



MARIA EDUARDA OLIVEIRA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DA ULIGINOSINA B *in silico* E *in vivo* UTILIZANDO O NEMATOIDE *Caenorhabditis elegans*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

URUGUAIANA

2024

MARIA EDUARDA OLIVEIRA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DA ULIGINOSINA B *in silico* E *in vivo* UTILIZANDO O NEMATOIDE *Caenorhabditis elegans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador(a): Daiana Silva de Ávila

URUGUAIANA

2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S719a Souza, Maria Eduarda Oliveira de
Avaliação da ação antiproliferativa da uliginosina b in
silico e in vivo utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans*
/ Maria Eduarda Oliveira de Souza.
68 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2024.
"Orientação: Daiana Silva de Ávila".

1. docking molecular. 2. câncer. 3. modelo alternativo. 4.
uliginosina b. I. Título.

MARIA EDUARDA OLIVEIRA DE SOUZA

Avaliação da ação antiproliferativa da uliginosina b *in silico* e *in vivo* utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans*

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Dissertação defendida e aprovada em: 20 de fevereiro de 2024

Banca examinadora

Profa. Dra. Daiana Silva de Ávila

Orientadora

UNIPAMPA

Profa. Dra. Liz Girardi Muller

UNOCHAPECÓ

Profa. Dra. Fabiane Moreira Farias

UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **DAIANA SILVA DE AVILA, PROFESSOR MAGISTÉRIO SUPERIOR**, em 23/02/2024, às 14:44, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **FABIANE MOREIRA FARIAS, PROFESSOR MAGISTÉRIO SUPERIOR**, em 23/02/2024, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Liz Girardi Müller, Usuário Externo**, em 26/02/2024, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1376809** eo código CRC **792DEA53**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico este trabalho, primeiramente, aos meus pais e minha família, pelo suporte, compreensão e apoio. Aos meus amigos(as) pelas palavras de conforto, carinho e amizade. Aos meus colegas de laboratório pelo companheirismo, força e ajuda. E a todos que estiveram comigo neste período, não seria possível sem suas contribuições, resultando no melhor aproveitamento desta jornada. Em especial agradeço à minha orientadora, professora Daiana Ávila pela sua disponibilidade, ensinamentos, e incentivo, e ao professor Favero Paula por sua ajuda e colaboração a este projeto. E sem dúvidas, também dedico este trabalho aos meus filhos(as) de quatro patas que estão sempre comigo.

RESUMO

O câncer é considerado um dos principais problemas de saúde pública, sendo o segundo maior índice de causa de morte do mundo. O uso de fármacos derivados de produtos naturais já é utilizado no mercado, porém busca-se moléculas que apresentem maior eficácia e menos efeitos adversos. O reino vegetal é uma fonte promissora, e estudos *in vitro* já relatam possível ação antiproliferativa da uliginosina B (ULI), classificado como um floroglucinol dimérico. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar sua atividade antiproliferativa *in vivo*, utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans*, e *in silico*, utilizando como ferramenta o docking molecular. Os animais das cepas N2 e MT4244 no estágio larval L1 foram expostos à ULI nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 μ M, em exposição aguda (30 minutos). Foi possível observar que a ULI se apresentou segura nos parâmetros toxicológicos, e causou um atraso no desenvolvimento do fenótipo multivulva (MV) nos vermes no primeiro e segundo dia de adulto, com significância nas concentrações de 5, 10 e 20 μ M. Todavia, não apresentaram alteração na média da quantidade de MV de cada verme, bem como na sua área. Nos ensaios *in silico*, foram realizados o método de docking molecular cego, através do Swissdock, sendo visualizado uma interação mais específica da ULI com as proteínas humanas (EGFR) na sua forma ativa e inativa (código PDB 7KXZ e 1M14, respectivamente) comparada com a do *C. elegans* (LET-23) (código PDB 5WNO), que demonstrou interação mais dispersa. Também foi utilizando o docking flexível, o qual confirmou sua maior afinidade pela porção tirosina quinase do receptor EGF humano. É possível sugerir que a ULI atrasou o desenvolvimento do fenótipo MV, mas sem alterar o número de tumores, e isto pode explicar porque a ULI não apresenta especificidade na interação com o receptor no nematoide, como demonstrada nos receptores humanos.

