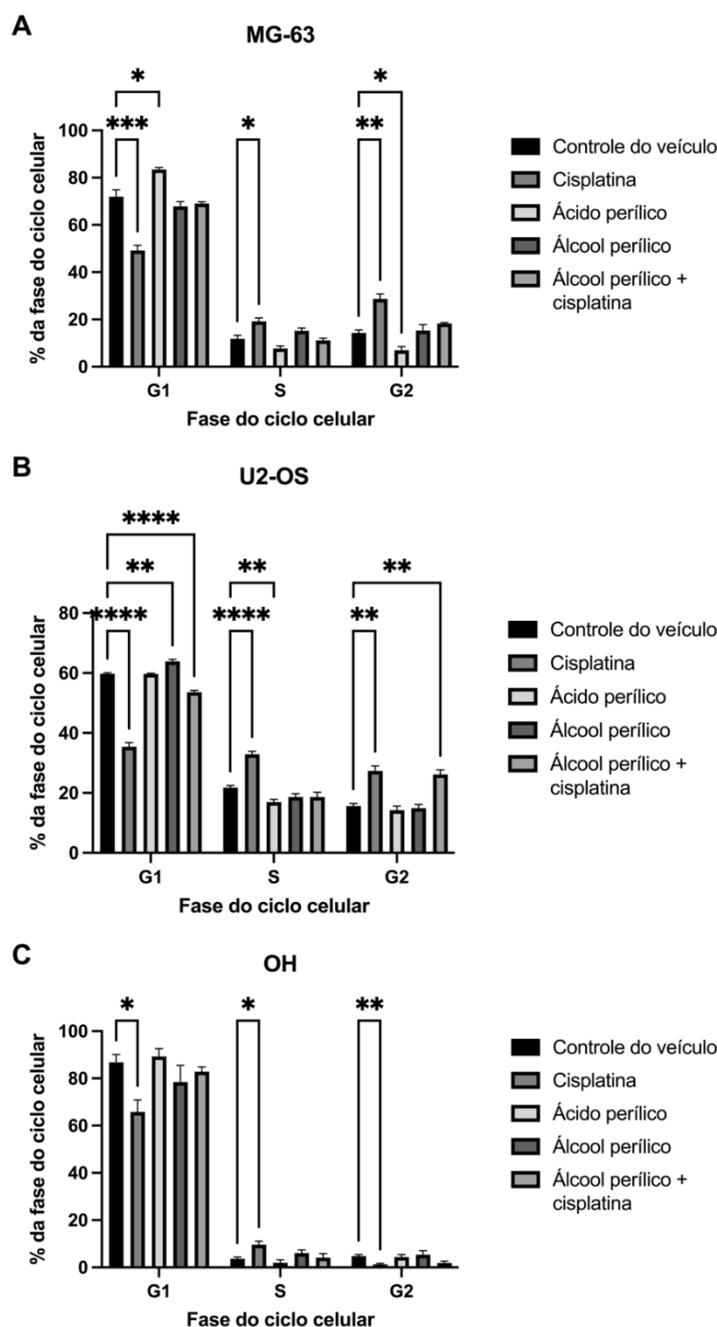
conteúdo tetraploide (4N). As células em fase S, em processo de replicação do genoma, apresentam um conteúdo intermediário de DNA, refletindo a síntese progressiva de material genético. Esse padrão permite uma avaliação detalhada das distribuições das fases do ciclo celular, indicando a proporção de células em G0/G1, S e G2/M com base no conteúdo de DNA. O perfil normal das células está representado pelo grupo controle do veículo.



**Figura 11:** Análise do ciclo celular por citometria de fluxo com marcação de DNA usando DAPI, em diferentes linhagens celulares após tratamentos específicos. A quantidade de células em cada fase do ciclo celular (G1, S e G2/M) foi avaliada em células tumorais MG-63 (A), U2-OS (B) e em células normais OH (C). Cada painel representa a distribuição das células nas fases do ciclo celular para os tratamentos controle do veículo, cisplatina, ácido perílico, álcool perílico e a combinação de álcool perílico com cisplatina. As regiões em roxo indicam a fase G1, a fase S é indicada em amarelo e a fase G2 em verde conforme a intensidade de fluorescência do DAPI, que reflete o conteúdo de DNA. Ensaio realizado em triplicata.

Como pode ser observado na Figura 12, na linhagem MG-63, o grupo controle apresentou a fase G1 com  $72\% \pm 7,12$ , a fase S com  $11,8\% \pm 3,55$ , e a fase G2 com  $14,3\% \pm 3,19$  das células. A cisplatina reduziu a porcentagem de células na fase G1 ( $p=0,0004$ ) para  $49,2\% \pm 5,26$ , e aumentou a fase S ( $p=0,0149$ ) para  $19,2\% \pm 3,52$  e a fase G2 ( $p=0,0011$ ) para  $28,7\% \pm 5,15$ . Esses resultados indicam um *arrest* celular nas transições das S/G2 e G2/M. O ácido perílico aumentou a

porcentagem de células na fase G1 ( $p=0,0281$ ) para  $83,5\% \pm 2,16$ , e reduziu a fase G2 ( $p=0,0167$ ) para  $7\% \pm 3,82$ , indicando *arrest* celular na transição G1/S. O álcool perílico apresentou uma tendência em reduzir a porcentagem de células na fase G1 ( $67,9\% \pm 4,52$ ) e em aumentar nas fases S ( $15,2\% \pm 2,74$ ) e G2 ( $15,3\% \pm 6,15$ ), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. A combinação do álcool perílico com cisplatina apresentou perfil similar ao do grupo controle com  $69\% \pm 1,84$  de células na fase G1,  $11,1 \pm 2,89$  na fase S e  $18,3 \pm 1,06$  na fase G2. Esse resultado indica que não foi possível detectar alteração no ciclo celular com o tratamento com álcool perílico, sendo condizente com o observado no ensaio de proliferação celular, onde não houve interferência neste grupo na linhagem MG-63.



**Figura 12:** Análise do ciclo celular por citometria de fluxo após marcação com DAPI em diferentes tipos de células após tratamento por 24 horas com cisplatina, ácido perílico, álcool perílico e a combinação de álcool perílico com cisplatina. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (G1, S e G2) foi determinada em células tumorais MG-63 (A), U2-OS (B) e em células normais OH (C). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) em comparação ao controle. Ensaio realizado em triplicata.

Na célula U2-OS o perfil do grupo controle foi de 59,8%  $\pm$  0,93 de células na fase G1, 21,7%  $\pm$  1,83 na fase S e 15,6%  $\pm$  2,19 na fase G2. A cisplatina atuou de

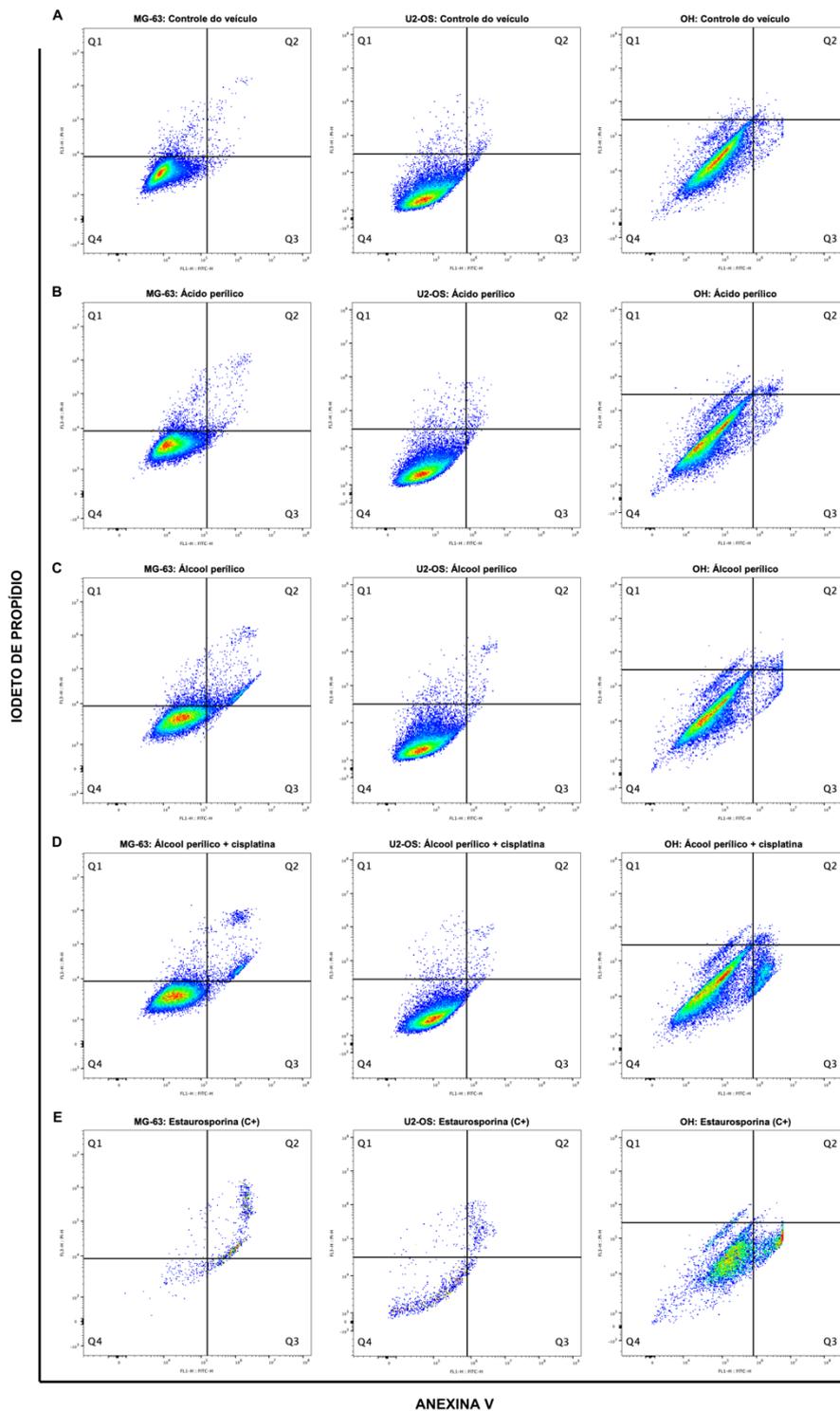
forma similar nessa linhagem, reduzindo a quantidade de células na fase G1 ( $p < 0,0001$ ) para  $35,4\% \pm 3,35$ , e aumentando as células na fase S ( $p < 0,0001$ ) e G2 ( $p = 0,0011$ ) para  $32,9\% \pm 2,64$  e  $27,3\% \pm 4,11$ , respectivamente. Isso indica que, similar ao efeito na MG-63, a cisplatina causa *arrest* celular nas transições das fases S/G2 e G2/M. O ácido perílico apresentou redução da porcentagem de células na fase S ( $p = 0,0076$ ) para  $17\% \pm 2,19$ , mas sem aumento na fase G1 ( $59,7\% \pm 0,64$ ) e G2 ( $14,2\% \pm 3,43$ ). Isso indica que não houve influência desse composto no ciclo celular desta linhagem, assim como no resultado de proliferação celular. O álcool perílico aumentou ( $p = 0,0015$ ) a porcentagem de células na fase G1 para  $63,9\% \pm 1,56$ , e apresentou tendência em reduzir a quantidade de células nas fases S ( $18,7\% \pm 2,78$ ) e G2 ( $14,9\% \pm 3,06$ ). Isso indica um *arrest* celular na transição G1/S no tratamento com álcool perílico. A combinação do álcool perílico com cisplatina reduziu a quantidade de células na fase G1 para  $53,6\% \pm 1,55$  ( $p < 0,0001$ ), não alterando a quantidade de células na fase S ( $18,7\% \pm 3,87$ ). No entanto, aumentou a porcentagem de células na fase G2 para  $26,2 \pm 3,73$  ( $p = 0,0011$ ). Estes resultados indicam que a combinação desses compostos causa *arrest* celular na transição das G2/M (Figura 12).

O perfil da célula normal OH foi de  $86,8\% \pm 8,18$  de células na fase G1,  $3,70 \pm 1,8$  na fase S e  $4,8 \pm 1,70$  na fase G2. A cisplatina foi o único tratamento que alterou de forma significativa o ciclo celular das células normais, reduzindo a quantidade de células em G1 para  $65,8 \pm 12,51$  ( $p = 0,0244$ ). Cisplatina também aumentou a porcentagem de células na fase S para  $9,6 \pm 3,66$  ( $p = 0,0259$ ) e reduziu na fase G2 para  $1,3 \pm 0,95$ . O grupo do ácido perílico apresentou  $89,3\% \pm 8,05$  de células em G1,  $1,9\% \pm 3,13$  em S e  $4,4\% \pm 2,72$  em G2. O grupo do álcool perílico exibiu  $78,5\% \pm 17,36$  de células na fase G1,  $6\% \pm 3,44$  na fase S e  $5,4\% \pm 4,05$  na fase G2. A combinação do álcool perílico com a cisplatina apresentou  $82,8\% \pm 4,95$  de células na fase G1,  $4,1\% \pm 4,44$  na fase S, e  $1,9\% \pm 1,80$  na fase G2 (Figura 12).

## **4.5 INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE MORTE CELULAR**

A avaliação da morte celular nas linhagens MG-63, U2-OS e OH foi realizada por citometria de fluxo. Foram utilizadas as marcações de Anexina V e iodeto de propídio (PI) para identificar células em diferentes estágios: células viáveis (Q4), apoptose inicial (Q3), apoptose tardia (Q2), e necrose (Q1). Os gráficos de dispersão para cada condição experimental (Figura 13) revelam a distribuição das células entre esses estados, variando conforme o tratamento aplicado.

Observa-se que, no grupo do controle do veículo, a maioria das células está no quadrante Q4, indicando alta viabilidade celular em todas as linhagens testadas. Em contraste, os tratamentos com álcool perílico e ácido perílico causaram um aumento nas populações em Q2 e Q3. Esses resultados refletem um aumento nas células em apoptose, especialmente na MG-63, onde o tratamento com álcool perílico resultou em 6,1% de células em apoptose tardia (Q2) e 2,3% em apoptose inicial (Q3), comparado a 0,5% e 0,3%, respectivamente, no controle (Tabela 5). Nas linhagens U2-OS e OH, os efeitos foram menos pronunciados, com uma distribuição de células ainda predominantemente no quadrante Q4, indicando maior resistência ao tratamento, especialmente com ácido perílico. Esses resultados sugerem que a resposta apoptótica aos tratamentos varia entre as linhagens celulares, com a MG-63 demonstrando maior sensibilidade ao álcool perílico.



**Figura 13:** Distribuição de células em diferentes estágios de morte celular analisadas por citometria de fluxo com Anexina V e iodeto de propídio (PI). Os eixos X e Y representam canais de fluorescência verde (FL1-H) e vermelho (FL3-H) e mostram coloração de Anexina V e PI, respectivamente. As análises foram realizadas em duas linhagens tumorais, MG-63 e U2-OS, e em osteoblastos humanos primários, OH. As células foram submetidas a diferentes condições experimentais: A- controle de veículo, B- ácido perilico, C- álcool perilico, D- álcool perilico com cisplatina e E- estaurosporina (controle positivo). Em cada gráfico, as células são classificadas em quatro quadrantes: Q1 (Anexina V-/PI+),

indicando células necrosadas; Q2 (Anexina V+/PI+), representando células em apoptose tardia; Q3 (Anexina V+/PI-), correspondendo a células em apoptose inicial; e Q4 (Anexina V-/PI-), indicando células viáveis. Ensaio realizado em triplicata.

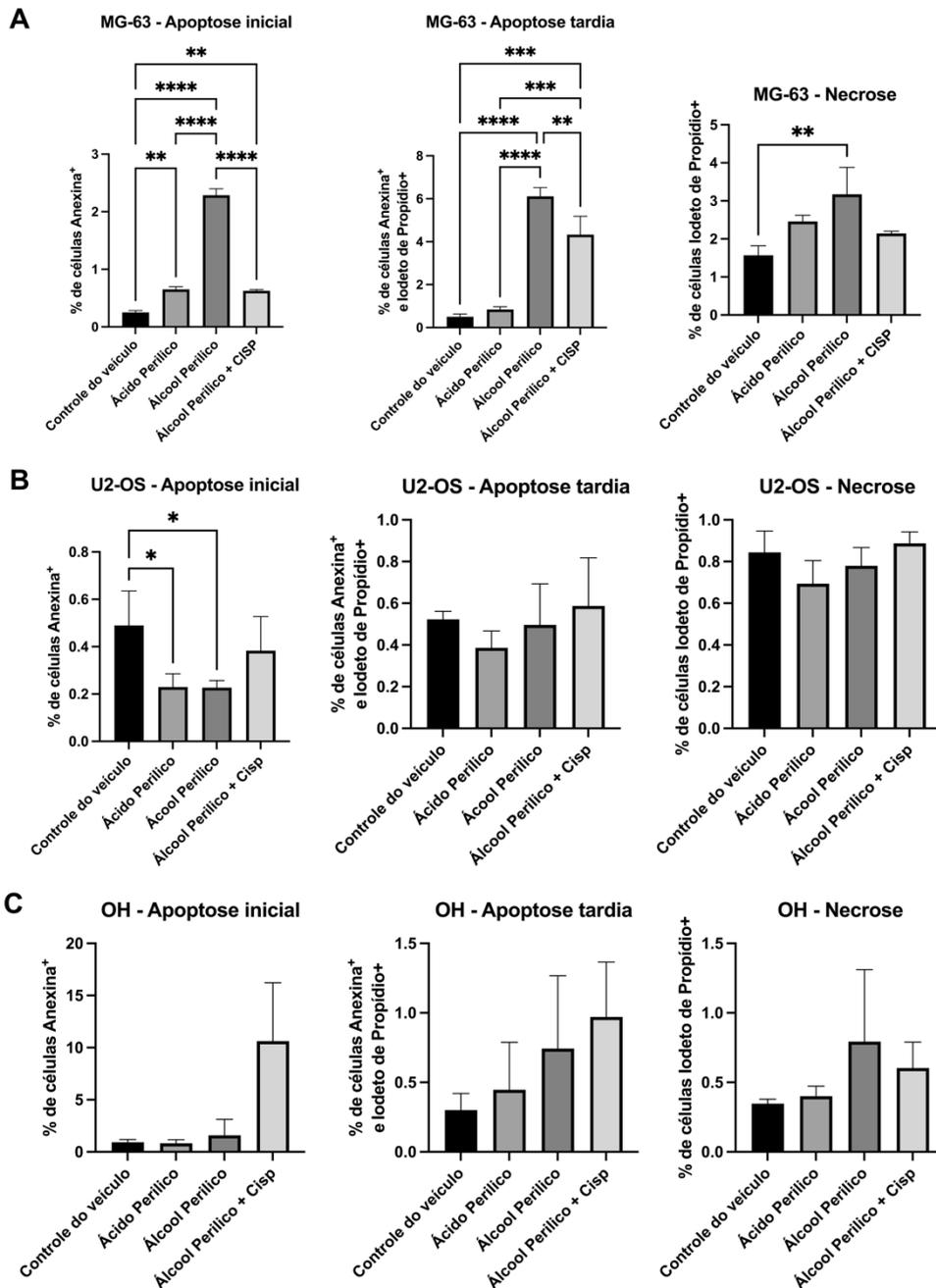
**Tabela 5:** Distribuição percentual das células nos quadrantes Q1, Q2, Q3 e Q4 nas células MG-63, U2-OS e OH após diferentes tratamentos.