Palavras-chave: docking molecular; câncer; modelo alternativo; uliginosina B

“Antiproliferative action of Uliginosin B in silico and in vivo using the nematode
Caenorhabditis elegans”

ABSTRACT

Cancer is considered one of the main public health problems, being the second highest cause of death in the world. The use of drugs derived from natural products is already used on the market, but molecules that are more effective and have fewer adverse effects are being sought. The plant kingdom is a promising source, and in vitro studies have already reported possible antiproliferative action of uliginosin B (ULI), classified as a dimeric fluroglucinol. Therefore, the objective of this work was to evaluate its antiproliferative activity *in vivo*, using the nematode *Caenorhabditis elegans*, and *in silico*, using molecular docking as a tool. Animals of strains N2 and MT4244 in the L1 larval stage were exposed to ULI at concentrations of 1, 5, 10 and 20 μ M, in acute exposure (30 minutes). It was possible to observe that the ULI was safe in terms of toxicological parameters, and caused a delay in the development of the multivulva (MV) phenotype in worms on the first and second day of adulthood, with significance at concentrations of 5, 10 and 20 μ M. However, there was no change in average amount of MV of each worm, as well as in its area. At the *in silico* tests, the blind molecular docking method was carried out using Swissdock, visualizing a more specific interaction of the ULI with human proteins (EGFR) in its active and inactive form (PDB code 7KXZ and 1M14) compared to the *C. elegans* (LET-23) (PDB code 5WNO) which demonstrated a more dispersed interaction. Flexible docking was also used, which confirmed its greater affinity for the tyrosine kinase portion of the human EGF receptor. It is possible to suggest that ULI delayed the development of the MV phenotype, but without changing the number of tumors, and this can be explained because ULI does not present specificity in the interaction with the receptor in the nematode, as demonstrated in receptors humans.

Keywords: molecular docking; cancer; alternative model; uliginosin B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de crescimento celular (INCA, 2020)	22
Figura 2- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes (INCA, 2023)	24
Figura 3- Via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK (Silva et al., 2022)	25
Figura 4 – Exemplos de estruturas moleculares de quimioterápicos derivados de plantas. Imagem criada pela autora	28
Figura 5 – Estrutura molecular de floroglucínóis (Lunardelli et al., 2015)	29
Figura 6 – Exemplos de derivados da classe dos floroglucínóis (Lunardelli et al., 2015)	30
Figura 7 – Imagem ilustrativa da espécie <i>Hypericum perforatum</i> (Horto Didático de Plantas Medicinais do (HU)/(CCS) – UFSC, 2020)	31
Figura 8- Estrutura química da ULI (Sakamoto, 2012)	32
Figura 9- Ciclo de vida do nematoide <i>Caenorhabditis elegans</i> (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015)	36
Figura 10- Comparação entre N2 (tipo selvagem) e mutante <i>let-60</i> (multivulva) (Sickkids, 2021)	38
Figura 11- Imagem ilustrativa da interação de uma proteína alvo e seu ligante (GMMSB, 2019)	41

MANUSCRITO

Figure 1 - Chemical structure of ULI (Sakamoto et al, 2012)	47
--	----

Figure 2- Survival and development rate of the animals exposed to concentrations of 1, 5, 10 and 20 μM of ULI. a) Survival rate (n=4). b) Body area (n=3). c) Body length (n=3). The control groups of all graphs were normalized to 100%. Statistical analysis showed normal distribution using the Shapiro-Wilk test, followed by one-way ANOVA.52

Figure 3 – Evaluation of reproductive parameters in worms treated at concentrations of 1, 5, 10 and 20 μM of ULI. a) Quantification of the number of eggs expelled without and with the stimulus of levamisole in the worms, on the first and (n=3) (b) third day of adulthood (n=4). Statistical analysis showed normal distribution by the Shapiro-Wilk test, followed by the two-way ANOVA analysis. c) Quantification of the average number of eggs inside the animals, on the first (n=6) and (d) third day of adulthood (n=4). Analysis using the Shapiro-Wilk test was not normal, so the Kruskal-Wallis test was performed, followed by the Dunn's multiple comparison test. e) Size of the progeny of the animals (n=4) (*) Indicates a statistically significant difference in relation to the control group with $**p < 0.001$. Statistical analysis showed normal distribution using the Shapiro-Wilk test, followed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.53

Figure 4 – Longevity assay and quantification of animals that developed the mv phenotype after exposure to concentrations of 1, 5, 10 and 20 μM of ULI. a) Survival rate over the days of the animals. Statistical analysis was performed by Kaplan Meier. (*) Indicates a statistically significant difference in relation to the N2 control group with other groups with $****p < 0.0001$. (n=4). b), c) and d) Percentage of worms that developed the phenotype, on the first (b), second (c) and third (d) day of adulthood. (*) Indicates a statistically significant difference in relation to the control group with $*p < 0.05$ $**p < 0.01$ (n=4). e) Determination of the average mv area of the worms on the third day of adulthood (n=3). Statistical analysis showed normal distribution using the Shapiro-Wilk test, followed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test.....55

Figure 5 – Blind molecular docking with EGFR protein. (a) Possible sites of interaction of ULI with the human protein in the active form 7KXZ. (b) Interactions of ULI with the *C. elegans* 5WNO protein. (c) Interactions of ULI with the human protein

in	the	inactive	form
1M14.....			56

Figure 6 – Analysis using the redocking method. (a) and (b) Molecular docking and redocking with ULI and the 7KXZ protein. (c) and (d) Molecular docking and redocking with ULI and the 5WNO protein	58
---	-----------

LISTA DE ABREVIACES

ULI – Uliginosina B

NGM - Nematode growth medium (Meio de crescimento de nematoide)

mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos

MAPK - Proteína quinase ativada por mitogênio

ERK - Proteína quinase regulada por sinalização extracelular

EGF - Fator de crescimento endotelial

EGFR - Receptor do fator de crescimento endotelial

INCA - Instituto Nacional de Câncer

DNA - Ácido desoxirribonucleico

IARC – International Agency for Research on Cancer

GFP - Proteína verde florescente (Green fluorescent protein)

DMSO – Dimetilsulfóxido

PI3K – Fosfatidilinositol-3-cinase

SQR – Succinato-coenzima Q redutase

RNA – Ácido ribonucleico

RTKs - Receptores tirosina quinases

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA	21
4.1 CÂNCER	21
4.1.1 O que é o câncer?	21
4.1.2 Dados epidemiológicos	23
4.1.3 Via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK	24
4.1.4 Terapias contra o câncer	26
4.2 FLOROGLUCINÓIS	28
4.2.1 Uliginosina B	30
4.3 <i>Caenorhabditis elegans</i>	34
4.4 <i>C. elegans</i> e modelo de câncer	36
4.5 Docking molecular	38
5. MATERIAIS, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Manuscrito	43
5.2 Abstract	44
5.3 Introduction	45
5.4 Materials and methods	47
5.4.1 Chemicals	47
5.4.2 Extraction and isolation of uliginosin B	47
5.4.3 <i>C. elegans</i> strains, culture conditions and synchronization	48
5.4.4 Exposure protocol	48
5.4.5 Survival rate	48
5.4.6 Body length and body area	48
5.4.7 Brood size	49
5.4.8 Egg laying and egg hatching tests	49

5.4.9 Logevity and phenotype quantification of multivulvas	49
5.4.10 Quantification of the area of the multivulva phenotype	50
5.4.11 <i>In silico</i> analysis	50
5.4.11.1 Molecular modeling and ligand preparation	50
5.4.12 Statistical analysis	51
5.5 Results	51
5.5.1 Exposure to the ULI did not alter the survival rate and development of the animals	51
5.5.2 Exposure to the ULI did not improve the reproductive of the MT4244 strain	52
5.5.3 Exposure to ULI did not extend the lifespan on the worm, but delayed the development of the multivulva phenotype of MT4244 animals	54
5.5.4 ULI showed greater interaction specificity of the active site of the human EGRF protein	56
5.5.5 SemiFlexible Docking	57
5.6 Discussion	58
5.7 Conclusion	61
5.8 Acknowledgements	61
5.9 References	61
6. CONCLUSÃO	64
7. PERSPECTIVAS	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

O uso de moléculas orgânicas provenientes de fontes naturais na terapêutica é uma prática antiga, remontando desde sua aplicação na medicina tradicional até a confirmação científica de seus efeitos benéficos para uma ampla gama de enfermidades humanas. Uma variedade rica de compostos bioativos disponíveis no mercado tem origem direta ou indireta de micro-organismos, vertebrados e invertebrados terrestres, animais marinhos, e principalmente em vegetais, que representam a maior parcela desses compostos. O reino vegetal, em particular, destaca-se como uma das fontes mais antigas e abundantes de compostos ativos ainda em fase de exploração, devido à diversidade estrutural dos metabólitos produzidos pelas diferentes espécies (Costa-Lotufo et al., 2010; Ekiert; Szopa, 2020). Desde os anos 90, cerca de 80% dos fármacos desenvolvidos foram derivados de produtos naturais ou apresentam análogos em sua estrutura molecular. Alguns exemplos incluem antibióticos (penicilina), antimaláricos (quinina), imunossupressores (rapamicina), antiparasitários (avermectinas), antilipidêmicos como a lovastatina e antineoplásicos como o taxol (Newman; Cragg, 2020).

Durante esse mesmo período, houve um crescimento significativo nos estudos envolvendo produtos naturais com ação citotóxica contra células tumorais, resultando em descobertas que têm um papel crucial nos tratamentos contemporâneos. Entre essas descobertas, destacam-se os alcaloides de vinca (vincristina, vimblastina), os taxanos (paclitaxel, docetaxel), as camptotecinas (irinotecano, topotecana) e o etoposídeo e seus análogos. Dentre eles, aproximadamente 60% de todos os medicamentos anticâncer pertencem à classe de compostos naturais (Costa-Lotufo et al., 2010). Com o aumento da utilização de medicamentos derivados de compostos bioativos na terapia anticâncer, torna-se imprescindível identificar a eficácia e garantir a segurança de seu uso (Rao et al., 2019).