Tipo celular	Tratamento	% Q1 (necrose)	% Q2 (apoptose tardia)	% Q3 (apoptose inicial)	% Q4 (células viáveis)
<b>MG-63</b>	Controle do veículo	1,5 ± 0,24	0,5 ± 0,13	0,3 ± 0,03	97,7 ± 0,17
	Ácido perílico (AP)	2,5 ± 0,16	0,8 ± 0,13	0,7 ± 0,05	96,1 ± 0,25
	Álcool perílico (POH)	3,2 ± 0,71	6,1 ± 0,41	2,3 ± 0,11	88,4 ± 1,07
	Álcool perílico + Cisplatina	2,1 ± 0,06	4,3 ± 0,85	0,6 ± 0,02	92,9 ± 0,82
	Estaurosporina (C+)	2,72	68,5	11,9	16,9
<b>U2-OS</b>	Controle do veículo	0,8 ± 0,10	0,5 ± 0,04	0,5 ± 0,15	98,2 ± 0,06
	Ácido perílico (AP)	0,7 ± 0,11	0,4 ± 0,08	0,2 ± 0,06	98,7 ± 0,23
	Álcool perílico (POH)	0,8 ± 0,09	0,5 ± 0,20	0,2 ± 0,03	98,5 ± 0,32
	Álcool perílico + Cisplatina	0,9 ± 0,06	0,6 ± 0,23	0,4 ± 0,14	98,2 ± 0,31
	Estaurosporina (C+)	10,7 ± 10,47	12,2 ± 10,84	2,9 ± 2,78	74,2 ± 4,26
<b>OH</b>	Controle do veículo	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,12	0,9 ± 0,26	98,4 ± 0,32
	Ácido perílico (AP)	0,4 ± 0,07	0,4 ± 0,34	0,8 ± 0,35	98,3 ± 0,78
	Álcool perílico (POH)	0,8 ± 0,52	0,7 ± 0,52	1,6 ± 1,52	96,9 ± 1,46
	Álcool perílico + Cisplatina	0,6 ± 0,19	1,0 ± 0,40	10,6 ± 5,59	87,8 ± 6,16
	Estaurosporina (C+)	0,8 ± 0,23	0,7 ± 0,66	16,2 ± 6,13	82,3 ± 5,80

Os valores representam a média ± desvio padrão. Q1 indica células necrosadas (Anexina V-/PI+), Q2 células em apoptose tardia ou necrose secundária (Anexina V+/PI+), Q3 células em apoptose inicial (Anexina V+/PI-), e Q4 células viáveis (Anexina V-/PI-).

Todos os tratamentos aumentaram, significativamente, a apoptose inicial na linhagem MG-63 em comparação com o grupo controle do veículo (Figura 14 A). As diferenças foram estatisticamente significativas, com  $p = 0,0013$  para ácido perílico,  $p < 0,0001$  para álcool perílico e  $p = 0,0019$  para a combinação de álcool perílico com cisplatina. Entre os tratamentos, o álcool perílico foi o mais eficaz na indução de apoptose inicial ( $p < 0,0001$ ). Na apoptose tardia, apenas o álcool perílico e sua combinação com cisplatina mostraram um aumento significativo em relação ao grupo controle, com  $p < 0,0001$  e  $p = 0,0002$ , respectivamente. Esses tratamentos também diferiram, significativamente, do ácido perílico, com  $p < 0,0001$  para o álcool perílico isolado e  $p = 0,0002$  para a combinação com cisplatina. No entanto, o álcool perílico isolado induziu apoptose tardia de forma mais pronunciada do que sua combinação com cisplatina ( $p = 0,0097$ ). Em relação à necrose, apenas o tratamento com álcool perílico resultou em um aumento significativo na linhagem MG-63 ( $p = 0,0093$ ).

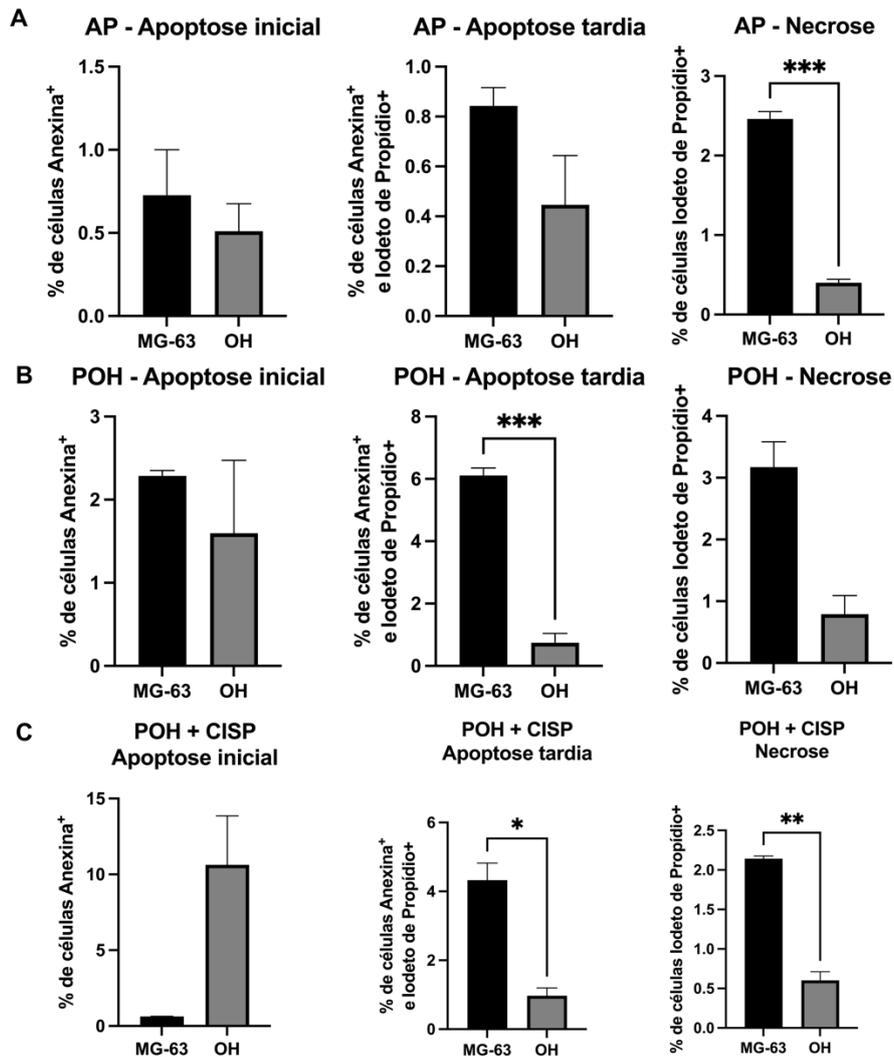
No experimento com a linhagem celular U2-OS, não foi possível observar um aumento significativo em apoptose e necrose devido a limitações do ensaio. Esse tipo celular apresentou alta marcação com Anexina V e PI no grupo controle. Isso ocorreu, possivelmente, em razão de danos causados pelo processamento da amostra, como o destacamento das células por técnicas enzimáticas com tripsina ou TrypLE. Curiosamente, no grupo controle com veículo, houve uma maior indução de apoptose inicial, com  $p=0,0279$  em comparação ao ácido perílico e  $p=0,064$  em comparação ao álcool perílico (Figura 14 B). No entanto, esses resultados não foram condizentes com a morfologia observada ao microscópio óptico (dados não mostrados), onde o grupo controle apresentava maior densidade de células aderidas e morfologia preservada. Nas células normais (OH), nenhum dos tratamentos resultou em aumento significativo de apoptose ou necrose (Figura 14 C).



**Figura 14:** A figura apresenta a porcentagem das células MG-63, U2-OS e OH (osteoblastos humanos primários) em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose após tratamento com diferentes condições: controle de veículo, ácido perílico, álcool perílico e álcool perílico combinado com cisplatina (CISP). Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo utilizando os marcadores Annexina V e iodeto de propídio, permitindo a distinção entre células viáveis, apoptóticas e necróticas. (A) Linhagem MG-63: mostra uma resposta significativa nas condições com álcool perílico e sua combinação com cisplatina, com aumento na apoptose inicial e tardia, além de uma elevação na necrose em comparação ao controle. (B) Linhagem U2-OS: há uma resposta menos pronunciada, com diferenças significativas observadas apenas na apoptose inicial após o tratamento com ácido perílico e álcool perílico. (C) Linhagem OH: há uma tendência de aumento na apoptose inicial, tardia e necrose, especialmente na combinação de álcool perílico com cisplatina, embora sem diferenças estatisticamente significativas. O eixo y representa a % de células e o eixo x os diferentes tratamentos. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão, e as

marcações de significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) indicam comparações significativas entre as condições de tratamento. Ensaio realizado em triplicata.

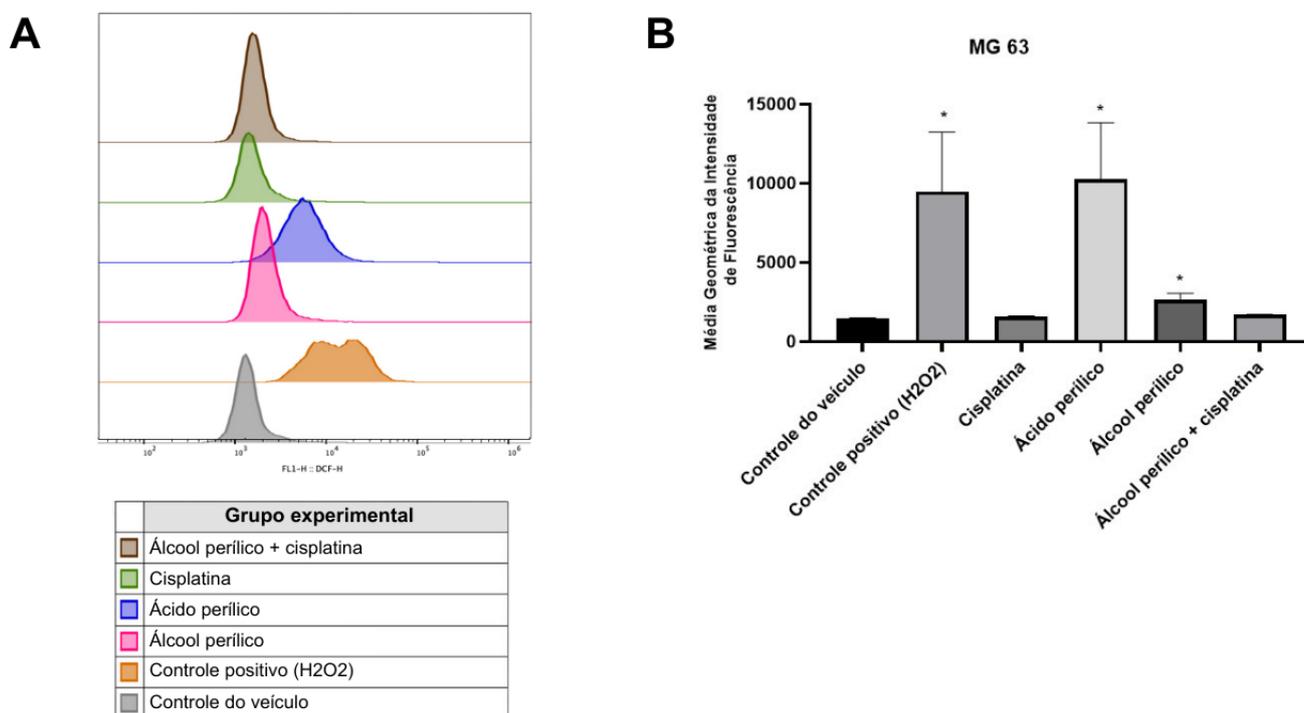
Os dados apresentados na Figura 15 indicam que os tratamentos exibiram uma atividade mais seletiva na linhagem tumoral MG-63 em comparação com a célula normal OH. Observou-se uma tendência de aumento de apoptose na MG-63 induzida pelo ácido perílico, além de um aumento significativo de necrose ( $p=0,0004$ ). O álcool perílico também demonstrou uma indução acentuada de apoptose nessa linhagem ( $p=0,0001$ ) e, embora tenha havido um aumento de necrose, esse efeito não alcançou significância estatística. A combinação de álcool perílico com cisplatina promoveu um aumento significativo de apoptose tardia ( $p=0,0312$ ) e necrose ( $p=0,0086$ ) na MG-63. Embora tenha sido observado um aumento de apoptose inicial na célula OH em comparação com a MG-63, essa diferença não foi estatisticamente significativa.



**Figura 15:** Níveis de apoptose e necrose entre as linhagens de osteossarcoma MG-63 e a célula normal, OH após tratamentos com ácido perílico (AP), álcool perílico (POH) e álcool perílico combinado com cisplatina (POH + CISP). As análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando Anexina V e iodeto de propídio para identificar as diferentes fases da morte celular. (A) Efeito do AP sobre apoptose inicial, apoptose tardia e necrose entre as linhagens celulares. A linhagem MG-63 apresenta um aumento significativo na necrose em comparação com OH. (B) Efeito do POH sobre apoptose inicial, apoptose tardia e necrose entre as linhagens. Observa-se uma diferença significativa na apoptose inicial e tardia para a linhagem MG-63 em relação a célula normal. (C) Efeito da combinação de POH + CISP sobre apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. A combinação induz apoptose tardia e necrose de maneira mais pronunciada na linhagem MG-63 em comparação com OH. O eixo y representa a % de células e o eixo x as diferentes linhagens celulares. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão, com marcações de significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ), indicando diferenças significativas entre as linhagens celulares. Ensaio realizado em triplicata.

## 4.6 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada, utilizando o marcador H2CMDCA, por citometria de fluxo para detectar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) após diferentes tratamentos. A análise nas células MG-63 utilizando a média geométrica da intensidade de fluorescência, apresentada na Figura 16, indica variações na produção de EROS entre as condições testadas. Na Figura 16 A, observa-se uma baixa intensidade de fluorescência no grupo controle, sugerindo um nível basal de estresse oxidativo. Em contraste, o controle positivo, realizado com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), induziu uma forte produção de EROS, evidenciada pelo deslocamento do pico de fluorescência. As células tratadas com álcool perílico e com ácido perílico exibem um aumento na intensidade de fluorescência (deslocamento do pico), indicando um aumento na produção de EROS. Esse aumento foi significativo para ambos os tratamentos, com  $p=0,0022$  no grupo do ácido perílico e  $p=0,0266$  no grupo do álcool perílico (Figura 16 B).

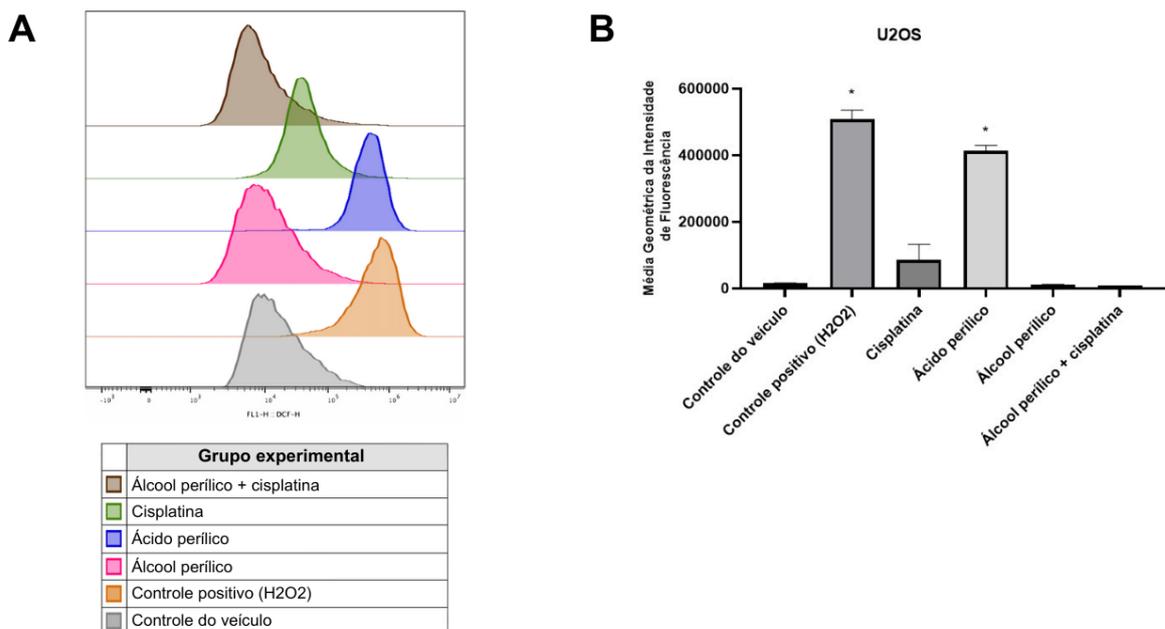


**Figura 16:** (A) Histograma representando a intensidade de fluorescência do marcador H2CMDCA para detecção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células MG-63 sob diferentes condições de tratamento. Observa-se um aumento na intensidade de fluorescência nas células tratadas, sugerindo um aumento na produção de EROS. (B) Dados quantitativos da produção de EROS em células MG-63. O eixo y representa a média

geométrica da intensidade de fluorescência e o eixo x os diferentes tratamentos. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão, e as marcações de significância estatística (\* $p < 0,05$ ) indicam comparações significativas entre as condições de tratamento com relação ao controle. Ensaio realizado em triplicata.

A produção de EROS também foi analisada na linhagem U2-OS. A Figura 17A apresenta os histogramas representativos da intensidade de fluorescência nos diferentes grupos experimentais. A Figura 17B exibe a quantificação da média geométrica da intensidade de fluorescência. De forma semelhante ao observado nas células MG-63, o controle do veículo apresentou baixa intensidade de fluorescência, representando um nível basal de EROS. O tratamento com  $H_2O_2$  resultou em um aumento acentuado da produção de EROS ( $p < 0,0001$ ), servindo como controle positivo para a indução de estresse oxidativo.

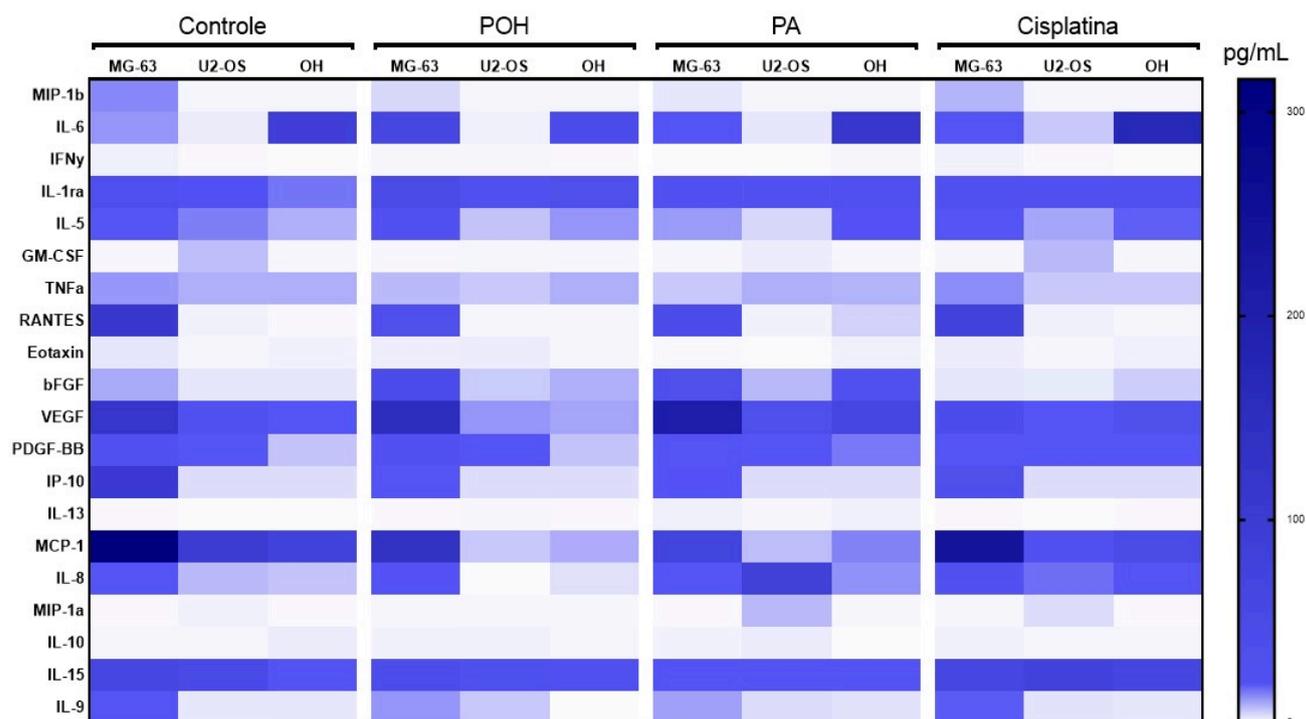
Entre os compostos testados, o ácido perílico promoveu um aumento expressivo da intensidade de fluorescência ( $p < 0,0001$ ), atingindo valores comparáveis ao controle positivo. Esse resultado indica que há uma forte indução de estresse oxidativo após tratamento com ácido perílico. Já o álcool perílico não induziu um aumento significativo na produção de EROS nesta linhagem, ao contrário do que foi observado nas células MG-63. A cisplatina, por sua vez, gerou um aumento discreto na produção de EROS em comparação ao controle do veículo, porém significativamente inferior ao controle positivo ( $p < 0,05$ ). Além disso, a combinação de álcool perílico com cisplatina não levou a um aumento significativo na produção de EROS (Figura 17).