Como já mencionado, essas moléculas de origem natural estão abundantemente disponíveis, proporcionando uma ampla busca por novas fontes terapêuticas (Costa-Lotufo et al., 2010). A uliginosina B (ULI), é quimicamente caracterizada como um dímero de floroglucinol e está presente em algumas espécies de *Hypericum*, como o *Hypericum uliginosum*, *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum*, *H.*

polyanthemum, *H. carinatum* e *H. linoides* (Stolz et al, 2016). Na literatura, a ULI já apresentou possíveis atividades antibacteriana, antidepressiva, antinociceptiva e até antiproliferativa, sendo este um dos aspectos de interesse para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais (Singh; Bharate, 2006; Stein et al., 2011; Pinhatti, 2013).

A oncogênese é marcada por características como proliferação descontrolada, desdiferenciação, perda de função, invasividade e metástase celular. Esses aspectos anômalos resultam de alterações na expressão genética nas células cancerígenas, podendo ser hereditárias ou adquiridas por exposição a fatores como radiação ultravioleta, agentes químicos, tabaco, vírus, entre outros agentes carcinogênicos (Ward, 2002; Rang et al., 2020). O câncer é considerado um dos principais desafios de saúde pública, sendo uma causa significativa de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países, representando uma das principais barreiras para o aumento da expectativa de vida em todo o mundo (INCA, 2023). O número de diagnósticos e a taxa de mortalidade estão em ascensão em países com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) baixo ou médio até 2040, principalmente devido ao elevado custo do tratamento do câncer. Para o Brasil, a projeção para o triênio de 2023 a 2025 aponta para 704 mil novos casos de câncer, reduzindo para 483 mil quando excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Entre os tipos de câncer mais comuns na população feminina, destaca-se o câncer de mama, seguido pelos cânceres colorretal, pulmonar, cervical e da tireoide. Para os homens, os cânceres de próstata e pulmão representam juntos um terço de todos os casos (Rang et al., 2020; IARC, 2020; INCA, 2023). Dada a relevância desses dados epidemiológicos, a busca por novos fármacos com ação antitumoral mais eficaz e menos efeitos adversos torna-se emergente (Joshny; Devi; Hari, 2012).

Na busca por essas substâncias, a escolha do modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans* se apresenta como uma alternativa promissora para pesquisas no campo da farmacologia, por oferecer diversas vantagens. O nematoide é encontrado em matéria vegetal ou em animais em decomposição, sendo ele não-parasita de vida livre. Já possui seu genoma totalmente sequenciado, sua neurobiologia bem conhecida e, portanto, pode-se compreender as vias bioquímicas relacionadas a doenças, permitindo o estudo dos mecanismos de ação de novos fármacos. Cerca de 60 a 80% dos genes do *C. elegans* são ortólogos aos genes humanos, possibilitando a extrapolação de alguns achados. O genoma sequenciado e a facilidade de

manipulação genética foram fundamentais para o desenvolvimento de marcadores celulares, alterações genéticas ou expressão de proteínas, o uso de RNA interferente e a expressão da proteína verde fluorescente (GFP) ligada a proteínas de interesse (Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016). Este modelo também oferece facilidades para manutenção e uso em ensaios experimentais, como auto-fertilização do hermafrodita, seu tamanho pequeno (até 1 mm quando adulto), corpo transparente, ciclo reprodutivo curto e tempo de vida reduzido. Em laboratório, é cultivado no meio de crescimento para nematoides (nematode growth medium - NGM) e alimenta-se da bactéria *Escherichia coli* OP50, mantidos em uma incubadora a 20°C (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015; Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016;). Além disso, o *C. elegans* é considerado um modelo *in vivo* compatível com os princípios dos 3R (*replace, reduce or refine*), visando o bem-estar animal na ciência (Wellenberg et al., 2021).

Neste sentido, a possibilidade do uso de ferramentas de alterações genéticas, o *C. elegans* oportuniza a utilização de cepas mutantes como uma abordagem alternativa para compreender as vias moleculares envolvidas na oncogênese e explorar novas estratégias terapêuticas. Uma das vias de sinalização fundamentais relacionada à carcinogênese é a via Ras/Raf/MEK/ERK, que, quando ativada, desencadeia uma cascata de fosforilação de proteínas quinases. Isso resulta na regulação de genes-alvo responsáveis por funções como proliferação, diferenciação, ciclo celular e resistência à apoptose (Garavello, 2011; Kobet et al., 2014; Guo et al., 2020). No nematoide, essa via é semelhante, apresentando proteínas homólogas que, quando fosforiladas e ativadas, desencadeiam a expressão de genes controlando diversos processos, como formação de oócitos, progressão do ciclo meiótico, especificação do destino dos espermatozoides, espermatogênese, desenvolvimento da vulva e apoptose (Kobet et al., 2014). A cepa transgênica MT4244 possui uma superexpressão do gene *let-60*, desencadeando uma regulação positiva na formação da vulva e apresentando o fenótipo multivulva. Este gene tem ortólogos humanos associados ao câncer de glândula endócrina, sistema gastrointestinal e ao HRAS humano (proto-oncogene HRas, GTPase) (Wormbase, 2022).

Na literatura, há uma escassez de estudos *in vivo* para elucidar a ação anticarcinogênica da ULI. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antiproliferativa da ULI utilizando o *C. elegans* como modelo de hiperplasia, além de

compreender os possíveis mecanismos bioquímicos pelos quais atua, com auxílio de ferramentas de modelagem molecular.

2. JUSTIFICATIVA

A incidência do câncer está em constante crescimento, conforme indicam dados estatísticos, tanto no Brasil quanto no mundo. Diante desse cenário, estão sendo investigadas novas terapias medicamentosas. O objetivo principal não é apenas ampliar as opções farmacológicas, mas também reduzir os efeitos adversos associados a essa classe terapêutica, tornando sua ação mais específica, e visando melhorar a qualidade de vida dos indivíduos submetidos a esses tratamentos.

Neste contexto, compostos bioativos de espécies nativas do sul Brasil, país que possui uma das maiores biodiversidade de flora no mundo, são estruturas promissoras, e novas moléculas vem sendo estudadas para o desenvolvimento de fármacos, como isolados de espécies do gênero *Hypericum*. Da classe dos floroglucinóis, a ULI está ganhando destaque pelos seus diversos efeitos farmacológicos descritos na literatura, como sua ação antinociceptiva, analgésica, antidepressiva, antimicrobiana e até antiproliferativa. sua propriedade. Embora estudos *in vitro* já tenham observado sua possível ação antitumoral, ainda não existem pesquisas que avaliem seu potencial antitumoral em organismos vivos.

Tendo isto em vista a escolha de modelo alternativo como pesquisa inicial, o nematoide *C. elegans* como modelo de hiperplasia com superexpressão do gene *let-60*, relacionados à fisiopatologia do câncer o torna conveniente para avaliar a sua segurança, eficácia e mecanismo de ação no controle de células tumorais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar possível ação antiproliferativa da uliginosina B isolada da *Hypericum polyanthemum* *in silico* e *in vivo* com o modelo *Caenorhabditis elegans*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a segurança da ULI na cepa modelo de hiperplasia em *C. elegans*;
- Analisar a possível ação preventiva na formação e área do fenótipo multivulva na cepa MT4244;
- Elucidar a ação da ULI no tempo de vida útil do nematoide;
- Investigar, através da modelagem molecular, possíveis interações da ULI na porção tirosina quinase do receptor EGF humano e do *C. elegans*, que faz parte da via RAS/RAF/MEK/ERK.

4. CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

4.1. CÂNCER

4.1.1 O que é o câncer?

O corpo humano é composto por trilhões de células, as quais desempenham funções especializadas formando assim tecidos e órgãos. Essas células têm um papel crucial na manutenção da homeostase, garantindo que as condições internas do corpo permaneçam equilibradas. A perda da capacidade das células em contribuir para esse equilíbrio pode levar a disfunções graves, resultando morte celular, ou em disfunções moderadas que se manifestam como doenças (Hall, 2011).

Assim, a compreensão da biologia celular, da regulação genética e do ciclo de vida celular é crucial para entender como o corpo humano mantém seu equilíbrio interno, e como disfunções nesses processos podem levar a condições patológicas, como o câncer. A história do câncer remonta a milênios, sendo a doença detectada há aproximadamente 3 mil anos antes de Cristo. Atualmente, o termo "câncer" abrange um grupo diversificado de mais de 100 doenças, estas caracterizadas pelo crescimento desordenado de células. Exemplos desse tipo de crescimento celular incluem a hiperplasia, a metaplasia e a displasia, todos representando respostas adaptativas do organismo a estímulos específicos, como demonstrado na figura 1 (INCA,2020).