**Figura 17:** (A) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência do marcador H2CMDCEFA nos diferentes grupos experimentais na célula U2-OS. O deslocamento do pico para a direita indica um aumento na produção de EROS. (B) Média geométrica da intensidade de fluorescência para cada grupo experimental. O controle do veículo apresentou baixa fluorescência, enquanto o controle positivo ( $H_2O_2$ ) induziu um aumento expressivo na produção de EROS. O tratamento com ácido perílico levou a um aumento significativo na intensidade de fluorescência, atingindo valores comparáveis ao controle positivo. A cisplatina induziu um leve aumento na produção de EROS, enquanto o álcool perílico e a combinação de álcool perílico com cisplatina não apresentaram variações significativas em relação ao controle do veículo. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). \* $p < 0,05$  em relação ao controle do veículo. Ensaio realizado em triplicata.

#### 4.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CITOCINAS, QUIMIOCIAS E FATORES DE CRESCIMENTO

O perfil de liberação de citocinas, quimioquinas e fatores de crescimento nas linhagens celulares de osteossarcoma MG-63, U2-OS e em osteoblastos humanos (OH) foi avaliado. Foram utilizadas diferentes condições experimentais, incluindo os grupos controle (células tratadas com meio de cultura), e tratados com POH, PA e cisplatina. Os resultados são apresentados no *heatmap* (Figura 18), o qual destaca variações importantes na expressão dessas moléculas em resposta aos diferentes tratamentos.



**Figura 18:** *Heatmap* representando as concentrações (em pg/mL) de 20 analitos em células MG-63, U2-OS e OH sob diferentes tratamentos (Controle, POH, PA e Cisplatina). Cada linha corresponde a um analito específico, enquanto as colunas refletem os diferentes tipos celulares e condições experimentais. Tons de azul mais escuros indicam concentrações mais altas de analitos, enquanto tons mais claros representam concentrações mais baixas. A escala de cores à direita fornece uma referência para a variação de concentração.

Para a linhagem celular MG-63, as citocinas pró-inflamatórias apresentaram alterações significativas após os tratamentos. Houve uma redução do MIP-1b em todos os grupos tratados, sendo essa redução menos pronunciada na cisplatina. A IL-6 aumentou em todos os tratamentos, enquanto o IFN $\gamma$  teve uma leve redução apenas com AP, e a IL-5 diminuiu exclusivamente com esse tratamento. O TNF $\alpha$  apresentou uma redução após os tratamentos com POH e AP, sendo mais acentuada no AP, e a IL-9 também reduziu com ambos. Entre as citocinas anti-inflamatórias, a IL-1ra aumentou em todos os grupos tratados. No grupo das quimiocinas, Eotaxina, IP-10 e MCP-1 apresentaram redução após os tratamentos com POH e AP. Em relação aos fatores de crescimento, o bFGF aumentou com POH e AP, mas diminuiu após o tratamento com cisplatina, enquanto o VEGF mostrou uma leve redução com a cisplatina (Figura 18).

Para as células U2-OS, a IL-6 aumentou, exclusivamente, no tratamento com cisplatina, enquanto a IL-5 reduziu com todos os tratamentos, sendo a diminuição

mais pronunciada nos grupos POH e AP. Observou-se redução do GM-CSF após tratamento com POH e AP, e o TNF $\alpha$  apresentou leve redução nos grupos POH e cisplatina. Por outro lado, a IL-9 aumentou com POH e AP. Em relação às citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 aumentou com o tratamento com POH. Entre as quimiocinas, Eotaxina aumentou apenas com POH, enquanto MCP-1 reduziu nos tratamentos com POH e AP. Houve também uma redução na produção de IL-8 e MIP-1a após o tratamento com POH, mas esses analitos aumentaram após os tratamentos com AP e cisplatina. No grupo de fatores de crescimento, o bFGF aumentou após tratamentos com POH e AP, enquanto o VEGF apresentou redução apenas com POH (Figura 18).

Nas células normais OH, a IL-6 aumentou apenas com o tratamento de cisplatina, e a IL-5 mostrou aumento em todos os grupos tratados. Houve leve redução do TNF $\alpha$  após o tratamento com cisplatina, enquanto a IL-15 apresentou um leve aumento e a IL-9 uma leve redução com POH. Entre as citocinas anti-inflamatórias, a IL-1ra aumentou em todos os tratamentos, e a IL-13 teve um leve aumento com AP, enquanto a IL-10 reduziu em todos os tratamentos. Quanto às quimiocinas, o tratamento com AP resultou em aumento de RANTES, enquanto MCP-1 reduziu com POH e AP. Houve uma leve redução de Eotaxina com POH, e a produção de IL-8 aumentou após tratamentos com AP e cisplatina. Em relação aos fatores de crescimento, o bFGF aumentou em todos os tratamentos. O VEGF reduziu com POH, mas apresentou leve aumento com AP, enquanto o PDGF-BB aumentou com os tratamentos de AP e cisplatina (Figura 18).

## 5. DISCUSSÃO

O câncer representa um dos principais desafios de saúde pública mundial, sendo uma das principais causas de morte, com milhões de novos casos diagnosticados anualmente. Entre os diversos tipos de câncer, o OS se destaca como o tumor ósseo maligno mais frequente em adolescentes e adultos jovens. Esse câncer agressivo é conhecido pela sua alta taxa de crescimento e pela tendência de desenvolver metástase, especialmente para os pulmões, o que complica o tratamento e reduz as taxas de sobrevivência a longo prazo. Apesar das melhorias nos protocolos de quimioterapia e cirurgias avançadas, os efeitos colaterais severos e a resistência ao tratamento ainda representam desafios significativos. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas terapias é essencial para melhorar os resultados clínicos e proporcionar opções de tratamento mais seguras e eficazes. Produtos naturais extraídos de plantas têm ganhado destaque na pesquisa oncológica. Isso se deve às suas propriedades bioativas que podem interferir em processos críticos para a sobrevivência e proliferação celular, como inflamação, apoptose e angiogênese. Essas moléculas naturais oferecem um vasto potencial para a descoberta de novos compostos antitumorais, inclusive para o tratamento do OS. Além disso, podem servir como base para o desenvolvimento de novas drogas ou como adjuvantes que potencializam a eficácia de terapias existentes.

Neste sentido, este trabalho investigou a atividade antitumoral *in vitro* do álcool perílico (POH) e de seu metabólito, o ácido perílico (AP), com o objetivo de compreender seu potencial como agentes terapêuticos. Para isso, foram utilizadas as linhagens celulares de OS, MG-63 e U2-OS, e osteoblastos primários normais. Os parâmetros analisados foram índices de seletividade, mecanismos de indução de diferentes vias de morte celular, estresse oxidativo, interrupção do ciclo celular, e a modulação da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento tumoral. Esses indicadores foram avaliados para elucidar os efeitos de POH e AP nas células tumorais e explorar seu possível uso como novas abordagens terapêuticas.

## 5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA (IC<sub>50</sub>) E SELETIVIDADE DOS TRATAMENTOS NAS LINHAGENS CELULARES

A análise dos valores de IC<sub>50</sub> e dos índices de seletividade para o POH e o AP revelou diferenças importantes na atividade antitumoral e seletividade desses compostos. O IC<sub>50</sub> do POH foi de 3,2 mM para a linhagem MG-63 e 3,5 mM para U2-OS, enquanto o valor para células normais (OH) foi de 3,7 mM. O índice de seletividade (IS), que indica a capacidade de um composto de afetar mais as células tumorais do que as células normais, foi de 1,16 para MG-63 e 1,06 para U2-OS. Esses resultados sugerem que o POH possui uma leve preferência pela linhagem MG-63. Embora esses valores indiquem alguma seletividade, o IS abaixo de 2,0 aponta que o POH não possui uma distinção marcante entre células tumorais e normais (SKVORTSOV *et al.*, 2021).

Para o AP, os valores de IC<sub>50</sub> para MG-63, U2-OS e OH foram 7,55, 10 e 11,1 mM, respectivamente. O índice de seletividade calculado foi de 1,46 para MG-63 e 1,11 para U2-OS, indicando que o AP é mais seletivo para MG-63 em comparação com U2-OS. Essa seletividade ligeiramente maior do AP em relação ao POH para MG-63 sugere que o AP pode ser um candidato mais promissor para terapia específica. Porém, a baixa seletividade absoluta evidencia a necessidade de otimizar essas moléculas ou combiná-las com outras abordagens para aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade em células normais.

Para efeito de comparação, a cisplatina, um agente quimioterápico tradicional, apresentou valores de IC<sub>50</sub> significativamente menores: 0,124 mM para MG-63, 0,081 mM para U2-OS e 0,224 mM para OH. O índice de seletividade foi de 1,8 para MG-63 e 2,76 para U2-OS, mostrando uma seletividade mais acentuada, especialmente para U2-OS. Contudo, sabe-se que o uso de cisplatina é, frequentemente, limitado devido aos seus efeitos colaterais severos. Nesse contexto, o POH e o AP poderiam atuar como adjuvantes, contribuindo para a eficácia global do tratamento ao induzir estresse oxidativo e morte celular nas células tumorais. Além disso, permitem a redução das doses de quimioterápicos necessários e, conseqüentemente, dos efeitos colaterais (FERRARI E HELISSEY, 2024; HU E LI, 2020). Assim, a incorporação de POH e AP em protocolos combinados de tratamento pode representar uma estratégia promissora para

aumentar a eficácia terapêutica e melhorar o perfil de segurança das terapias atuais para OS.

Comparando os valores de IC<sub>50</sub> do POH observados com valores de outros tecidos já investigados na literatura (Apêndice 1), podemos observar um valor de IC<sub>50</sub> maior para as células do tecido ósseo que foram investigadas. Células do tecido ósseo, como linhagens de OS, podem apresentar resistência a fármacos mesmo em culturas bidimensionais (2D). Isso se deve a características intrínsecas, como a expressão de proteínas de resistência multidroga (por exemplo, P-glicoproteínas) e a ativação de vias de sinalização de sobrevivência (como PI3K/Akt e Wnt/ $\beta$ -catenina) (BĂDILĂ *et al.*, 2021). Essas vias podem ajudar as células a sobreviver ao estresse causado por quimioterápicos, aumentando a resistência mesmo em um ambiente de cultura simplificado. Além disso, a expressão de fatores específicos do tecido ósseo, como certas proteínas da matriz extracelular e fatores como PDGF-DD, FGF, MCP1 e TNF- $\alpha$ , pode influenciar a resposta ao tratamento e criar um nível de resistência que não é tão evidente em outros tipos de células tumorais cultivadas em 2D (LAMOULINE *et al.*, 2023). O aumento de PDGF-DD leva a uma redução nos receptores de estrogênio (ER) (LAMOULINE *et al.*, 2023), os quais são importantes mediadores para a indução de apoptose pelo POH (MARÍN-RAMOS *et al.*, 2019). Portanto, como visto no resultado do ensaio multiplex, as células tumorais MG-63 e U2-OS possuem alta expressão de PDGF-DD até mesmo no controle, podendo este ser um dos fatores de resistência ao POH.

A comparação do índice de seletividade (IS) do POH em outros tipos de tumores na literatura é um desafio. Primeiramente, muitos estudos não relatam o cálculo do IC<sub>50</sub> para os compostos testados, o que limita a comparação direta de eficácia e seletividade. Além disso, mesmo quando o IC<sub>50</sub> é calculado, muitos estudos não utilizam células normais para estabelecer o IS, focando apenas na citotoxicidade contra células tumorais. Outra dificuldade encontrada é o uso frequente de células normais de origem murina em comparação com células tumorais humanas. Essa abordagem pode introduzir variáveis adicionais, dificultando a interpretação dos resultados, uma vez que células de diferentes espécies podem responder de forma distinta aos tratamentos (Apêndice 1).

## 5.2 EFEITO MIGRATÓRICO DO ÁLCOOL PERÍLICO, ÁCIDO PERÍLICO E CISPLATINA

Para investigar a atividade dos compostos em reduzir a capacidade migratória das células tumorais foi realizado o ensaio de ranhura (*scratch assay*). Para reduzir a influência da proliferação no fechamento da ranhura, os grupos foram tratados com mitomicina C, um agente alquilante com atividade de reticulação de DNA. A mitomicina C forma ligações covalentes entre fitas de DNA, o que causa pontes inter e intra-helicoidais, inibindo a síntese e replicação do DNA. Como consequência, ocorre redução da proliferação celular (CARLOS E WILSON, 2020). Nas duas células tumorais testadas observou-se uma redução na taxa de fechamento de ranhura nos controles com mitomicina C em comparação com os controles sem mitomicina C. Na MG-63, o fechamento caiu de 92% para 84% em 24 horas, enquanto na U2-OS caiu de 100% para 82,7%. Essa diferença demonstra que a proliferação contribui para o fechamento da ranhura. No entanto, a migração ainda ocorre independentemente da inibição proliferativa, indicando a capacidade migratória intrínseca das células.

No grupo controle sem mitomicina C, ambas as linhagens celulares apresentaram uma taxa de fechamento de ranhura relativamente alta, com MG-63 exibindo um fechamento ligeiramente mais lento do que U2-OS. Essa diferença pode ser devido a heterogeneidade presente entre as células de OS, que podem apresentar distintos perfis de migração e invasão (CHOONG *et al.*, 2014). Além disso, também pode ocorrer diferença no tempo de duplicação dessas células, pois a U2-OS leva em média 30-36 horas para duplicar (CELLOSAURUS, 2024), enquanto a MG-G3 leva 38-48 horas (CELLOSAURUS, 2024).

A cisplatina, conhecida pelo seu efeito citotóxico, mostrou inibição significativa na migração em ambas as linhagens celulares. Na MG-63, o fechamento é de apenas 35,4% em 24 horas, enquanto na U2-OS é de 13,2%. O álcool perílico e o ácido perílico também mostram redução na taxa de migração. Na MG-63, o álcool perílico resulta em 29,8% de fechamento, e o ácido perílico em 22,3%, enquanto na U2-OS, esses valores são 11,7% e 13,2%, respectivamente. Isso indica que esses compostos também têm um efeito inibitório sobre a migração celular, sugerindo uma ação potencial contra processos biológicos relacionados à invasão

e metástase. Esses resultados fornecem uma base para investigações futuras sobre o mecanismo de ação desses compostos na regulação da migração celular.

A influência do álcool perílico na migração celular já foi vista em outras células, como células primárias de glioma (MARÍN-RAMOS *et al.*, 2019), carcinoma hepatocelular (MA *et al.*, 2016) e células de câncer de mama (WAGNER *et al.*, 2002). Diversos mecanismos moleculares podem estar envolvidos nesta atividade do álcool perílico, como a redução de expressões do domínio intracelular Notch1 (N1ICD) e da proteína Snail, e aumento da proteína E-caderina (MA *et al.*, 2016). Além disso, o álcool perílico reduz os níveis de H-RAS e reduz a isoprenilação de proteínas da via da RAS (AFSHORDEL *et al.*, 2015).

A capacidade de um agente antitumoral em inibir a migração celular é crucial, especialmente em cânceres agressivos e com alto potencial metastático, como o OS (MILLAR *et al.*, 2017). A migração é um dos primeiros passos para a metástase, principal causa de mortalidade em pacientes com câncer. A inibição desse processo pode retardar ou até prevenir a disseminação da doença, melhorando o prognóstico e aumentando a sobrevida (STEEG, 2016). Além de prevenir a metástase, a inibição da migração também controla a invasividade local do tumor, limitando seu crescimento em tecidos adjacentes. Isso facilita intervenções cirúrgicas e reduz o impacto em estruturas próximas ao tumor primário (STEEG, 2016).

Estratégias migrastáticas representam uma abordagem emergente e inovadora, direcionada para bloquear todas as formas de migração e invasão tumoral através da matriz extracelular (MEC) (RAUDENSKÁ *et al.*, 2023). Ao contrário das terapias convencionais, focadas na proliferação celular, agentes migrastáticos atuam especificamente na prevenção da disseminação das células cancerígenas. Seu mecanismo de ação é através da interrupção de processos que facilitam a invasão e metástase. Assim, esses agentes podem reduzir a necessidade de altas doses de terapias citotóxicas, que, embora eficazes, frequentemente causam efeitos colaterais devido à sua toxicidade generalizada (RAUDENSKÁ *et al.*, 2023). Esse controle da metástase sem impacto direto na viabilidade celular posiciona os agentes migrastáticos como uma opção promissora para cânceres com alta propensão à disseminação precoce (RAUDENSKÁ *et al.*, 2023).

O surgimento de cânceres resistentes aos tratamentos convencionais reforça a necessidade de novas classes de moléculas com atividade antimetastática (GAYAN *et al.*, 2022). Compostos migrastáticos, quando combinados com quimioterápicos tradicionais, oferecem um regime terapêutico mais abrangente. Neste caso, o tratamento convencional age sobre o tumor primário, enquanto os migrastáticos previnem a migração e a formação de metástases, proporcionando um controle mais completo da progressão tumoral (RAUDENSKÁ *et al.*, 2023).

Um exemplo recente de aprovação de um medicamento com atividade antimetastática é a apalutamida, indicada para tratamento de câncer de próstata (MAIQUES *et al.*, 2021). A apalutamida foi aprovada com base no desfecho clínico "sobrevida livre de metástase". Este parâmetro avalia o tempo em que o câncer não se espalha para outras partes do corpo ou a morte ocorre após o início do tratamento (MAIQUES *et al.*, 2021). Essa aprovação pelo FDA representa um marco para o reconhecimento de terapias focadas na inibição de metástases, incentivando o desenvolvimento de novos migrastáticos eficazes para diversos tipos de câncer (MAIQUES *et al.*, 2021).

Em resumo, os agentes migrastáticos constituem uma estratégia promissora na oncologia, oferecendo uma nova abordagem para inibir especificamente a migração e invasão celular, processos essenciais para a metástase (GAYAN *et al.*, 2022). Embora ainda em fase de estudos clínicos, esses agentes têm o potencial de transformar o tratamento do câncer, criando um paradigma que combina o controle do tumor primário com a prevenção eficaz da metástase. Como resultado, pode causar melhor controle da doença e maior sobrevida para os pacientes (GAYAN *et al.*, 2022).

### **5.3 EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E MODULAÇÃO DO CICLO CELULAR PELO ÁLCOOL PERÍLICO, ÁCIDO PERÍLICO E CISPLATINA**

Uma característica fundamental dos quimioterápicos é sua atividade antiproliferativa, que visa combater o crescimento descontrolado característico das células tumorais. Este estudo investigou a capacidade do POH e do AP em reduzir a proliferação das células tumorais MG-63 e U2-OS, além das células normais OH, por meio de citometria de fluxo utilizando o marcador CFSE. Para complementar a análise de proliferação, também foi investigada a interferência desses compostos

nas diferentes fases do ciclo celular. O objetivo foi identificar em quais fases ocorreram possíveis bloqueios induzidos pelos tratamentos. Essa análise combinada permite associar o efeito antiproliferativo observado ao bloqueio específico em transições cruciais do ciclo celular, como G1/S ou G2/M, aprofundando a compreensão dos mecanismos de ação de cada composto.