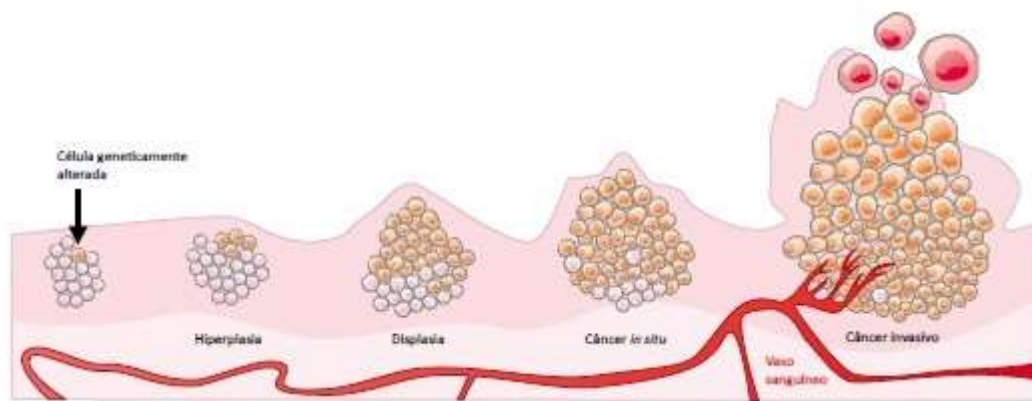


Figura 1 – Tipos de crescimento celular (INCA, 2020).

A formação das neoplasias é um processo complexo, sendo causada por uma combinação de fatores. Síndromes genéticas hereditárias como mutações no DNA celular podem ocorrer, contribuindo para a predisposição ao câncer. As mutações genéticas associadas ao câncer podem afetar uma variedade de genes, influenciando diferentes vias metabólicas e processos celulares. Além disso, as mutações em genes envolvidos em vias de sinalização do crescimento celular, no reconhecimento e reparo de danos no DNA, são fundamentais. O gene p53, um supressor tumoral, é um exemplo. A proteína p53 desempenha um papel crucial na regulação do ciclo celular, na resposta a danos no DNA e na indução da apoptose, sendo mutações nesse gene associadas a diferentes tipos de câncer devido à perda de sua função (Ward, 2002).

As alterações genéticas ou a ativação de genes do DNA que influenciam a divisão celular podem ser desencadeadas por fatores ambientais conhecidos como agentes carcinogênicos. Dentre esses fatores, destacam-se o tabagismo, os hábitos alimentares contemporâneos, a obesidade, o consumo de bebidas alcoólicas, radiações ionizantes e a ultravioleta, e os agentes biológicos, exemplificados pelo vírus da Hepatite B e C (Ward, 2002).

Esses fatores ambientais, em conjunto com o aumento da expectativa de vida da população, podem desempenhar um papel determinante no desenvolvimento do câncer. Observa-se que a incidência dessa doença aumenta proporcionalmente com o avanço da idade do indivíduo. Estudos indicam uma correlação entre a formação de tumores e o acúmulo de fatores carcinogênicos específicos. Este fenômeno ocorre em paralelo à diminuição da eficácia dos mecanismos de reparação celular do organismo à medida que a idade avança (OPAS, 2018).

4.1.2 Dados epidemiológicos

O câncer representa uma das questões mais alarmantes de saúde pública global, sendo uma das principais causas de óbito e, conseqüentemente, uma das barreiras ao aumento da expectativa de vida em todo o mundo. Em alguns países, é a segunda causa de morte prematura antes dos 70 anos (INCA, 2020).

De acordo com os dados da Globocan (Global Cancer Observatory) de 2020, conforme elaborados pela International Agency for Research on Cancer (Iarc), indicam que houve 19,3 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo (18,1 milhões excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). Ou seja, um em cada cinco indivíduos enfrentará o câncer em algum momento ao longo da vida. Os dez principais tipos de câncer representam mais de 60% do total de novos casos.

No o triênio de 2023 a 2025, como apresentado na figura 2, a projeção para o Brasil é de 704 mil novos casos de câncer, excluídos os casos de câncer de pele não melanoma se reduz para 483 mil casos. Este último é previsto como o mais prevalente, com 220 mil novos casos (31,3%), seguido pelos cânceres de mama, totalizando 74 mil (10,5%); próstata, com 72 mil (10,2%); cólon e reto, apresentando 46 mil (6,5%); pulmão, com 32 mil (4,6%); e estômago, registrando 21 mil (3,1%) novos casos. Como demonstrado na figura 2, estima-se que, em homens, os tipos de câncer mais frequentes serão pele não melanoma, com 102 mil (29,9%) novos casos; próstata, com 72 mil (21,0%); cólon e reto, com 22 mil (6,4%); pulmão, com 18 mil (5,3%); estômago, com 13 mil (3,9%); e cavidade oral, com 11 mil (3,2%). Entre as mulheres, os cânceres de pele não melanoma, com 118 mil (32,7%); mama, com 74 mil (20,3%); cólon e reto, com 24 mil (6,5%); colo do útero, com 17 mil (4,7%); pulmão, com 15 mil (4,0%); e tireoide, com 14 mil (3,9%) novos casos, serão os mais proeminentes (INCA, 2023).

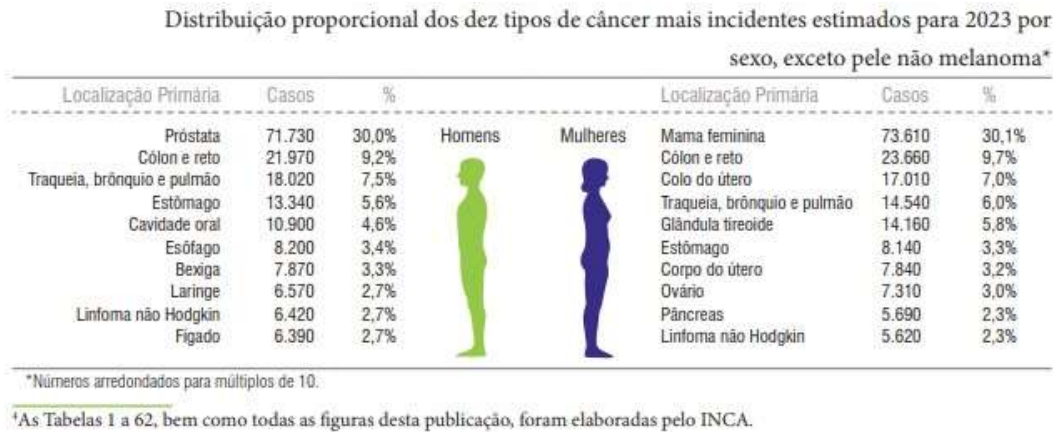


Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes (INCA, 2023).

4.1.3. Via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK

Neste estudo, será abordada uma das principais vias de sinalização relacionadas à tumorigênese: a via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK. Inicialmente, a via da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) está diretamente ligada à sinalização de ERK (proteína quinase regulada por sinalização extracelular), sendo consideradas parte da mesma família. Portanto, a via ERK/MAPK é responsável pela regulação de diversas funções biológicas das células, como crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose celular, além de estar associada à formação de tumores. A proteína Ras, uma proteína G, interage no início desta via de sinalização, e é ativada por estimulantes como fator de crescimento endotelial (EGF) e fator de necrose tumoral, através do receptor de crescimento endotelial (EGFR). Vírus, citocinas, ligantes dos receptores acoplados à proteína G e oncogenes podem ativar a via ERK/MAPK, resultando em ação antiapoptótica e aumento na proliferação celular, características marcantes de células cancerosas (Guo et al., 2020; Kobet et al., 2014).

Como sintetizado por Kobet et al. (2014) e Garavello (2011), o mecanismo de ativação dessa via envolve a interação dos ligantes com o receptor EGF. Quando essa interação ocorre, o complexo Grb2/SOS intracelular acopla-se ao receptor, promovendo a ativação das proteínas Ras. Essas proteínas iniciam a cascata de sinalização, fosforilando e ativando a proteína quinase Raf, que por sua vez realiza a mesma atividade ao fosforilar e ativar a proteína MEK (MAP quinase-quinase).

Finalmente, a MEK fosforila e ativa a ERK MAPK (MAP quinase), como ilustrado na figura 3. Dessa forma, ocorre a regulação de genes alvo responsáveis pela transcrição, tradução, ciclo celular e apoptose. Cerca de 30% dos cânceres humanos estão relacionados com mutações pontuais dos genes da família RAS (H-RAS, K-RAS e N-RAS). O gene Ras já demonstrou ser um fator crucial juntamente com uma série de receptor ativado de tirosina quinases, dentre eles o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Além disso, a ativação de ERK pode desencadear a superexpressão de ligantes de EGFR e um crescimento autócrino crítico na tumorigênese, portanto, esses genes tornam-se visados para novas estratégias terapêuticas em cânceres (Santarpia, 2012).