Na célula tumoral MG-63, a cisplatina apresentou uma atividade antiproliferativa pronunciada ao longo do tempo. Foi observada a manutenção de elevados valores de porcentagem de fluorescência, com um pico de 123,9% em até 96 horas, indicando uma inibição substancial na divisão celular. Esses resultados foram complementados pelo ensaio de ciclo celular. A cisplatina reduziu, significativamente, a porcentagem de células na fase G1 e aumentou as fases S e G2, indicando bloqueio nas transições S/G2 e G2/M. Entretanto, o decréscimo para 87,9% em 120 horas sugere uma leve recuperação na proliferação, possivelmente indicando uma adaptação celular tardia ou resistência ao tratamento.

O AP também apresentou efeito antiproliferativo nas primeiras 96 horas, com níveis de fluorescência até o dobro do controle. Entretanto, também se observou uma recuperação na proliferação após esse período. O ensaio de ciclo celular mostrou que o AP causou um bloqueio na transição G1/S, com aumento da fase G1 e redução da fase G2 em MG-63. O POH exibiu um comportamento semelhante ao do AP. Esses resultados sugerem que ambos possuem uma atividade antiproliferativa transitória e que as células MG-63 podem recuperar a proliferação após o efeito inicial desses compostos. No ensaio de ciclo celular, não foi detectada diferença significativa em nenhuma fase com relação ao controle após o tratamento de 24 horas com POH. Por outro lado, a combinação do POH com cisplatina mostrou-se efetiva na redução da proliferação até as 120 horas, alcançando valores quatro vezes superiores ao controle. Contudo, essa resposta foi ligeiramente inferior à observada com a cisplatina isolada, sugerindo que a combinação pode diminuir a eficácia máxima da cisplatina nessa linhagem. No ensaio de ciclo celular, essa combinação causou bloqueio na transição G2/M, aumentando a porcentagem de células na fase G2.

Na linhagem U2-OS, a cisplatina manteve um perfil antiproliferativo com uma porcentagem de fluorescência relativamente elevada (84,3%) em 120 horas, reforçando seu potencial inibitório nesta linhagem. Assim como na linhagem MG-

63, esse tratamento reduziu significativamente a porcentagem de células na fase G1 e aumentou as fases S e G2. O AP, por outro lado, apresentou um padrão de fluorescência próximo ao do controle ao longo de todo o período, indicando uma ausência de efeito antiproliferativo significativo nesta linhagem específica. O AP não alterou significativamente o ciclo celular, o que corrobora com a ausência de efeito antiproliferativo observada no ensaio de proliferação. Esses resultados sugerem uma atividade seletiva do AP em diferentes linhagens tumorais, sendo mais efetivo em MG-63 do que em U2-OS.

No caso do POH, a resposta observada difere ligeiramente, com uma redução da fluorescência ao longo do tempo, mas que ao final resultou em valores duas vezes superiores ao controle, indicando atividade antiproliferativa. No ensaio de ciclo celular, ao contrário do observado na célula MG-63, observou-se um bloqueio parcial na transição G1/S, com aumento das células na fase G1. Assim como no caso do AP, essa diferença pode indicar que o POH influencia de maneira diferente cada linhagem, com um efeito antiproliferativo mais pronunciado em U2-OS. A combinação do POH com cisplatina, no entanto, promoveu uma resposta antiproliferativa aumentada, com valores de 123,4% em 120 horas. Isso sugere uma sinergia entre os compostos que potencializa a inibição da proliferação celular nesta linhagem específica. No ensaio de ciclo celular, essa combinação causou bloqueio na transição G2/M, aumentando a porcentagem de células na fase G2. Esse resultado reforça o potencial sinérgico entre o POH e a cisplatina, sugerindo uma ação combinada que intensifica o bloqueio do ciclo celular em U2-OS e prolonga o efeito antiproliferativo.

Nas células normais OH, os compostos não afetaram significativamente a proliferação celular nem o ciclo celular, exceto pela cisplatina, que induziu uma leve alteração na distribuição das fases do ciclo celular. Esse baixo efeito citostático para células normais destaca a seletividade dos compostos testados para células tumorais, um aspecto relevante para potenciais aplicações terapêuticas.

Após entrar na célula, a cisplatina sofre ativação por hidrólise, resultando na formação de compostos ativos que podem interagir com o DNA celular (MARTINHO *et al.*, 2019). Os compostos ativos de cisplatina formam ligações covalentes, resultando em adutos de DNA, como as ligações *intra-* e *inter-*fitas (MARTINHO *et al.*, 2019). Esses adutos causam distorções na hélice de DNA, bloqueando as

enzimas de replicação, como a DNA polimerase, e impedindo a continuidade do processo de divisão celular (DASARI *et al.*, 2022). Quando o DNA danificado tenta ser replicado, a maquinaria de reparo da célula é acionada. Porém, a quantidade e a natureza do dano causado pela cisplatina geralmente ultrapassam a capacidade de reparo das células tumorais, especialmente as que estão em rápida divisão (MARTINHO *et al.*, 2019). Como consequência, a célula não consegue progredir pelo ciclo celular normalmente, o que leva à parada do ciclo nas fases S ou G2/M (DASARI *et al.*, 2022). Além disso, a cisplatina atua no controle do ciclo celular e na inibição da proliferação celular por meio da modulação de várias vias de sinalização e mecanismos reguladores. Entre suas ações, destaca-se a ativação da via das MAPK/ERK (quinase regulada por sinal extracelular), a fosforilação da proteína p53 e o aumento da expressão de p21, o que contribui para o bloqueio do ciclo celular (MARTINHO *et al.*, 2019). Além disso, a cisplatina induz a expressão de GADD45 (uma proteína associada ao reparo de DNA e à parada de crescimento), modula o regulador Mdm2 e promove a fosforilação da proteína pró-apoptótica BAD na serina 136 através da via da AKT, levando ao bloqueio da progressão celular (MARTINHO *et al.*, 2019).

Durante o ciclo celular, a síntese e a degradação das ciclinas ocorrem em momentos específicos, ativando diferentes CDKs em pontos de verificação distintos. Na fase G1, a ciclina D associa-se com CDK4/6 para promover a transição em direção à fase S, onde ocorre a síntese de DNA (BATISTA *et al.*, 2024). Em seguida, a ciclina E se liga a CDK2 para iniciar a replicação do DNA e facilitar a entrada na fase S. Conforme a fase S progride, a ciclina A se junta a CDK2 para sustentar a replicação do DNA (BATISTA *et al.*, 2024). Na preparação para a mitose, a degradação da ciclina A permite a associação da ciclina B com CDK1, essencial para a entrada na fase M. A degradação ordenada das ciclinas garante o controle adequado nos pontos de verificação, evitando que o ciclo celular progrida de forma desregulada (GHAFOURI-FARD *et al.*, 2022). Em células cancerosas, as ciclinas frequentemente são superexpressas, levando a uma ativação descontrolada das CDKs. Essa ativação excessiva permite que as células cancerosas avancem no ciclo celular sem passar pelas verificações normais, mesmo na presença de danos ao DNA e outras anormalidades (GHAFOURI-FARD *et al.*, 2022).

Semelhante ao resultado encontrado com a U2-OS, Shi e Gould (2002) observaram que o POH induziu a parada na fase G0/G1 em células epiteliais mamárias transformadas murinas. Esse efeito ocorre, provavelmente, por meio da redução nos níveis de ciclina D1, ciclina A e nas atividades das quinases associadas a ciclina D1 e ciclina E-CDK2. Estudos semelhantes de Yuri e colaboradores (2004) e Bardon e colaboradores (1998) relataram que o POH induz a parada em G0/G1 em células de câncer de mama humano ao diminuir os níveis de ciclina D1 e ciclina E. Em contraste, Bardon e colaboradores (2002) encontraram uma resposta diferente em células de câncer colorretal humano, onde o POH diminuiu os níveis de ciclina D1 e das CDKs cdk4 e cdk2, mas aumentou a ciclina E. Wiseman e colaboradores (2007) observaram que o POH causou parada em G0/G1, com elevação dos níveis de ciclina D1 e redução na atividade de ciclina A, ciclina B1 e Cdk2 no adenocarcinoma pancreático humano.

Outra forma de regulação do ciclo celular e redução da proliferação celular que o POH atua, é através do aumento da expressão de p21. Isso já foi visto em vários modelos tumorais, incluindo câncer de cólon humano (BARDON *et al.*, 2002; KOYAMA *et al.*, 2013), células epiteliais mamárias transformadas murinas (SHI E GOULD, 2002), adenocarcinoma pancreático humano (Wiseman *et al.*, 2007), câncer de mama humano (YURI *et al.*, 2004) e adenocarcinoma de pulmão humano e carcinoma de células escamosas (YERUVA *et al.*, 2007). A proteína p21, também conhecida como inibidor de CDK1 (CDKN1A), atua inibindo complexos de ciclinas e CDKs, especialmente no ponto de verificação da fase G1. Além disso, contribui para a interrupção da progressão do ciclo celular em resposta a estresses celulares, como danos ao DNA ou ativação de oncogenes (ABBAS E DUTTA, 2009). Além de sua função de supressor tumoral, p21 também regula a apoptose ao influenciar proteínas pró e antiapoptóticas, contribuindo para a eliminação de células danificadas (KUMAR *et al.*, 2017). No câncer, a desregulação de p21 é comum e permite que células tumorais ignorem os pontos de verificação, proliferando descontroladamente (SHAMLOO E USLUER, 2019).

O POH também modula a via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK, frequentemente alterada em muitos tipos de câncer, o que contribui para a proliferação celular descontrolada e o crescimento tumoral (DILLON *et al.*, 2021). RAS é uma proteína G monomérica com atividade GTPase que alterna entre um

estado ativo ligado ao GTP e um estado inativo ligado ao GDP (SONG *et al.*, 2022). Quando ativada por sinais de receptores tirosina quinase (RTKs), como fatores de crescimento, RAS ativa as quinases RAF (BAHAR *et al.*, 2023). RAF, uma família de quinases específicas de serina/treonina, fosforila e ativa MEK após sua ativação por RAS (BAHAR *et al.*, 2023). Em sequência, MEK1 e MEK2, que são quinases de dupla especificidade, fosforilam e ativam a ERK (quinase regulada por sinais extracelulares) (BAHAR *et al.*, 2023; DILLON *et al.*, 2021).

A intensidade e duração da ativação de ERK são cruciais para determinar os efeitos celulares (DESCHÊNES-SIMARD *et al.*, 2024; CHEN *et al.*, 2023). Uma ativação prolongada e moderada de ERK ao longo de horas pode inibir genes antiproliferativos, promovendo a passagem da fase G0/G1 para a fase S do ciclo celular (Yamamoto *et al.*, 2006). Isso é essencial para a ativação de sinais pró-proliferativos, como a ciclina D1. Em contrapartida, picos temporários e elevados de atividade de ERK podem estimular a expressão de inibidores de CDKs, como p21 e p27, resultando na interrupção do ciclo celular (CHEN *et al.*, 2023).

Loutrari e colaboradores (2004) registraram diminuição na fosforilação de ERK em células de leucemia K562 após o tratamento com POH. Silva e colaboradores (2021) observaram o mesmo efeito em células ONS76 e DAOY, mas notaram aumento da fosforilação nas linhagens UW402 e UW473. Em um estudo com células transformadas por Bcr/Abl, Clark e colaboradores (2003) relataram uma redução na ativação de ERK e MEK em K562 e FDC-P1 e 32D. Similarmente, Marín-Ramos e colaboradores (2019) identificaram redução na fosforilação de ERK em células de glioblastoma humano. Fischer e colaboradores (2010) verificaram um aumento nos níveis de RAS, acompanhado de uma diminuição na fosforilação de ERK em células de glioblastoma humano A172.

A isoprenilação é uma modificação pós-traducional essencial que desempenha um papel fundamental na ativação da via de sinalização da RAS. Esse processo envolve a ligação covalente de grupos isoprenoides, como farnesil ou geranylgeranyl, ao resíduo de cisteína no C-terminal das proteínas RAS (LIU *et al.*, 2023; LAU E WANG, 2020). As enzimas farnesiltransferase (FTase) e geranylgeranyltransferase (GGTase) catalisam essa modificação (LIU *et al.*, 2023; LAU E WANG, 2020). Isso permite que as proteínas RAS se fixem na membrana plasmática — uma localização crucial para interações com moléculas ativadoras e

efetoras (BARANYI *et al.*, 2020). Sem a isoprenilação, as proteínas RAS não conseguem se posicionar corretamente na membrana, comprometendo sua função de transmitir sinais importantes para o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência celular (LAU E WANG, 2020; BARANYI *et al.*, 2020). No câncer, essa modificação é vital para a atividade oncogênica da RAS mutante, frequentemente presente em várias neoplasias (JUNG *et al.*, 2020). A localização correta da RAS na membrana é fundamental para sustentar a sinalização que promove a proliferação e progressão tumoral. Por isso, o bloqueio da isoprenilação se tornou uma possível abordagem terapêutica para cânceres impulsionados pela sinalização aberrante de RAS (BARANYI *et al.*, 2020; JUNG E BACHMANN, 2023). O POH demonstrou reduzir a isoprenilação de pequenas proteínas G em células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (CROWELL *et al.*, 1994) e em células de câncer de cólon humano SW480 (CERDA *et al.*, 1999).

No caso do AP, observou-se que, assim como na linhagem MG-63, esse composto induz parada do ciclo celular na fase G1 em células de câncer de cólon HCT116 (BARDON *et al.*, 2002). Em células musculares lisas da aorta de rato diplóide, Ferri e colaboradores (2001) também identificaram uma parada do ciclo na fase G1. Em contraste, Yeruva *et al.* (2007) relataram que o AP induz diferentes respostas em linhagens de câncer de pulmão, com parada do ciclo celular na fase S em células A549 e na fase G2 em células H520. Embora existam poucos estudos sobre as vias de sinalização associadas à ação do AP, há indícios de que a interrupção do ciclo celular e a redução na proliferação são mediadas pelo aumento do inibidor de quinase p21 (BARDON *et al.*, 2002; YERUVA *et al.*, 2007). Além disso, o AP também atua através da redução na isoprenilação de proteínas da via RAS (FERRI *et al.*, 2001).

A recuperação observada na proliferação celular nas MG-63 e U2-OS levanta hipóteses sobre o desenvolvimento de mecanismos de resistência celular, o que é muito observado em pacientes com OS, fator que representa um desafio significativo para a eficácia da quimioterapia. Entre esses mecanismos, destaca-se o aumento do efluxo de drogas devido a superexpressão de transportadores de membrana da família ABC, como a glicoproteína P (P-gp) e o transportador de proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas (MRP1). Esses transportadores atuam reduzindo a concentração intracelular de agentes

quimioterápicos, o que diminui sua eficácia e permite que as células tumorais sobrevivam e continuem a proliferar (MARCHANDET *et al.*, 2021). Além disso, as células de OS utilizam exossomos como um mecanismo alternativo para facilitar o efluxo de drogas. Dessa forma, permitem o transporte ativo de quimioterápicos para fora das células e evitando, assim, os efeitos citotóxicos desses agentes (FU *et al.*, 2023).

Outro mecanismo de resistência importante em células de OS é o aumento na eficiência das vias de reparo de DNA, como reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo de incompatibilidade (MMR), recombinação homóloga (HR) e junção de extremidade não homóloga (NHEJ) (MARCHANDET *et al.*, 2021). A ativação dessas vias de reparo permite que as células revertam os danos causados ao DNA, garantindo a continuidade da divisão celular mesmo após o tratamento.

Além das alterações genéticas, as modificações epigenéticas, como a metilação do DNA e as modificações de histonas, têm sido implicadas na resistência ao tratamento. Essas alterações podem levar à inativação de genes supressores de tumor e à ativação de genes de resistência. Como consequência, aumentam a capacidade das células de OS de se adaptarem ao ambiente terapêutico e promovem uma resposta diferencial à quimioterapia (TWENHAFEL *et al.*, 2023).

A ativação de vias de sinalização alternativas, como a PI3K/AKT/mTOR, também permite que as células de OS resistam ao tratamento. Essa via, junto com a via MAPK/ERK e a via Wnt/ $\beta$ -catenina, promove a proliferação celular e a sobrevivência, tornando as células menos suscetíveis aos efeitos de agentes quimioterápicos (MARCHANDET *et al.*, 2021).

Outro aspecto relevante é a reprogramação do metabolismo celular. O OS frequentemente exhibe o chamado efeito Warburg, caracterizado pela utilização preferencial da glicólise mesmo na presença de oxigênio (NI *et al.*, 2020). Essa adaptação metabólica permite que as células de OS atendam às altas demandas energéticas e de biossíntese para seu crescimento descontrolado, além de contribuir para a resistência aos tratamentos (CUNHA *et al.*, 2023). Um dos principais mecanismos pelos quais o efeito Warburg contribui para a resistência a esses tratamentos é a redução do estresse oxidativo (EROS) (PRUDOWSKY E

YUSTEIN, 2020). Células tumorais que adotam o efeito Warburg produzem menos espécies reativas de oxigênio durante a produção de energia, pois dependem menos da fosforilação oxidativa (CUNHA *et al.*, 2023). Muitos quimioterápicos, como a cisplatina, atuam induzindo o EROS nas células tumorais, o que causa dano celular e leva à apoptose (KLEIH *et al.*, 2019). No entanto, com a redução na produção de EROS, o efeito Warburg ajuda as células a evitar o dano oxidativo induzido pela quimioterapia, promovendo a resistência ao tratamento (CUNHA *et al.*, 2023).

Além disso, o efeito Warburg contribui para a resistência também através da acidificação do microambiente tumoral. A glicólise anaeróbica produz ácido láctico como subproduto, o que resulta na acidificação do microambiente em torno das células tumorais. Esse ambiente ácido pode diminuir a eficácia de alguns quimioterápicos sensíveis ao pH, que se tornam menos ativos em condições ácidas, ou dificultar a entrada de drogas quimioterápicas na célula (CUNHA *et al.*, 2023). Ainda, o aumento da atividade de bombas de efluxo é outra forma pela qual o efeito Warburg fortalece a resistência das células tumorais (CUNHA *et al.*, 2023). A glicólise elevada aumenta a produção de ATP, que oferece uma fonte rápida de energia para as células. Esse aumento na disponibilidade de ATP pode impulsionar a atividade das bombas de efluxo de drogas, como a P-gp, conseqüentemente, aumentando o transporte de quimioterápicos para fora das células tumorais (CUNHA *et al.*, 2023).

Os resultados observados na linhagem U2-OS com a combinação de POH e cisplatina indicam uma possível sinergia entre os compostos, uma vez que o efeito antiproliferativo combinado foi superior ao obtido com cada composto isoladamente. Para uma análise mais robusta e quantitativa da sinergia, estudos futuros devem incluir a avaliação do Índice de Combinação (CI) utilizando métodos consagrados, como o modelo de Chou-Talalay (DUARTE E VALE, 2022). Esse método permitirá verificar se o efeito combinado é significativamente superior ao efeito aditivo esperado, oferecendo uma compreensão mais precisa do potencial sinérgico entre os compostos e suas aplicações terapêuticas.

## 5.4 ANÁLISE DAS VIAS DE MORTE CELULAR

Os resultados obtidos para a linhagem MG-63 indicam que o AP induz morte celular em células tumorais predominantemente por via apoptótica, sugerindo a ativação de mecanismos programados de morte celular. O POH, por sua vez, demonstrou induzir morte celular não apenas por apoptose, mas também por necrose e possivelmente por necroptose. Esses resultados indicam, então, um envolvimento de múltiplas vias de morte celular mediadas por POH. A combinação de POH com cisplatina reforçou a ativação da via apoptótica, promovendo morte celular de forma mais seletiva. Em contraste, nas células normais (OH), nenhum dos tratamentos testados alterou de forma significativa os níveis de apoptose ou necrose, sugerindo seletividade dos compostos para células tumorais. No caso da cisplatina, é amplamente reconhecido que ela induz morte celular por meio de apoptose, necroptose e necrose (ALASSAF & ATTIA, 2023; NING *et al.*, 2018).

A indução de morte celular via apoptose é uma característica desejável em agentes quimioterápicos, pois esse mecanismo evita o desencadeamento de processos inflamatórios (CHAABANE *et al.*, 2013). A apoptose, sendo uma forma de morte celular programada, é caracterizada por um processo ordenado e controlado, que envolve a fragmentação do DNA, condensação da cromatina, encolhimento celular e formação de corpos apoptóticos (MAJTNEROVÁ E ROUŠAR, 2018; PARK *et al.*, 2023). Uma característica importante da apoptose é a alteração da membrana plasmática, onde ocorre *flip* da membrana. Neste processo, a fosfatidilserina (PS), normalmente presente na monocamada interna da membrana, é translocada para a monocamada externa (SHLOMOVITZ *et al.*, 2019). Essa exposição de PS serve como um sinal para fagócitos, permitindo que eles reconheçam e eliminem as células apoptóticas de maneira eficaz. A proteína Anexina V se liga especificamente à PS exposta, permitindo a detecção de células apoptóticas (SHLOMOVITZ *et al.*, 2019). Os corpos apoptóticos são prontamente reconhecidos e fagocitados por macrófagos e outras células imunes. Em consequência, há uma eliminação eficiente das células mortas sem a liberação do conteúdo intracelular para o meio extracelular, prevenindo a ativação do sistema imunológico (PARK *et al.*, 2023). A apoptose, portanto, não apenas elimina as células tumorais de maneira eficaz, mas também ajuda a preservar o tecido

circundante, reduzindo o potencial de lesão colateral em células não malignas e minimizando efeitos adversos (PARK *et al.*, 2023).

A necrose é, tradicionalmente, descrita como uma forma de morte celular não programada, resultante de injúrias físicas, químicas ou biológicas. Neste processo, há comprometimento rápido da integridade da membrana plasmática, levando à liberação do conteúdo intracelular para o ambiente extracelular, resultando em um processo inflamatório (MÉRY *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2023). A necrose tumoral é um indicador prognóstico crucial no tratamento de OS, sendo, frequentemente, utilizada para avaliar a resposta do tumor à quimioterapia neoadjuvante (LOZANO-CALDERÓN *et al.*, 2023). No OS, a extensão da necrose tumoral após o tratamento inicial está fortemente correlacionada com as taxas de sobrevivência e a possibilidade de controle local da doença (RICHARDSON *et al.*, 2023). Esse parâmetro é tipicamente avaliado histologicamente após a ressecção cirúrgica do tumor, onde a porcentagem de células tumorais necróticas é medida para determinar a eficácia do tratamento quimioterápico. Uma alta taxa de necrose, geralmente superior a 90%, é considerada uma resposta quimioterápica favorável e está associada a um melhor prognóstico (RICHARDSON *et al.*, 2023). Pacientes que apresentam essa resposta têm uma menor probabilidade de recidiva local e metástase, traduzindo-se em uma sobrevida mais longa. Em contrapartida, uma baixa taxa de necrose (<90%) sugere uma resistência do tumor à quimioterapia inicial e está associada a um pior prognóstico (RICHARDSON *et al.*, 2023). Portanto, um composto como o POH que aumente a necrose tumoral é interessante para o tratamento de OS.

A necroptose é uma forma de morte celular programada distinta da apoptose, resultando em ruptura da membrana celular e liberação de conteúdo intracelular, desencadeando uma resposta inflamatória (PENG *et al.*, 2022). A necroptose ocorre por meio de um mecanismo bem regulado e dependente da sinalização de proteínas específicas, como RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1), RIPK3 e MLKL (Proteína semelhante ao domínio da quinase de linhagem mista) (PARK *et al.*, 2023). Este tipo de morte celular é mediado por uma cascata sinalizadora que, ao contrário da apoptose, não requer caspases, as quais são frequentemente desativadas ou inibidas em células tumorais resistentes a apoptose (PARK *et al.*,

2023; PENG *et al.*, 2022). Estudos recentes indicam que a necroptose pode representar uma estratégia alternativa promissora para superar a resistência a fármacos em células tumorais, particularmente em casos onde as vias apoptóticas estão comprometidas, como no caso do OS (HUA *et al.*, 2022). Células tumorais frequentemente desenvolvem resistência à quimioterapia. Esse processo envolve inativação de componentes-chave das vias de apoptose, como mutações em genes de caspases, superexpressão de proteínas antiapoptóticas (como Bcl-2), ou perda de função em receptores de morte (ZANG *et al.*, 2022). A necroptose, ao operar de forma independente das caspases e utilizar proteínas como RIPK1 e RIPK3, oferece uma via alternativa que contorna esses bloqueios apoptóticos (LI *et al.*, 2016; ZANG *et al.*, 2022).

Outro aspecto interessante da necroptose é seu potencial de estimular uma resposta imune antitumoral. A liberação de conteúdo celular, incluindo DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos), durante a necroptose, pode provocar uma série de respostas imunes. Por exemplo, a ativação da imunidade inata e adaptativa, opsonização e fagocitose de células tumorais em processo de morte celular (ZANG *et al.*, 2022). Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a ativação da necroptose pode induzir a morte celular em linhagens tumorais resistentes a apoptose, particularmente em tumores sólidos, onde a resistência a drogas é prevalente (QIN *et al.*, 2019). Por exemplo, a combinação de agentes que inibem a apoptose com indutores específicos de necroptose tem mostrado potencial em eliminar células tumorais que não respondem à terapia tradicional (QIN *et al.*, 2019; ZANG *et al.*, 2022).

A detecção de necroptose *in vitro* frequentemente utiliza a marcação dupla com Anexina V e iodeto de propídio (PI) para distinguir células em diferentes estados de morte celular. No entanto, o uso desses marcadores não é específico para necroptose e devendo ser complementado com outras análises (PIETKIEWICZ *et al.*, 2015; ZHU E WU, 2024). Uma célula que se apresenta positiva para Anexina V e PI (Anexina V+/PI+) pode estar em um estágio avançado de necroptose, uma vez que, durante esse processo, há um aumento progressivo na permeabilidade da membrana (SMITH *et al.*, 2024). Essa marcação dupla, portanto, serve como um indicativo geral de morte celular que não é estritamente apoptótica, mas sim uma

morte celular lítica onde ocorre perda de integridade da membrana. Em experimentos que visam confirmar a necroptose, a marcação Anexina V+/PI+ é geralmente acompanhada pela presença de sinais de ativação de proteínas específicas da via de necroptose, como RIPK1, RIPK3 e MLKL fosforilado (ZHU E WU, 2024). Portanto, estudos complementares são necessários para confirmar, de forma conclusiva, a indução de necroptose pelos compostos POH e AP.

No experimento com a linhagem celular U2-OS, a ausência de aumento significativo em apoptose e necrose pode ser atribuída a limitações inerentes ao ensaio de citometria com marcação de Anexina V e PI. Observou-se uma marcação elevada para ambos os marcadores mesmo no grupo controle. Isso sugere que o processamento das amostras, especialmente a dissociação celular com agentes enzimáticos como tripsina ou TrypLE, pode ter gerado um estresse de membrana. Esse tipo de estresse pode provocar uma exposição transitória de PS na superfície celular, resultando em sinal positivo para Anexina V mesmo em células viáveis (BUNDSCHERER *et al.*, 2013). Esses achados reforçam a necessidade de cautela na interpretação dos resultados e indicam a importância de otimizar as condições de preparo da amostra para reduzir potenciais artefatos que possam comprometer a precisão da análise de morte celular.

## **5.5 ANÁLISE DA INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO**

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) é um marcador crítico para avaliar o estresse oxidativo e seus efeitos citotóxicos, especialmente em células tumorais, onde altos níveis de EROS podem induzir morte celular (AFZAL *et al.*, 2023). Neste estudo, a avaliação do estresse oxidativo foi realizada nas células tumorais MG-63 e U2-OS utilizando o marcador fluorescente H2CMDCFA por citometria de fluxo. A análise da intensidade de fluorescência entre os grupos controle e tratados revelou variações significativas na produção de EROS, indicativas de diferentes níveis de estresse oxidativo induzido. Durante o período de 1 hora e 30 minutos de exposição em células MG-63, todos os tratamentos induziram um aumento na produção de EROS, com destaque para o AP e POH, que resultaram em elevações mais acentuadas nos níveis de EROS. A combinação do POH com cisplatina, fez aumentar a produção de EROS quando comparado a cisplatina isolada. Já na linhagem U2-OS, seguindo o mesmo protocolo de

exposição que a célula MG-63, somente o grupo do AP induziu produção de EROS de forma significativa.

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de EROS e a capacidade antioxidante das células para neutralizar ou reparar os danos causados por essas moléculas (JOMOVA *et al.*, 2023). Os radicais livres como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ), são produzidas como subprodutos normais do metabolismo celular, especialmente nas mitocôndrias durante a respiração celular (AFZAL *et al.*, 2023). Em condições fisiológicas normais, as células possuem mecanismos de defesa antioxidante, como enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e moléculas antioxidantes (glutathione, vitaminas C e E), que mantêm os níveis de EROS sob controle (JOMOVA *et al.*, 2023). Entretanto, fatores como exposição a quimioterápicos podem levar ao aumento excessivo de EROS ou à redução da capacidade antioxidante celular (AFZAL *et al.*, 2023). Quando as EROS se acumulam em excesso, elas podem reagir com componentes celulares essenciais, como lipídios, proteínas e DNA, causando danos que afetam a estrutura e a função celular. Esse dano oxidativo pode comprometer a integridade celular, alterar vias de sinalização e, em última instância, levar à apoptose ou necrose, dependendo da gravidade do estresse oxidativo (AFZAL *et al.*, 2023; JOMOVA *et al.*, 2023).

As EROS desempenham um papel dual na resposta ao tratamento do OS. Por um lado, a geração de EROS é uma estratégia usada na quimioterapia para induzir danos celulares e promover citotoxicidade. Por outro, níveis elevados de EROS podem estimular a resistência ao tratamento, ativando mecanismos de defesa antioxidante nas células tumorais (HEBERLE *et al.*, 2024). Estratégias que aumentam a produção de EROS ou amplificam a citotoxicidade induzida por EROS podem ser exploradas para tratamentos antitumorais. Compreender a interação entre EROS e OS pode abrir novas possibilidades terapêuticas (NAKAMURA *et al.*, 2021; HEBERLE *et al.*, 2024).

Neste estudo, a cisplatina mostrou efeito limitado na indução de EROS na concentração de  $IC_{50}$  após 1 hora e 30 minutos de exposição. No entanto, sabe-se que a cisplatina é capaz de induzir a produção de EROS por meio de danos ao DNA mitocondrial, o que compromete a síntese de proteínas envolvidas na cadeia

de transporte de elétrons (NAKAMURA *et al.*, 2021). É importante destacar que o efeito da cisplatina na produção de EROS é influenciado tanto pelo tempo quanto pela concentração de exposição (FLOREA E BÜSSELBERG, 2011). Nossos experimentos internos corroboraram essa observação, mostrando que exposições mais prolongadas, como 24 horas, resultam em um aumento mais acentuado na produção de EROS induzida pela cisplatina (dados não mostrados). Portanto, os protocolos para avaliar a produção de EROS *in vitro* podem variar conforme o composto e o tipo celular em estudo (FLOREA E BÜSSELBERG, 2011).

A diferença na resposta das linhagens MG-63 e U2-OS à indução de EROS pode estar associada a variações nos mecanismos celulares de estresse oxidativo e peroxidação lipídica, conforme descrito na literatura. O impacto de compostos bioativos sobre a produção de EROS e peroxidação lipídica pode depender do tipo celular e de suas características intrínsecas, como perfil metabólico e capacidade antioxidante (BOROVIĆ *et al.*, 2024). No caso do OS, enquanto alguns tratamentos promovem a indução de estresse oxidativo como mecanismo antitumoral, a extensão desse efeito pode ser modulada por fatores específicos de cada linhagem celular. A menor indução de EROS pelo POH observada na U2-OS em comparação com a MG-63 pode indicar diferenças na regulação redox, na atividade de enzimas antioxidantes ou na capacidade de adaptação ao estresse oxidativo (BOROVIĆ *et al.*, 2024).

Existem poucos dados na literatura sobre a atividade do POH na produção de EROS e, até o momento, nenhum relato para AP. Paduch e colaboradores (2016) verificou que em células humanas de adenocarcinoma de cólon HT29, o POH não teve efeito na produção de EROS. No entanto, Ma e colaboradores (2016) verificou que o POH reduziu a expressão de EROS induzido por hipóxia na linhagem de câncer de cólon HCT116. Nesse contexto, os achados do presente estudo representam uma contribuição relevante para a compreensão dos efeitos citotóxicos e dos mecanismos de ação do POH e, especialmente, do AP em células tumorais. Além disso, destacam o estresse oxidativo como um possível mecanismo envolvido na atividade desses compostos, um aspecto ainda pouco explorado na literatura em relação a esses monoterpêneos.

## 5.6 ANÁLISE DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

A proteína inflamatória de macrófago-1- $\beta$  (MIP-1  $\beta$ ) desempenha um papel crucial no recrutamento de leucócitos, incluindo monócitos, células T e células natural killer (NK), para o microambiente tumoral. Dessa forma, MIP-1  $\beta$  frequentemente promove um ambiente inflamatório que favorece o crescimento e a invasividade do tumor (CHEN *et al.*, 2019). Dessa forma, níveis elevados de MIP-1 $\beta$  em células tumorais podem contribuir para um microambiente pró-tumoral, favorecendo a evasão imunológica e a proliferação celular. Baghel e colaboradores (2016) demonstraram que MIP-1 $\beta$  potencializa a invasão celular e metástase no câncer de mama através da regulação do gene *MYO3A*. Portanto, a redução da expressão de MIP-1 $\beta$  pode diminuir o recrutamento de células pró-inflamatórias, alterando o perfil imunológico do microambiente tumoral e criando condições menos favoráveis para a progressão do OS. Este efeito pode limitar o recrutamento de células imunes que, no contexto tumoral, tipicamente auxiliam na progressão da doença, como os macrófagos do tipo M2, conhecidos por promover um ambiente anti-inflamatório e favorável ao tumor (CHEN *et al.*, 2019). A redução de MIP-1 $\beta$ , portanto, poderia contribuir para a reprogramação do microambiente tumoral, criando um contexto menos favorável à sobrevivência e à proliferação das células tumorais. Tal efeito é particularmente relevante em OS, onde o microambiente é frequentemente marcado por inflamação crônica, o que está associado à progressão e resistência tumoral (HABBERSTAD *et al.*, 2022). A redução de MIP-1 $\beta$  com POH e AP sugere ainda que esses compostos podem atuar como moduladores imunológicos específicos, além de seus efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos previamente descritos. Essa modulação imunológica pode ser aproveitada em estratégias de terapia combinada, em que o uso de POH ou AP complementar a imunoterapia ou quimioterapia convencional, aumentando a resposta imune contra o tumor.

A IL-6 possui uma forte atividade pró-tumorigênica, devido aos seus múltiplos efeitos em processos críticos como a proliferação e sobrevivência de células tumorais, angiogênese e inflamação (ORANGE *et al.*, 2023). No contexto do metabolismo ósseo, a IL-6 estimula a expressão de Cox-2 em osteoblastos e osteoclastos, aumentando a produção de prostaglandina E2 (PGE2) (ARA E

DECLERCK, 2010). PGE2 atua como mediador da ativação dos osteoclastos ao elevar a expressão de RANKL nos osteoblastos e de RANK nos osteoclastos. Além disso, IL-6 induz a expressão dos receptores de PGE2 (EP2 e EP4) em osteoblastos. Esse efeito cria um ciclo de retroalimentação no qual mais IL-6 promove a produção de PGE2, que por sua vez estimula a expressão de IL-6, aumentando a osteólise e favorecendo o ambiente tumoral (ARA E DECLERCK, 2010).

A IL-6 também estimula a proliferação e a sobrevivência das células tumorais por meio da ativação de vias de sinalização como JAK/STAT3, MAPK, e PI3K/AKT que são essenciais para a progressão tumoral (ARA E DECLERCK, 2010). A ativação persistente dessa via pode levar a uma resistência aumentada à apoptose, favorecendo a expansão das células tumorais e contribuindo para um fenótipo mais agressivo. A IL-6 também participa da regulação da angiogênese, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos, facilitando o crescimento tumoral e a possibilidade de invasão e metástase (ORANGE *et al.*, 2023).

No que diz respeito à inflamação, a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que contribui para o estabelecimento de um microambiente tumoral inflamatório. Este microambiente sustenta a proliferação celular, o recrutamento de células imunossupressoras e a modulação de outras moléculas de sinalização envolvidas no crescimento tumoral (ORANGE *et al.*, 2023). Essa inflamação crônica, mediada em parte pela IL-6, cria um ciclo de retroalimentação no qual o tumor manipula o sistema imunológico e o microambiente a seu favor, favorecendo a progressão da doença (ORANGE *et al.*, 2023).

Os resultados obtidos com as linhagens de OS MG-63 e U2-OS, em que houve o aumento da IL-6 pode ser interpretado como uma resposta de estresse celular, ativada por mecanismos de sobrevivência e resistência ao dano induzido pelo tratamento. Esse aumento pode contribuir para um microambiente pró-tumoral, favorecendo a sobrevivência de subpopulações resistentes ao tratamento e potencialmente promovendo um estado inflamatório crônico. Esses eventos facilitam a progressão e a invasão tumoral, assim como é observado no tratamento com cisplatina em diversos tipos de câncer (ORANGE *et al.*, 2023; SONI *et al.*, 2024).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória que atua amplamente em processos como inflamação, apoptose, proliferação celular e remodelamento ósseo (ZHOU *et al.*, 2022). No OS, o TNF- $\alpha$  pode influenciar a progressão tumoral, criando um microambiente inflamatório que facilita o crescimento e a sobrevivência das células tumorais. Estes eventos são dependentes do recrutamento de células inflamatórias que podem liberar mediadores inflamatórios adicionais e fatores de crescimento que sustentam a proliferação das células tumorais (ZHOU *et al.*, 2022). Além disso, o TNF- $\alpha$  pode estimular a expressão de outras citocinas e quimiocinas, criando um ciclo inflamatório contínuo que favorece a sobrevivência tumoral e a angiogênese (ZHOU *et al.*, 2022).

O TNF- $\alpha$  também pode influenciar diretamente a capacidade das células de OS de invadir tecidos adjacentes e de migrar para locais distantes, como os pulmões (KATO *et al.*, 2015). Este fator regula a expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs), enzimas que degradam a matriz extracelular e facilitam a invasão celular (LIU *et al.*, 2016). Ao estimular a produção de MMPs, o TNF- $\alpha$  faz com que as células tumorais invadam mais facilmente a matriz extracelular em volta do tumor, facilitando a disseminação para órgãos distantes (LIU *et al.*, 2016). Além disso, o TNF- $\alpha$  é um potente modulador da atividade osteoclástica, promovendo a reabsorção óssea através da ativação dos osteoclastos (ZHOU *et al.*, 2022). Esse processo de reabsorção, intensificado pela ação do TNF- $\alpha$ , resulta na formação de áreas de fragilidade na estrutura óssea, o que, por sua vez, facilita a invasão e o crescimento das células tumorais no tecido adjacente (ZHOU *et al.*, 2022).

Portanto, a redução de TNF- $\alpha$  observada na linhagem MG-63 em resposta aos tratamentos com POH e AP, e na linhagem U2-OS especificamente com AP, destaca-se como um achado relevante para o tratamento do OS. Esses resultados sugerem que ambos os compostos podem modular o microambiente tumoral de maneira a limitar os processos inflamatórios e osteolíticos mediados por TNF- $\alpha$ , o que pode reduzir a progressão tumoral e a degradação óssea associadas a essa patologia.

A redução da interleucina-5 (IL-5) em células tumorais pode influenciar significativamente o microambiente tumoral e a resposta imunológica antitumoral

(ZAYNAGETDINOV *et al.*, 2015). A IL-5 é uma citocina que regula a ativação e a sobrevivência de eosinófilos, células do sistema imunológico envolvidas em processos inflamatórios e na defesa contra patógenos (BRIUKHOVETSKA *et al.*, 2021). Dessa forma, a diminuição dos níveis de IL-5 nas células tumorais pode ter efeitos antitumorais indiretos. Em certos contextos, a redução de IL-5 pode diminuir a infiltração de eosinófilos, que, embora tradicionalmente associados à resposta imune, também podem promover o crescimento tumoral e o remodelamento do microambiente. Dessa forma, contribuem para a angiogênese e a supressão de outras respostas imunes antitumorais (ZAYNAGETDINOV *et al.*, 2015). Assim, a redução de IL-5 poderia desfavorecer um ambiente pró-tumorigênico, tornando o microambiente menos propício ao suporte do crescimento tumoral e menos protegido da resposta imunológica efetiva.

Além disso, a IL-5 pode influenciar a liberação de outros mediadores inflamatórios que promovem a proliferação e a sobrevivência das células cancerígenas (ZAYNAGETDINOV *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2022). A redução de IL-5, portanto, pode contribuir para a diminuição dos processos inflamatórios e de suporte tumoral dentro do microambiente. Isso reduz o recrutamento de células que podem facilitar a evasão imunológica e a resistência a terapias (LIU *et al.*, 2022). A redução de IL-5 observada após o tratamento com POH e AP nas linhagens tumorais representa uma evidência adicional da potencial imunomodulação que esses compostos podem exercer no contexto do OS.

A redução de interleucina-9 (IL-9) em células tumorais pode ter implicações relevantes no microambiente tumoral e na dinâmica de progressão e sobrevivência do câncer (BICK *et al.*, 2024). A IL-9 é uma citocina multifuncional, tradicionalmente associada à resposta imunológica contra parasitas e ao desenvolvimento de doenças alérgicas. No entanto, estudos recentes sugerem que ela também desempenha papéis diversos em diferentes tipos de câncer, podendo ter tanto efeitos pró-tumorigênicos quanto antitumorais, dependendo do contexto tumoral (BICK *et al.*, 2024).

Em alguns tumores, a IL-9 atua como fator de sobrevivência e proliferação celular, contribuindo para a progressão tumoral. Ela pode estimular vias de sinalização que favorecem a resistência à apoptose, promovem o crescimento celular e aumentam a produção de outras citocinas e quimiocinas que criam um

ambiente favorável à sobrevivência das células tumorais. A diminuição de IL-9 pode, então, ajudar a reverter a imunossupressão dentro do microambiente tumoral, favorecendo uma resposta imune mais ativa contra o tumor (BICK *et al.*, 2024). No entanto, alguns estudos indicam que a IL-9 pode desempenhar um papel significativo na imunoterapia contra o câncer, exibindo uma robusta função antitumoral em modelos de melanoma. Isso sugere que a IL-9 pode mediar respostas imunológicas eficazes contra certos tipos de câncer (WAN *et al.*, 2020). Essa dualidade ressalta a necessidade de uma compreensão mais detalhada dos mecanismos pelos quais a IL-9 modula o microambiente tumoral e a resposta imunológica, com o objetivo de explorar seu potencial terapêutico de maneira precisa e eficaz. Estudos adicionais são essenciais para interpretar com maior clareza a diminuição da produção de IL-9 na linhagem MG-63 e o aumento observado na linhagem U2-OS após o tratamento com POH e AP. Além disso, é necessário avaliar como essas respostas específicas podem influenciar o comportamento tumoral e a efetividade de estratégias terapêuticas no OS.

A IL-1ra, ou antagonista do receptor de interleucina-1, é uma proteína que atua como regulador da resposta inflamatória através da modulação da atividade das interleucinas inflamatórias IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (XU *et al.*, 2023). A IL-1ra exerce sua função ao se ligar ao receptor da IL-1 nas células-alvo, bloqueando a interação da IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  com esse receptor e, conseqüentemente, inibindo sua ação (XU *et al.*, 2023). Esse antagonismo é importante para prevenir respostas inflamatórias excessivas que podem levar a danos teciduais e contribuir para a progressão de diversas doenças inflamatórias e autoimunes (XU *et al.*, 2023). O aumento de IL-1ra em células normais, como foi visto na célula OH após tratamento com POH e AP, ao reduzir a inflamação, pode contribuir de maneira benéfica para o tratamento do OS, e outros tipos de câncer, que possuem um microambiente inflamatório exacerbado (LANDUZZI *et al.*, 2024). Além disso, como o OS envolve um processo de destruição óssea associado à atividade dos osteoclastos, a IL-1ra pode ajudar a proteger o tecido ósseo ao diminuir a atividade das IL-1 pró-inflamatórias, que estimulam a reabsorção óssea (XU *et al.*, 2023). Dessa forma, o aumento de IL-1ra em células normais pode reduzir a destruição do osso adjacente ao tumor, diminuindo sintomas como dor e enfraquecimento ósseo e, potencialmente, limitando a progressão do OS.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória com capacidade de suprimir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e de limitar a ativação excessiva de células imunes (CARLINI *et al.*, 2023). Assim, quando seus níveis estão reduzidos em células normais, pode haver um aumento na atividade imune e inflamatória, o que pode ter efeitos tanto benéficos quanto adversos no contexto do câncer (CARLINI *et al.*, 2023). A redução de IL-10 pode favorecer a ativação do sistema imunológico contra o tumor, ao reduzir os mecanismos de supressão imunológica que normalmente limitam a resposta imune. Com menos IL-10 no microambiente, células imunes como linfócitos T e células natural killer (NK) podem atuar mais agressivamente contra as células tumorais, aumentando a citotoxicidade e a capacidade do sistema imunológico de reconhecer e eliminar o câncer (IYER E CHENG, 2012). Entretanto, a diminuição de IL-10 também pode ter efeitos adversos, pois pode desencadear uma inflamação descontrolada no tecido normal ao redor do tumor. A ausência de IL-10 pode levar a uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Em consequência, um ambiente de inflamação crônica é estabelecido, o que pode danificar tecidos saudáveis e, paradoxalmente, favorecer a progressão tumoral em alguns contextos (IYER E CHENG, 2012). Estudos adicionais são necessários para uma interpretação mais aprofundada da redução na produção de IL-10 em células normais induzida por POH e AP, bem como do aumento na produção de IL-10 na linhagem U2-OS após tratamento com AP. Dessa forma, será possível elucidar os mecanismos imunomoduladores desses compostos e suas implicações terapêuticas no osteossarcoma.

A proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) desempenha um papel crucial no recrutamento de monócitos, macrófagos e outras células imunológicas para locais de inflamação. No OS, essa quimiocina contribui para a infiltração de macrófagos associados ao tumor (TAMs), que frequentemente se polarizam para o fenótipo M2, associado à promoção do crescimento tumoral, imunossupressão e metástase (WANG *et al.*, 2022). Níveis elevados de MCP-1 estão associados ao aumento da infiltração de TAMs, à angiogênese e à osteólise, fatores que favorecem a progressão do OS e resultam em um prognóstico desfavorável (MULHOLLAND *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2022).

A redução de MCP-1 no microambiente tumoral tem o potencial de alterar essas dinâmicas de maneira significativa. Um dos principais efeitos seria a modulação dos TAMs, reduzindo o recrutamento de monócitos e macrófagos para o local do tumor. Consequentemente, isso diminuiria a presença de macrófagos M2 pró-tumorais. Além disso, a redução de MCP-1 pode limitar a supressão imunológica mediada pelos TAMs, fortalecendo a infiltração e a ativação de linfócitos T citotóxicos e outras células imunes efetoras no microambiente tumoral (WANG *et al.*, 2022). Outro impacto relevante da redução de MCP-1 seria a inibição da angiogênese, reduzindo a formação de vasos, limitando o crescimento tumoral e dificultando a disseminação metastática (LIU *et al.*, 2020). No que diz respeito ao microambiente ósseo, a MCP-1 desempenha um papel fundamental na osteoclastogênese, promovendo a destruição óssea característica do osteossarcoma. A redução de MCP-1 poderia mitigar essa atividade osteoclástica, preservando a integridade óssea e dificultando a invasão tumoral (MULHOLLAND *et al.*, 2019). Além disso, a redução de MCP-1 reduz o risco de metástase, pois a MCP-1 facilita a formação de nichos metastáticos, como os pulmões, por meio do recrutamento de células imunológicas pró-tumorais (MULHOLLAND *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2022).

Os resultados observados com compostos como POH e AP, que demonstram a capacidade de reduzir MCP-1, destacam o potencial dessa abordagem terapêutica. A combinação da inibição de MCP-1 com outras estratégias, como imunoterapia ou quimioterapia, pode maximizar os benefícios do tratamento. Por exemplo, a redução de MCP-1 poderia aumentar a eficácia de bloqueadores de checkpoint imunológico ao reduzir a imunossupressão no microambiente tumoral. Além disso, integrar a inibição de MCP-1 com agentes que modulam o metabolismo ósseo, como bifosfonatos ou inibidores de RANKL, pode limitar ainda mais a destruição óssea e melhorar os resultados clínicos.

A interleucina-8 (IL-8) desempenha um papel multifacetado no desenvolvimento e progressão do OS, influenciando diretamente o microambiente tumoral, a angiogênese, e a invasão celular. Essa quimiocina pró-inflamatória, comumente superexpressa em diversos tipos de câncer, está associada à agressividade do OS e à piora do prognóstico em pacientes (TATSUNO *et al.*, 2024). A IL-8 promove a angiogênese ao estimular diretamente a proliferação e migração de células

endoteliais, e ao regular positivamente a expressão de fatores angiogênicos, como o VEGF (TATSUNO *et al.*, 2024). Além disso, a IL-8 desempenha um papel na invasão e metastatização ao ativar vias de sinalização, como MAPK e NFκB, que favorecem a motilidade e a proliferação celular (JOSHI *et al.*, 2023). No microambiente ósseo, a IL-8 pode estimular a atividade dos osteoclastos, contribuindo para a destruição óssea característica do OS e agravando a progressão da doença (XU *et al.*, 2023). Além disso, a IL-8 exerce um efeito imunomodulador, recrutando neutrófilos e outras células imunossupressoras para o microambiente tumoral. Esse recrutamento cria uma barreira que dificulta a ação de células imunológicas efetoras, como linfócitos T citotóxicos e células NK (TIAN *et al.*, 2023). Esse efeito imunossupressor favorece a imunoevasão, permitindo a progressão do tumor. Portanto, a redução dos níveis de IL-8 no microambiente tumoral, como ocorreu com o tratamento com POH na linhagem U2-OS, representa uma estratégia promissora. A redução de IL-8 poderia remodelar o microambiente tumoral, dificultar a progressão do tumor e aumentar a eficácia das abordagens terapêuticas existentes, merecendo maior atenção em estudos futuros para o desenvolvimento de terapias direcionadas.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha um papel central no desenvolvimento e progressão do OS, sendo um dos principais reguladores da angiogênese, proliferação tumoral e metástase (ASSI *et al.*, 2021). A superexpressão de VEGF no OS está associada a um microambiente tumoral altamente vascularizado, o que proporciona o crescimento do tumor primário. Além disso, o VEGF promove a permeabilidade vascular, facilitando a disseminação de células tumorais para órgãos distantes (ELEBIYO *et al.*, 2022). O papel do VEGF na modulação do microambiente ósseo também é relevante, pois interage com fatores como o bFGF para estimular a remodelação óssea, favorecendo a invasão tumoral e a destruição do tecido ósseo adjacente (HU E OLSEN, 2016). Dessa forma, a redução de VEGF no tratamento do OS apresenta-se como uma abordagem terapêutica promissora, com impactos significativos na inibição da angiogênese, na modificação do microambiente tumoral e na redução da disseminação metastática.

Os benefícios da redução de VEGF também se estendem à potencialização de terapias combinadas. A inibição de VEGF pode normalizar a vasculatura tumoral,

melhorando a entrega de quimioterápicos ao tumor e aumentando a eficácia de imunoterapias ao facilitar a infiltração de células imunes no microambiente tumoral (ASSI *et al.*, 2021). Estratégias terapêuticas como o uso de inibidores de VEGF, incluindo o bevacizumabe, e inibidores de tirosina quinase, como o sunitinibe e o pazopanibe, têm mostrado eficácia em reduzir os níveis de VEGF e sua sinalização, impactando significativamente na progressão do OS (ASSI *et al.*, 2021). No entanto, desafios permanecem, incluindo a adaptação do tumor à supressão angiogênica. Nesse contexto, a redução de VEGF induzida pelo tratamento com POH surge como uma abordagem promissora, com potencial para modular a angiogênese e o microambiente tumoral de forma eficaz. Esse efeito pode não apenas limitar o crescimento do tumor primário, mas também reduzir a disseminação metastática. Neste sentido, o POH destaca-se como uma estratégia terapêutica relevante no manejo do OS, especialmente quando integrado a tratamentos combinados que potencializem sua ação.

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam uma variabilidade na resposta aos tratamentos com POH e AP entre as linhagens celulares de OS MG-63 e U2-OS. Isso indica que esses compostos apresentam potencial para aplicações personalizadas, dependendo do perfil molecular e biológico dos tumores. Contudo, algumas limitações precisam ser destacadas. O estudo foi realizado em modelos bidimensionais (2D), que, embora amplamente utilizados, não conseguem replicar completamente a complexidade do microambiente tumoral *in vivo*, como a interação tridimensional entre as células tumorais e o estroma. Essa limitação ressalta a necessidade de ampliar as investigações para modelos mais preditivos, como culturas tridimensionais (3D), que melhor representam a fisiologia do tumor.

Além disso, a biodisponibilidade e a seletividade do POH no microambiente tumoral permanecem desafios importantes. Estratégias como o uso de nanopartículas, exossomos ou outros sistemas de liberação controlada poderiam melhorar a eficácia do POH, direcionando-o ao sítio tumoral e minimizando potenciais efeitos em tecidos saudáveis. Outra limitação é a ausência de análises detalhadas do perfil molecular que poderiam identificar biomarcadores de resposta ao tratamento, permitindo uma abordagem mais personalizada e eficaz. Além disso, é fundamental investigar os mecanismos moleculares subjacentes às respostas

diferenciadas das linhagens MG-63 e U2-OS ao POH e AP. É necessário identificar as vias de sinalização específicas e potenciais biomarcadores envolvidos na resposta mediada por esses fármacos. Estudos combinando esses compostos com outras terapias, como quimioterapia convencional ou imunoterapia, também podem oferecer insights sobre o potencial sinérgico dessas abordagens.

Apesar das limitações, os resultados apresentados apontam para o potencial promissor do POH e AP no tratamento do OS em conjunto com fármacos convencionais, e abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e direcionadas.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **6.1 CONCLUSÕES**

O presente trabalho investigou os efeitos antitumorais do POH e de seu principal metabólito, o AP, nas linhagens celulares de OS, MG-63 e U2-OS. Os resultados obtidos demonstraram que tanto o POH quanto o AP foram capazes de reduzir a capacidade de migração e proliferação celular em ambas as linhagens. A combinação de POH com cisplatina reduziu de forma mais pronunciada a proliferação na linhagem U2-OS. Além disso, o POH causou parada do ciclo celular em G1 na linhagem U2-OS, enquanto o AP induziu esse efeito na linhagem MG-63. A combinação de POH com cisplatina, por sua vez, levou à parada do ciclo celular em G2. No contexto de morte celular, o POH demonstrou capacidade de induzir apoptose, necrose e, possivelmente, necroptose na linhagem MG-63, enquanto o AP promoveu apenas apoptose nessa linhagem. Ambos os compostos também induziram a produção de EROS na linhagem MG-63, com o POH apresentando um efeito mais acentuado. Já na linhagem U2-OS, somente o AP apresentou este efeito.

Além disso, o POH e o AP também exerceram efeitos imunomoduladores, influenciando a produção de citocinas e fatores relacionados ao microambiente tumoral. Ambos os compostos reduziram a produção de MIP-1b, IL-5, TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-10, enquanto aumentaram a produção de IL-6 e IL-1ra. O POH foi particularmente eficaz na redução da produção de IL-8 e VEGF, fatores associados à angiogênese e à progressão tumoral. Esses achados indicam que o POH e o AP têm o potencial de modular processos-chave no microambiente tumoral, como a

angiogênese, a inflamação e a interação com o sistema imunológico. Neste sentido, POH e AP podem contribuir para limitar a progressão do OS e a disseminação metastática.

## **6.2 PERSPECTIVAS**

Perspectivas devem incluir a utilização de modelos tridimensionais, como organoides tumorais e esferoides multicelulares, bem como estudos *in vivo*, para validar os achados obtidos e replicar a complexidade do microambiente tumoral. Essas abordagens permitirão uma melhor compreensão dos efeitos dos compostos no contexto fisiológico e da interação com o estroma tumoral. Além disso, estratégias inovadoras podem melhorar a biodisponibilidade e a entrega seletiva do POH. O uso de nanopartículas, exossomos ou outros sistemas de liberação controlada, podem potencializar seus efeitos terapêuticos, reduzindo toxicidades em tecidos saudáveis.

Outra linha promissora é a investigação da sinergia entre o POH e fármacos amplamente utilizados no tratamento do OS, como a cisplatina. Estudos que explorem combinações terapêuticas em diferentes esquemas e concentrações podem revelar abordagens mais eficazes para potencializar os efeitos antitumorais e reduzir a resistência ao tratamento. Adicionalmente, pesquisas que enfoquem a caracterização molecular de vias de sinalização moduladas por POH e AP poderiam identificar biomarcadores de resposta e novas oportunidades para terapia direcionada. Dessa forma, permitiriam uma abordagem mais personalizada e eficaz no manejo do OS. Essas iniciativas são fundamentais para traduzir os resultados obtidos neste trabalho em estratégias aplicáveis na clínica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS T.; DUTTA A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, v. 9, n. 6, p. 400-14, 2009.
2. ABOUZEID, S.; HIJAZIN, T.; LEWERENZ, L.; HÄNSCH, R.; SELMAR, D. The genuine localization of indole alkaloids in *Vinca minor* and *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, v. 168, p. 112110, 2019.
3. AFSHORDEL, S.; KERN, B.; CLASOHM, J.; KÖNIG, H.; PRIESTER, M.; WEISSENBERGER, J.; KÖGEL, D.; ECKERT, G. P. Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation--impact of Ras-/Rho-prenylation. *Pharmacological Research*, v. 91, p. 69-77, 2015.
4. AFZAL, S.; ABDUL MANAP, A. S.; ATTIQ, A.; ALBOKHADAIM, I.; KANDEEL, M.; ALHOJAILY, S. M. From imbalance to impairment: the central role of reactive oxygen species in oxidative stress-induced disorders and therapeutic exploration. *Frontiers in Pharmacology*, v. 14, p. 1269581, 2023.
5. ALASSAF, N.; ATTIA, H. Autophagy and necroptosis in cisplatin-induced acute kidney injury: Recent advances regarding their role and therapeutic potential. *Frontiers in Pharmacology*, v. 14, p. 1103062, 2023.
6. ALI ABDALLA, Y. O.; SUBRAMANIAM, B.; NYAMATHULLA, S.; SHAMSUDDIN, N.; ARSHAD, N. M.; MUN, K. S.; AWANG, K.; NAGOOR, N. H. Natural products for cancer therapy: A review of their mechanism of actions and toxicity in the past decade. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2022, p. 5794350, 2022.
7. AMERICAN CANCER SOCIETY. Chemotherapy and Other Drugs for osteosarcoma. 2020. Disponível em: <https://www.cancer.org>. Acesso em: 22 set. 2024.
8. AMERICAN CANCER SOCIETY. Oncogenes, tumor suppressor genes, and DNA repair genes. 2022. Disponível em: <https://amp.cancer.org>. Acesso em: 31 out. 2022.
9. AMERICAN CANCER SOCIETY. Survival rates for osteosarcoma. 2024. Disponível em: <https://www.cancer.org>. Acesso em: 22 set. 2024.
10. ARA, T.; DECLERCK, Y. A. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *European Journal of Cancer*, v. 46, n. 7, p. 1223-1231, 2010.

11. ARORA, R. D.; SHAIKH, H. Osteogenic sarcoma. In: STATPEARLS. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 26 jun. 2023.
12. ASSI, T.; WATSON, S.; SAMRA, B.; RASSY, E.; LE CESNE, A.; ITALIANO, A.; MIR, O. Targeting the VEGF pathway in osteosarcoma. *Cells*, v. 10, n. 5, p. 1240, 2021.
13. ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 20, p. 200–216, 2021.
14. BĂDILĂ, A. E.; RĂDULESCU, D. M.; NICULESCU, A.-G.; GRUMEZESCU, A. M.; RĂDULESCU, M.; RĂDULESCU, A. R. Recent advances in the treatment of bone metastases and primary bone tumors: an up-to-date review. *Cancers*, v. 13, n. 16, p. 4229, 2021.
15. BAGCI, O.; KURTGÖZ, S. Amplification of cellular oncogenes in solid tumors. *North American Journal of Medical Sciences*, v. 7, n. 8, p. 341-346, 2015.
16. BAGHEL, K. S.; TEWARI, B. N.; SHRIVASTAVA, R.; et al. Macrophages promote matrix protrusive and invasive function of breast cancer cells via MIP-1 $\beta$  dependent upregulation of MYO3A gene in breast cancer cells. *Oncoimmunology*, v. 5, n. 7, p. e1196299, 2016.
17. BAHAR M.E.; KIM H.J.; KIM, D.R. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Sig Transduct Target Ther*, v. 8, n. 455, 2023.
18. BALLATORI, S.; HINDS, P. Osteosarcoma: prognosis plateau warrants retinoblastoma pathway targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 1, p. 16001, 2016.
19. BARANYI M.; BUDAY L.; HEGEDŰS B. K-Ras prenylation as a potential anticancer target. *Cancer Metastasis*, v.39, n. 4, p. 1127-1141, 2020.
20. BARDON, S.; FOUSSARD, V.; FOURNEL, S.; LOUBAT, A. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Letters*, v. 181, n. 2, p. 187-194, 2002.

21. BARDON, S.; PICARD, K.; MARTEL, P. Monoterpenes inhibit cell growth, cell cycle progression, and cyclin D1 gene expression in human breast cancer cell lines. *Nutrition and Cancer*, v. 32, n. 1, p. 1–7, 1998.
22. BATISTA, A.C.B.; MORAES, J. A.; OLIVEIRA, B. R.; LIMA, V. H. S.; MARIANO, E. D.; KARANDE, S.; ROMASCO, T.; LEITE, P. E. C.; MOURÃO, C. F.; ALVES, G. G. Metabolic and regulatory pathways involved in the anticancer activity of perillyl alcohol: a scoping review of in vitro studies. *Cancers*, v. 16, n. 23, p. 4003, 2024.
23. BEHJATI, S.; GUNDEM, G.; WEDGE, D.; et al. Mutational signatures of ionizing radiation in second malignancies. *Nature Communications*, v. 7, p. 12605, 2016.
24. BICK, F.; BLANCHETOT, C.; LAMBRECHT, B. N.; SCHUIJS, M. J. A reappraisal of IL-9 in inflammation and cancer. *Mucosal Immunology*, 2024.
25. BOROVIĆ ŠUNJIĆ, S.; JAGANJAC, M.; VLAINIĆ, J.; HALASZ, M.; ŽARKOVIĆ, N. Lipid Peroxidation-Related Redox Signaling in Osteosarcoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, v. 25, n. 8, p. 4559.
26. BOTEZATU, A.; IANCU, I. V.; POPA, O.; et al. Mechanisms of oncogene activation. In: *New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis* [Internet]. InTech, 2016.
27. BRIUKHOVETSKA, D.; DÖRR, J.; ENDRES, S.; et al. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 21, p. 481–499, 2021.
28. BROADHEAD, M. L.; CLARK, J. C.; MYERS, D. E.; DASS, C. R.; CHOONG, P. F. The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review. *Sarcoma*, v. 2011, p. 959248, 2011.
29. BUNDSCHERER, A.; MALSY, M.; LANGE, R.; et al. Cell harvesting method influences results of apoptosis analysis by annexin V staining. *Anticancer Research*, v. 33, n. 8, p. 3201-3204, 2013.
30. CARLINI, V.; NOONAN, D. M.; ABDALALEM, E.; GOLETTI, D.; SANSONE, C.; CALABRONE, L.; ALBINI, A. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1161067, 2023.

31. CARLOS DE OLIVEIRA, R.; WILSON, S. E. Biological effects of mitomycin C on late corneal haze stromal fibrosis following PRK. *Experimental Eye Research*, v. 200, p. 108218, 2020.
32. CELLOSAURUS. MG-63. 2024. Disponível em: [www.cellosaurus.org](http://www.cellosaurus.org). Acesso em: 4 nov. 2024.
33. CELLOSAURUS. U-2OS. 2024. Disponível em: [www.cellosaurus.org](http://www.cellosaurus.org). Acesso em: 4 nov. 2024.
34. CERDA, S. R. et al. Enhancement of sterol synthesis by the monoterpene perillyl alcohol is unaffected by competitive 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. *Lipids*, v. 34, n. 6, p. 605–615, 1999.
35. CHAABANE, W.; USER, S. D.; EL-GAZZAH, M.; JAKSIK, R.; SAJJADI, E.; RZESZOWSKA-WOLNY, J.; LOS, M. J. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archives of Immunology and Therapy Experiment*, v. 61, n. 1, p. 43-58, 2013.
36. CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 58, n. 5, p. 235-263, 2017.
37. CHEN et al., Multi-range ERK responses shape the proliferative trajectory of single cells following oncogene induction. *Cell Reports*, v. 42, n. 3, 2023.
38. CHEN, T. C.; et al. The monoterpene perillyl alcohol: anticancer agent and medium to overcome biological barriers. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 12, p. 2167, 2021.
39. CHEN, X.; ZHANG, T.; SU, W.; et al. Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell Death and Disease*, v. 13, p. 974, 2022.
40. CHEN, Y.; SONG, Y.; DU, W.; et al. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *Journal of Biomedical Science*, v. 26, p. 78, 2019.
41. CHIAL, H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education*, v. 1, n. 1, p. 33, 2008.
42. CHOONG, P. F.; TEH, H. X.; TEOH, H. K.; ONG, H. K.; CHOO, K. B.; SUGII, S.; CHEONG, S. K.; KAMARUL, T. Heterogeneity of osteosarcoma cell lines

- led to variable responses in reprogramming. *International Journal of Medical Sciences*, v. 11, n. 11, p. 1154-1160, 2014.
43. CLARK S.S., et al. Anti-leukemia effect of perillyl alcohol in Bcr/Abl-transformed cells indirectly inhibits signaling through Mek in a Ras- and Raf-independent fashion. *Clin Cancer Res*, v. 9, n. 12, p.4494-504, 2003.
  44. CROWELL, P. L. et al. Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. *Biochemical Pharmacology*, v. 47, n. 8, p. 1405–1415, 1994.
  45. CUI, J.; DEAN, D.; HORNICEK, F. J.; et al. The role of extracellular matrix in osteosarcoma progression and metastasis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 39, p. 178, 2020.
  46. CUNHA, A.; SILVA, P. M. A.; SARMENTO, B.; QUEIRÓS, O. Targeting glucose metabolism in cancer cells as an approach to overcoming drug resistance. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 11, p. 2610, 2023.
  47. CZARNECKA, A. M.; SYNORADZKI, K.; FIRLEJ, W.; BARTNIK, E.; SOBCZUK, P.; FIEDOROWICZ, M.; GRIEB, P.; RUTKOWSKI, P. Molecular biology of osteosarcoma. *Cancers*, v. 12, n. 8, p. 2130, 2020.
  48. DA FONSECA, C. O.; KHANDELIA, H.; SALAZAR, M. D.; SCHÖNTHAL, A. H.; MEIRELES, O. C.; QUIRICO-SANTOS, T. Perillyl alcohol: dynamic interactions with the lipid bilayer and implications for long-term inhalational chemotherapy for gliomas. *Surgical Neurology International*, v. 7, p. 1, 2016.
  49. DAI, R.; LIU, M.; XIANG, X.; et al. Osteoblasts and osteoclasts: an important switch of tumour cell dormancy during bone metastasis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 41, p. 316, 2022.
  50. DAKAL, T. C.; DHABHAI, B.; PANT, A.; et al. Oncogenes and tumor suppressor genes: functions and roles in cancers. *MedComm*, v. 5, n. 6, p. e582, 2024.
  51. DANESI, R.; FOGLI, S.; INDRACCOLO, S.; et al. Druggable targets meet oncogenic drivers: opportunities and limitations of target-based classification of tumors and the role of molecular tumor boards. *ESMO Open*, v. 6, n. 2, p. 100040, 2021.
  52. DASARI, S.; NJIKI, S.; MBEMI, A.; YEDJOU, C. G.; TCHOUNWOU, P. B. Pharmacological effects of cisplatin combination with natural products in

- cancer chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 3, p. 1532, 2022.
53. DE AZEVEDO, J. W.; FERNANDES, T. A.; FERNANDES, J. V.; et al. Biology and pathogenesis of human osteosarcoma (Review). *Oncology Letters*, v. 19, n. 2, p. 1099-1116, 2020.
54. DESCHÊNES-SIMARD, X.; MALLESHAIAH, M.; FERBEYRE, G. Extracellular Signal-Regulated Kinases: One Pathway, Multiple Fates. *Cancers*, v. 16, n. 1, p. 95, 2024.
55. DI MARCO, M. V.; VOENA, C. Review: biological implications of oncogenic rearrangements in non-small cell lung cancer. *Precision Cancer Medicine*, v. 5, 2022.
56. DILLON M., et al. Progress on Ras/MAPK Signaling Research and Targeting in Blood and Solid Cancers. *Cancers*, v.13, n. 20, p.5059, 2021.
57. DUARTE, D.; VALE, N. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, v. 3, p. 100110, 2022.
58. ECACC. MG-63. 2024. Disponível em: [www.culturecollections.org.uk](http://www.culturecollections.org.uk). Acesso em: 26 nov. 2024.
59. EL-NAGGAR, A. M.; CLARKSON, P. W.; NEGRI, G. L.; et al. HACE1 is a potential tumor suppressor in osteosarcoma. *Cell Death and Disease*, v. 10, p. 21, 2019.
60. ELEBIYO, T. C.; ROTIMI, D.; EVBUOMWAN, I. O.; et al. Reassessing vascular endothelial growth factor (VEGF) in anti-angiogenic cancer therapy. *Cancer Treatment and Research Communications*, v. 32, p. 100620, 2022.
61. ELGUNDI, Z.; PAPANICOLAOU, M.; MAJOR, G.; et al. Cancer metastasis: the role of the extracellular matrix and the heparan sulfate proteoglycan perlecan. *Frontiers in Oncology*, v. 9, p. 1482, 2020.
62. ENGELAND, K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death and Differentiation*, v. 29, p. 946–960, 2022.
63. FERROZ, W.; SHEIKH, A. M. A. Exploring the multiple roles of guardian of the genome: P53. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, v. 21, p. 49, 2020.

64. FERRARI, V.; HELISSEY, C. Revolutionizing localized lung cancer treatment: neoadjuvant chemotherapy plus immunotherapy for all? *Journal of Clinical Medicine*, v. 13, n. 9, p. 2715, 2024.
65. FERRI, N.; ARNABOLDI, L.; ORLANDI, A.; et al. Effect of S(-) perilllic acid on protein prenylation and arterial smooth muscle cell proliferation. *Biochemical Pharmacology*, v. 62, n. 12, p. 1637-1645, 2001.
66. FISCHER, J. DE S. DA G. et al. Dynamic proteomic overview of glioblastoma cells (A172) exposed to perillyl alcohol. *Journal of Proteomics*, v. 73, n. 5, p. 1018–1027, 2010.
67. FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*, v. 3, n. 1, p. 1351-1371, 2011.
68. FU, H.; WU, Y.; CHEN, J.; HU, X.; WANG, X.; XU, G. Exosomes and osteosarcoma drug resistance. *Frontiers in Oncology*, v. 13, p. 1133726, 2023.
69. GAO, Y. M.; PEI, Y.; ZHAO, F. F.; WANG, L. Osteoclasts in osteosarcoma: mechanisms, interactions, and therapeutic prospects. *Cancer Management and Research*, v. 15, p. 1323-1337, 2023.
70. GAYAN, S.; DOSHI, S.; DEY, T. Synthetic migrastatic: a new class of anticancer drug. In: CHAKRABORTI, S. (ed.). *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Therapeutic Aspects*. Springer, 2022.
71. GHAFOURI-FARD, S.; KHOSHBAKHT, T.; HUSSEN, B. M.; et al. A review on the role of cyclin dependent kinases in cancers. *Cancer Cell International*, v. 22, n. 1, p. 325, 2022.
72. GHALEHBANDI, S.; YUZUGULEN, J.; PRANJOL, M. Z. I.; POURGHOLAMI, M. H. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *European Journal of Pharmacology*, v. 949, p. 175586, 2023.
73. GREGORY, G. L.; COPPLE, I. M. Modulating the expression of tumor suppressor genes using activating oligonucleotide technologies as a therapeutic approach in cancer. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, v. 31, p. 211-223, 2022.
74. HABBERSTAD, R.; AASS, N.; MOLLNES, T. E.; DAMÁS, J. K.; BRUNELLI, C.; ROSSI, R.; GARCIA-ALONSO, E.; KAASA, S.; KLEPSTAD, P.

- Inflammatory markers and radiotherapy response in patients with painful bone metastases. *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 64, n. 4, p. 330-339, 2022.
75. HARRIS, M. A.; HAWKINS, C. J. Recent and ongoing research into metastatic osteosarcoma treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 7, p. 3817, 2022.
76. HEBERLE, A.; CAPPUCIO, E.; ANDRIC, A.; et al. Mitochondrial enzyme FAHD1 reduces ROS in osteosarcoma. *Scientific Reports*, v. 14, p. 9231, 2024.
77. HECKER-NOLTING, S.; LANGER, T.; BLATTMANN, C.; KAGER, L.; BIELACK, S. S. Current insights into the management of late chemotherapy toxicities in pediatric osteosarcoma patients. *Cancer Management and Research*, v. 13, p. 8989-8998, 2021.
78. HO, C. J.; KO, H. J.; LIAO, T. S.; et al. Severe cellular stress activates apoptosis independently of p53 in osteosarcoma. *Cell Death Discovery*, v. 7, n. 1, p. 275, 2021.
79. HORSMAN, M. R.; VAUPEL, P. Pathophysiological basis for the formation of the tumor microenvironment. *Frontiers in Oncology*, v. 6, p. 66, 2016.
80. HU, H. G.; LI, Y. M. Emerging adjuvants for cancer immunotherapy. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, p. 601, 2020.
81. HU, K.; OLSEN, B. R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*, v. 91, p. 30-38, 2016.
82. HUA, L.; LEI, P.; HU, Y. Construction and validation model of necroptosis-related gene signature associates with immunity for osteosarcoma patients. *Scientific Reports*, v. 12, p. 15893, 2022.
83. IYER, S. S.; CHENG, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, v. 32, n. 1, p. 23-63, 2012.
84. IZBICKA, E.; STREPPER, R. T. Cancer drug development yesterday, today and tomorrow. *Oncoscience*, v. 10, p. 32-33, 2023.
85. JHA, R. K.; KOUZINE, F.; LEVENS, D. MYC function and regulation in physiological perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 11, p. 1268275, 2023.

86. JOMOVA, K.; RAPTOPA, R.; ALOMAR, S. Y.; et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, v. 97, n. 10, p. 2499-2574, 2023.
87. JOSHI, S.; PANDEY, R.; KUMAR, A.; et al. Targeted blockade of interleukin-8 negates metastasis and chemoresistance via Akt/Erk-NFκB axis in oral cancer. *Cytokine*, v. 166, p. 156155, 2023.
88. JUNG, D.; BACHMANN, H. S. Regulation of protein prenylation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 164, 2023.
89. JUNG, H.; et al. Dysregulation of Rho GTPases in Human Cancers. *Cancers*, v.12, n. 5, p. 1179, 2020.
90. KAELIN, W. G. The von Hippel–Lindau Tumor Suppressor Protein. *Annual Review of Cancer Biology*, v. 2, p. 91-109, 2018.
91. KARAKAIDOS, P.; KARAGIANNIS, D.; RAMPIAS, T. Resolving DNA damage: epigenetic regulation of DNA repair. *Molecules*, v. 25, p. 2496, 2020.
92. KATO, H.; WAKABAYASHI, H.; NAITO, Y.; KATO, S.; NAKAGAWA, T.; MATSUMINE, A.; SUDO, A. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits lung metastasis in an osteosarcoma cell line. *Oncology*, v. 88, n. 3, p. 139-146, 2015.
93. KLEIH, M.; BÖPPLE, K.; DONG, M.; et al. Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells. *Cell Death and Disease*, v. 10, p. 851, 2019.
94. KONTOMANOLIS, E. N.; KOUTRAS, A.; SYLLAIOS, A.; et al. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. *Anticancer Research*, v. 40, n. 11, p. 6009-6015, 2020.
95. KOYAMA, M.; et al. Perillyl alcohol causes G1 arrest through p15(INK4b) and p21(WAF1/Cip1) induction. *Oncology Reports*, v. 29, n. 2, p. 779–784, 2013.
96. KUMAR S. S., et al. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/ p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. *Oncotarget*, v. 8, p. 17216-17228, 2017.
97. LAMOULINE, A.; BERSINI, S.; MORETTI, M. In vitro models of breast cancer bone metastasis: analyzing drug resistance through the lens of the microenvironment. *Frontiers in Oncology*, v. 13, p. 1135401, 2023.

98. LANDUZZI, L.; RUZZI, F.; PELLEGRINI, E.; et al. IL-1 family members in bone sarcomas. *Cells*, v. 13, n. 3, p. 233, 2024.
99. LAU H.Y., WANG M. Small change, big effect: Taking RAS by the tail through suppression of post-prenylation carboxymethylation. *Small GTPases*, v. 11, n. 4, p. 271-279, 2020.
100. LECTURIO. Estrutura dos ossos. Disponível em: <https://www.lecturio.com>. Acesso em: 29 nov. 2024.
101. LEDFORD, H. DNA typos to blame for most cancer mutations. *Nature*, 2017.
102. LI-HONG, W.; HSIAO-CHI, T.; YU-CHE, C.; et al. CTGF promotes osteosarcoma angiogenesis by regulating miR-543/angiopoietin 2 signaling. *Cancer Letters*, v. 391, p. 28-37, 2017.
103. LI, J.; YANG, Z.; LI, Y.; et al. Cell apoptosis, autophagy and necroptosis in osteosarcoma treatment. *Oncotarget*, v. 7, n. 28, p. 44763-44778, 2016.
104. LI, M.; WANG, Y.; LI, M.; WU, X.; SETRERRAHMANE, S.; XU, H. Integrins as attractive targets for cancer therapeutics. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021.
105. LIN, Y. H.; JEWELL, B. E.; GINGOLD, J.; et al. Osteosarcoma: molecular pathogenesis and iPSC modeling. *Trends in Molecular Medicine*, v. 23, n. 8, p. 737-755, 2017.
106. LIU, C.; ZHAO, P.; YANG, Y.; et al. Ampelopsin suppresses TNF- $\alpha$ -induced migration and invasion of U2OS osteosarcoma cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 13, n. 6, p. 4729-4736, 2016.
107. LIU, G.; CHEN, X. T.; ZHANG, H.; CHEN, X. Expression analysis of cytokines IL-5, IL-6, IL-8, IL-17 and VEGF in breast cancer patients. *Frontiers in Oncology*, v. 12, p. 1019247, 2022.
108. LIU, J. F.; CHEN, P. C.; CHANG, T. M.; HOU, C. H. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes cancer cell migration via c-Raf/MAPK/AP-1 pathway and MMP-9 production in osteosarcoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 39, n. 1, p. 254, 2020.
109. LIU, Y., et al. Role of non-canonical post-translational modifications in gastrointestinal tumors. *Cancer Cell Int*, v.23, p.225, 2023.

110. LOUTRARI, H. et al. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 311, n. 2, p. 568–575, 2004.
111. LOZANO-CALDERÓN, S. A.; et al. Complete tumor necrosis after neoadjuvant chemotherapy defines good responders in patients with Ewing sarcoma. *Cancer*, v. 129, n. 1, p. 60-70, 2023.
112. MA, Y.; BIAN, J.; ZHANG, F. Inhibition of perillyl alcohol on cell invasion and migration depends on the Notch signaling pathway in hepatoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 411, n. 1-2, p. 307-315, 2016.
113. MAIQUES, O.; FANSHAW, B.; CROSAS-MOLIST, E.; et al. A preclinical pipeline to evaluate migrastatics as therapeutic agents in metastatic melanoma. *British Journal of Cancer*, v. 125, p. 699-713, 2021.
114. MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*, v. 45, n. 5, p. 1469-1478, 2018.
115. MALEBARY, S. J.; KHAN, R.; KHAN, Y. D. ProtoPred: advancing oncological research through identification of proto-oncogene proteins. *IEEE Access*, v. 9, p. 68788-68797, 2021.
116. MARCHANDET, L.; LALLIER, M.; CHARRIER, C.; et al. Mechanisms of resistance to conventional therapies for osteosarcoma. *Cancers (Basel)*, v. 13, n. 4, p. 683, 2021.
117. MARGIONO, E. A.; ANDREANI, S. Case report of a very rare primary malignant bone tumor: mixed type maxillary osteosarcoma. *Radiology Case Reports*, v. 18, n. 5, p. 1680-1685, 2023.
118. MARÍN-RAMOS, N. I.; et al. Inhibition of motility by NEO100 through the calpain-1/RhoA pathway. *Journal of Neurosurgery*, p. 1-12, 2019.
119. MARTINHO, N.; SANTOS, T. C. B.; FLORINDO, H. F.; SILVA, L. C. Cisplatin-membrane interactions and their influence on platinum complexes activity and toxicity. *Frontiers in Physiology*, v. 9, p. 1898, 2019.
120. MATOS, J. M.; SCHMIDT, C. M.; THOMAS, H. J.; CUMMINGS, O. W.; WIEBKE, E. A.; MADURA, J. A.; CROWELL, P. L. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. *Journal of Surgical Research*, v. 147, n. 2, p. 194–199, 2008.

121. MENDIRATTA, G.; KE, E.; AZIZ, M.; et al. Cancer gene mutation frequencies for the U.S. population. *Nature Communications*, v. 12, p. 5961, 2021.
122. MÉRY, B.; GUY, J. B.; VALLARD, A.; et al. In vitro cell death determination for drug discovery: a landscape review of real issues. *Journal of Cell Death*, v. 10, p. 1179670717691251, 2017.
123. MILLAR, F. R.; JANES, S. M.; GIANGRECO, A. Epithelial cell migration as a potential therapeutic target in early lung cancer. *European Respiratory Review*, v. 26, n. 143, p. 160069, 2017.
124. MILLER, D. M.; THOMAS, S. D.; ISLAM, A.; MUENCH, D.; SEDORIS, K. c-Myc and cancer metabolism. *Clinical Cancer Research*, v. 18, n. 20, p. 5546-5553, 2012.
125. MORROW, J. J.; KHANNA, C. Osteosarcoma genetics and epigenetics: emerging biology and candidate therapies. *Critical Reviews in Oncogenesis*, v. 20, n. 3-4, p. 173-197, 2015.
126. MUKHTAR, Y. M.; ADU-FRIMPONG, M.; XU, X.; YU, J. Biochemical significance of limonene and its metabolites: future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs. *Bioscience Reports*, v. 38, n. 6, p. BSR20181253, 2018.
127. MULHOLLAND, B. S.; FORWOOD, M. R.; MORRISON, N. A. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) drives activation of bone remodelling and skeletal metastasis. *Current Osteoporosis Reports*, v. 17, n. 6, p. 538-547, 2019.
128. NAEEM, A.; HU, P.; YANG, M.; et al. Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives. *Molecules*, v. 27, n. 23, p. 8367, 2022.
129. NAKAMURA, H.; TAKADA, K. Reactive oxygen species in cancer: current findings and future directions. *Cancer Science*, v. 112, n. 10, p. 3945-3952, 2021.
130. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 10819, Perillyl alcohol. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 27 set. 2024.
131. NATURE. Transcription: DNA transcription. 2014. Disponível em: <https://www.nature.com>. Acesso em: 24 set. 2024.

132. NCI. First-line therapy. 2024. Disponível em: <https://www.cancer.gov>. Acesso em: 22 set. 2024.
133. NCI. Second-line therapy. 2024. Disponível em: <https://www.cancer.gov>. Acesso em: 22 set. 2024.
134. NCI. What is cancer? 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov>. Acesso em: 31 out. 2022.
135. NI, S.; KUANG, Y.; YUAN, Y.; YU, B. Mitochondrion-mediated iron accumulation promotes carcinogenesis and Warburg effect through reactive oxygen species in osteosarcoma. *Cancer Cell International*, v. 20, p. 399, 2020.
136. NING, Y.; SHI, Y.; CHEN, J.; et al. Necrostatin-1 attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through suppression of apoptosis and oxidative stress and retains Klotho expression. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 384, 2018.
137. ORANGE, S. T.; LESLIE, J.; ROSS, M.; MANN, D. A.; WACKERHAGE, H. The exercise IL-6 enigma in cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 34, n. 11, p. 749-763, 2023.
138. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. 2024. Disponível em: <https://www.who.int>. Acesso em: 24 set. 2024.
139. OTTAVIANI, G.; JAFFE, N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treatment and Research*, v. 152, p. 3-13, 2009.
140. OTURANEL, C. E.; KIRAN, İ.; ÖZŞEN, Ö.; ÇİFTÇİ, G. A.; ATLI, Ö. Cytotoxic, antiproliferative and apoptotic effects of perillyl alcohol and its biotransformation metabolite on A549 and HepG2 cancer cell lines. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 9, p. 1243-1250, 2017.
141. PADUCH, R. et al. Biological activity of terpene compounds produced by biotechnological methods. *Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 6, p. 1096–1107, 2016.
142. PARK, W.; WEI, S.; KIM, B. S.; et al. Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Experimental and Molecular Medicine*, v. 55, p. 1573–1594, 2023.
143. PENG, F.; LIAO, M.; QIN, R.; et al. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 7, p. 286, 2022.

144. PIETKIEWICZ, S.; SCHMIDT, J. H.; LAVRIK, I. N. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *Journal of Immunological Methods*, v. 423, p. 99-103, 2015.
145. PRATER, S.; MCKEON, B. Osteosarcoma. [Updated 2023 May 23]. In: STATPEARLS. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.
146. PRUDOWSKY, Z. D.; YUSTEIN, J. T. Recent insights into therapy resistance in osteosarcoma. *Cancers (Basel)*, v. 13, n. 1, p. 83, 2020.
147. QIN, X.; MA, D.; TAN, Y. X.; WANG, H. Y.; CAI, Z. The role of necroptosis in cancer: a double-edged sword? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1871, n. 2, p. 259-266, 2019.
148. RAFTOPOULOU, C.; ROUMELIOTI, F. M.; DRAGONA, E.; et al. Karyotypic flexibility of the complex cancer genome and the role of polyploidization in maintenance of structural integrity of cancer chromosomes. *Cancers (Basel)*, v. 12, n. 3, p. 591, 2020.
149. RATHORE, R.; VAN TINE, B. A. Pathogenesis and current treatment of osteosarcoma: perspectives for future therapies. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, n. 6, p. 1182, 2021.
150. RAUDENSKÁ, M.; PETRLÁKOVÁ, K.; JURIŇÁKOVÁ, T.; et al. Engine shutdown: migrastatic strategies and prevention of metastases. *Trends in Cancer*, v. 9, n. 4, p. 293-308, 2023.
151. RICHARDSON, S. M.; WURTZ, L. D.; COLLIER, C. D. Ninety percent or greater tumor necrosis is associated with survival and social determinants of health in patients with osteosarcoma in the National Cancer Database. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 481, n. 3, p. 512-522, 2023.
152. ROTHZERG, E.; XU, J.; WOOD, D. Different subtypes of osteosarcoma: histopathological patterns and clinical behaviour. *Journal of Molecular Pathology*, v. 4, n. 2, p. 99-108, 2023.
153. SHAMLOO B.; USLUER S. p21 in Cancer Research. *Cancers (Basel)*, v. 11, n. 8, p. 1178, 2019.
154. SHENG, G.; GAO, Y.; YANG, Y.; WU, H. Osteosarcoma and metastasis. *Frontiers in Oncology*, v. 11, p. 780264, 2021.

155. SHI, W.; GOULD, M. N. Induction of cytostasis in mammary carcinoma cells treated with the anticancer agent perillyl alcohol. *Carcinogenesis*, v. 23, n. 1, p. 131–142, 2002.
156. SHLOMOVITZ, I.; SPEIR, M.; GERLIC, M. Flipping the dogma – phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. *Cell Communication and Signaling*, v. 17, p. 139, 2019.
157. SHOAIB, Z.; FAN, T. M.; IRUDAYARAJ, J. M. K. Osteosarcoma mechanobiology and therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, v. 179, n. 2, p. 201-217, 2022.
158. SILVA M.O., et al. Perillyl alcohol for pediatric TP53- and RAS-mutated SHH-medulloblastoma: an in vitro and in vivo translational pre-clinical study. *Childs Nerv Syst*, v. 37, n. 7, p. 2163-2175, 2021.
159. SINKALA, M. Mutational landscape of cancer-driver genes across human cancers. *Scientific Reports*, v. 13, p. 12742, 2023.
160. SKVORTSOV, D. A.; KALININA, M. A.; ZHIRKINA, I. V.; et al. From toxicity to selectivity: coculture of the fluorescent tumor and non-tumor lung cells and high-throughput screening of anticancer compounds. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 713103, 2021.
161. SMELAND, S.; BIELACK, S. S.; WHELAN, J.; et al. Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort. *European Journal of Cancer*, v. 109, p. 36-50, 2019.
162. SMITH, K.; COLIE, M.; MOORE, T.; SCHISLER, J. C. Die hard: necroptosis and its impact on age-dependent neuroinflammatory diseases. *Frontiers in Cell Death*, v. 3, 2024.
163. SONG, Y.; BI, Z.; LIU, Y.; et al. Targeting RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway in human cancer: current status in clinical trials. *Genes and Diseases*, v. 10, n. 1, p. 76-88, 2022.
164. SONI, M.; PARAMBATH, A. K.; PURAYIAL, A. S. U. P.; GANAPATHY, D.; SEKAR, D. Effect of cisplatin treatment on interleukin-6 gene expression in breast cancer cells: an in vitro study. *Clinical Cancer Investigation Journal*, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2024.
165. SOUSA, J. F.; SERAFIM, R. B.; FREITAS, L. M.; FONTANA, C. R.; VALENTE, V. DNA repair genes in astrocytoma tumorigenesis, progression

- and therapy resistance. *Genetics and Molecular Biology*, v. 43, n. 1, suppl. 1, p. e20190066, 2019.
166. STEEG, P. Targeting metastasis. *Nature Reviews Cancer*, v. 16, p. 201–218, 2016.
167. SU, Q. H.; XU, X. Q.; WANG, J. F.; et al. Anticancer effects of constituents of herbs targeting osteosarcoma. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, v. 25, n. 12, p. 948-955, 2019.
168. SYNORADZKI, K. J.; BARTNIK, E.; CZARNECKA, A. M.; et al. TP53 in biology and treatment of osteosarcoma. *Cancers (Basel)*, v. 13, n. 17, p. 4284, 2021.
169. TATSUNO, R.; ICHIKAWA, J.; KOMOHARA, Y.; et al. Pivotal role of IL-8 derived from the interaction between osteosarcoma and tumor-associated macrophages in osteosarcoma growth and metastasis via the FAK pathway. *Cell Death and Disease*, v. 15, p. 108, 2024.
170. TIAN, H.; CAO, J.; LI, B.; et al. Managing the immune microenvironment of osteosarcoma: the outlook for osteosarcoma treatment. *Bone Research*, v. 11, p. 11, 2023.
171. TIPPETT, V. L.; TATTERSALL, L.; AB LATIF, N. B.; et al. The strategy and clinical relevance of in vitro models of MAP resistance in osteosarcoma: a systematic review. *Oncogene*, v. 42, p. 259–277, 2023.
172. TWENHAFEL, L.; MORENO, D.; PUNT, T.; KINNEY, M.; RYZNAR, R. Epigenetic changes associated with osteosarcoma: a comprehensive review. *Cells*, v. 12, n. 12, p. 1595, 2023.
173. TZANAKAKIS, G. N.; GIATAGANA, E.-M.; BERDIAKI, A.; et al. The role of IGF/IGF-IR-signaling and extracellular matrix effectors in bone sarcoma pathogenesis. *Cancers*, v. 13, n. 10, p. 2478, 2021.
174. VÉLĚZ, H.; GAUCHAN, D. P.; GARCÍA-GIL, M. D. R. Taxol and  $\beta$ -tubulins from endophytic fungi isolated from the Himalayan Yew, *Taxus wallichiana* Zucc. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 956855, 2022.
175. VERRECCHIA, F.; RÉDINI, F. Transforming Growth Factor- $\beta$  signaling plays a pivotal role in the interplay between osteosarcoma cells and their microenvironment. *Frontiers in Oncology*, v. 8, p. 133, 2018.

176. WAGNER, J. E.; HUFF, J. L.; RUST, W. L.; KINGSLEY, K.; PLOPPER, G. E. Perillyl alcohol inhibits breast cell migration without affecting cell adhesion. *Journal of Biomedical Biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 136-140, 2002.
177. WAN, J.; WU, Y.; JI, X.; et al. IL-9 and IL-9-producing cells in tumor immunity. *Cell Communication and Signaling*, v. 18, p. 50, 2020.
178. WANG, L.; LAN, J.; TANG, J.; LUO, N. MCP-1 targeting: shutting off an engine for tumor development. *Oncology Letters*, v. 23, n. 1, p. 26, 2022.
179. WISEMAN, D. A.; WERNER, S. R.; CROWELL, P. L. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 320, n. 3, p. 1163–1170, mar. 2007.
180. WU, Z.; NICOLL, M.; INGHAM, R. J. AP-1 family transcription factors: a diverse family of proteins that regulate varied cellular activities in classical Hodgkin lymphoma and ALK+ ALCL. *Experimental Hematology and Oncology*, v. 10, p. 4, 2021.
181. XIE, L.; JI, T.; GUO, W. Anti-angiogenesis target therapy for advanced osteosarcoma (review). *Oncology Reports*, v. 38, n. 2, p. 625-636, 2017.
182. XIN, S.; WEI, G. Prognostic factors in osteosarcoma: a study-level meta-analysis and systematic review of current practice. *Journal of Bone Oncology*, v. 21, p. 100281, 2020.
183. XU, J.; YU, L.; LIU, F.; WAN, L.; DENG, Z. The effect of cytokines on osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling in osteoporosis: a review. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1222129, 2023.
184. YAMAMOTO, T.; EBISUYA, M.; ASHIDA, F.; OKAMOTO, K.; YONEHARA, S.; NISHIDA, E. Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Current Biology*, v. 16, n. 12, p. 1171-1182, 2006.
185. YANG, F.; LEE, G.; FAN, Y. Navigating tumor angiogenesis: therapeutic perspectives and myeloid cell regulation mechanism. *Angiogenesis*, v. 27, p. 333–349, 2024.
186. YAO, X.; LI, P.; DENG, Y.; et al. Role of p53 in promoting BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through TGF  $\beta$ 1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 25, n. 6, p. 248, 2023.

187. YERUVA, L.; PIERRE, K. J.; ELEGBEDE, A.; WANG, R. C.; CARPER, S. W. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Letters*, v. 257, n. 2, p. 216-226, 2007.
188. YURI, T.; et al. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 84, n. 3, p. 251–260, 2004.
189. ZANG, X.; SONG, J.; LI, Y.; HAN, Y. Targeting necroptosis as an alternative strategy in tumor treatment: from drugs to nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 349, p. 213-226, 2022.
190. ZAYNAGETDINOV, R.; SHERRILL, T. P.; GLEAVES, L. A.; et al. Interleukin-5 facilitates lung metastasis by modulating the immune microenvironment. *Cancer Research*, v. 75, n. 8, p. 1624-1634, 2015.
191. ZHANG, Y.; YANG, J.; ZHAO, N.; et al. Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma. *Oncology Letters*, v. 16, n. 5, p. 6228-6237, 2018.
192. ZHENG, C.; TANG, F.; MIN, L.; HORNICEK, F.; DUAN, Z.; TU, C. PTEN in osteosarcoma: recent advances and the therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1874, n. 2, p. 188405, 2020.
193. ZHOU, H.; DONG, Y.; ALHASKAWI, A.; et al. The roles of TNF signaling pathways in metabolism of bone tumors. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 907629, 2022.
194. ZHU, J.; YANG, Y.; LI, L.; TANG, J.; ZHANG, R. DNA methylation profiles in cancer: functions, therapy, and beyond. *Cancer Biology and Medicine*, v. 21, n. 2, p. 111-116, 2023.
195. ZHU, T.; WU, B. W. Recognition of necroptosis: from molecular mechanisms to detection methods. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 178, p. 117196, 2024.

## 8. APÊNDICES E ANEXOS

### 8.1 APÊNDICES

#### 8.1.1 Valores de concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS) do álcool perílico em diferentes linhagens celulares *in vitro*.

Referências	Célula normal	IC <sub>50</sub>	Célula tumoral / transformada	IC <sub>50</sub>	Valores do IS
Bardon et al., 2002	-		HCT116	0,5 mM	-
Bardon et al., 1998	-		T-47D	0,1 mM	-
CHAN et al., 2006	-		MCF-7	0,0015 mM	-
Clark et al., 2003	-	-	Bcr/Abl-transformed FDC-P1	0,4 mM	-
Crowell et al., 1994	NIH3T3, MCF-10 and M600B		HT-29	0,05 mM	-
De lima et al., 2020	-	-	H209	0,975 mM	-
			H1734	0,725 mM	
			H69	0,643 mM	
			H82	0,495 mM	
			H358	1,388 mM	
			H2347	1,198 mM	
Elegbede et al., 2003	-	-	A549	1,2 mM	-
			BroTo	1 mM	
Garcia et al., 2010	-	-	A172	1,5 mM	-
Garcia et al., 2015	Primary cultures of mice astrocytes	1.4 mM	U251	1,4 mM	0,64
	Vero	0.9 mM	U87	1,1 mM	0,81
GERHÄUSER et al., 2003	-	-	HL-60	> 0,1 µM (enzimatic)	-
Marín-Ramos et al., 2019	-	-	Primary glioblastoma stem-cells (GSCs)	1,2 to 1,8 mM	-
	-	-	PC3	0,380 mM	-

Nandurkar et al., 2014			A549	0,350 mM	
Oturanel et al., 2017	NIH/3T3	250 µg/mL	A549	>500 µg/mL	50
			HepG2	409.2 µg/mL	1,63
Paduch et al., 2016	CCD 841 CoTr	273.7 µg/mL	HT29	458.3 µg/mL	-
Sahin et al., 1999	FDC-P1	0,9 mM	Bcr/Abl-transformed FDC-P1	0,4 mM	2,25
			Bcr/Abl-transformed 32D	0,3–0,4 mM	2,25
Silva et al., 2021	-	-	DAOY	0,74 mM	-
			ONS-76	0,76 mM	
			UW402	1,92 mM	
			UW473	2,01 mM	
Stayrook et al., 1997	D27	0,26 mM	BxPC3	0,2 mM	1,3
			Panc1	0,215 mM	1,2
			MIA PaCa2	0,215 mM	1,2
			B12/13	0,15 mM	1,73
Yeruva et al., 2007	-	-	A549	1,4 mM	-
			H520	1,7 mM	