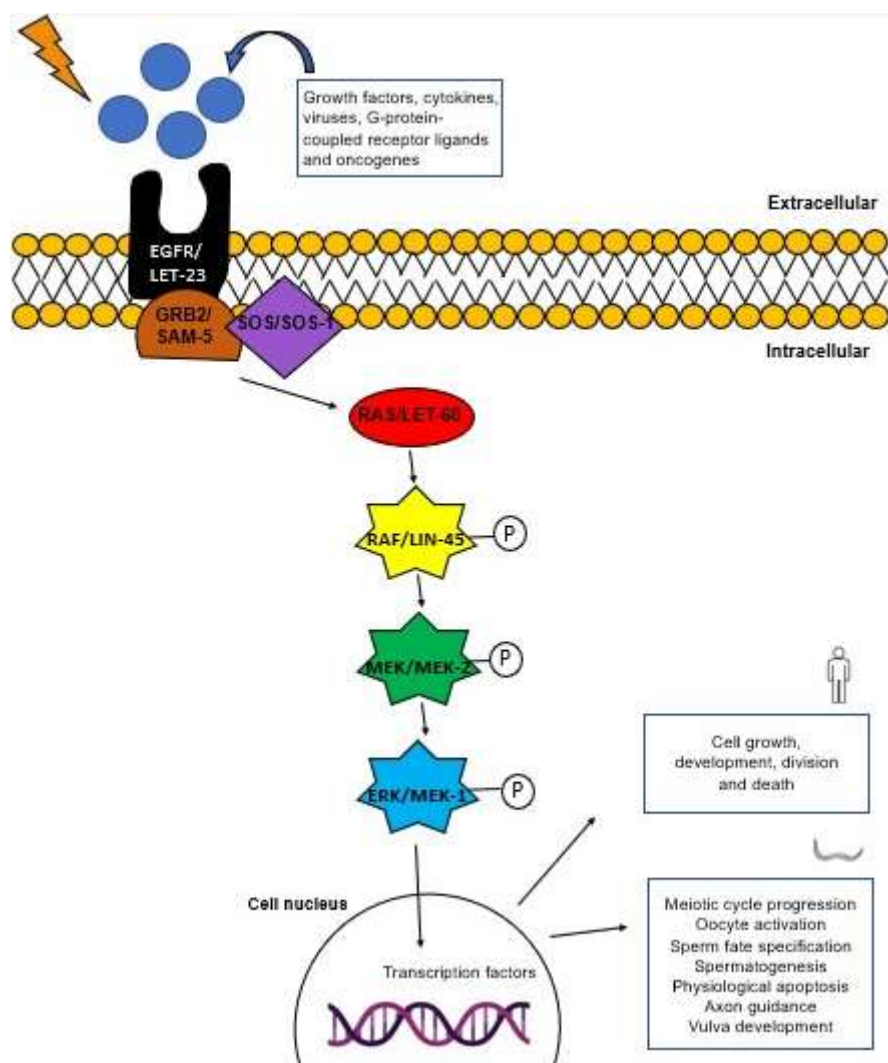


Figura 3 – Via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK (Silva et al., 2022).

4.1.4. Terapias contra o câncer

A possibilidade de utilizar e manipular drogas antineoplásicas foi considerada desde o início do século XX, quando se vislumbrou a perspectiva de incorporar moléculas de baixo peso molecular à terapia contra o câncer (Mota, 2015). Nos últimos anos, houve o registro de diversos agentes quimioterápicos, categorizados de acordo com seus mecanismos de ação. Estes incluem fármacos citotóxicos, antimetabólitos, antibióticos citotóxicos, derivados de plantas, hormônios, inibidores de proteína quinase, anticorpos monoclonais, entre outros (OPAS, 2018). Diante da variedade de fármacos disponíveis para o tratamento de diferentes tipos de câncer, um diagnóstico preciso realizado pelo oncologista é fundamental para determinar a terapia mais adequada e indicada para o paciente. Assim, a terapia medicamentosa visa a cura, a prolongação da vida ou a promoção do tratamento paliativo do indivíduo (Rang et al., 2020).

Uma das modalidades de tratamento contra o câncer que vem sendo amplamente utilizada é a imunoterapia. Tem como princípio a ativação do sistema imunológico do paciente. Os principais tipos de imunoterapia utilizados atualmente incluem anticorpos monoclonais, vacinas contra o câncer e as células CAR-T. Quando o sistema imunológico responde, os efeitos podem ser significativos e duradouros, devido à criação de uma memória imunológica. A imunoterapia é considerada um avanço significativo no tratamento do câncer (Brasil, 2023). Outra forma de tratamento é através da radioterapia, a qual são empregadas radiações ionizantes como forma de energia para destruir as células tumorais ou impedir sua multiplicação. Este tipo de terapia pode levar ao desaparecimento do tumor, controlar a doença, reduzir o tamanho do tumor para aliviar a pressão, diminuir hemorragias, dores e outros sintomas, proporcionando alívio ou, em alguns casos, levando à cura. Em determinadas situações, a radioterapia pode ser combinada com a quimioterapia (INCA, 2023).

Já na quimioterapia cada vez mais novos agentes farmacológicos de origem vegetal têm sido explorados em pesquisas nessa área, e esses produtos derivados de plantas podem ser subdivididos em diversas classes, conforme descrito por Brandão et al. (2010) e Li et al. (2022), com base em seus mecanismos de ação. Uma das interações descritas envolve a atuação de antineoplásicos no DNA celular, inibindo suas funções metabólicas. Destacam-se, entre eles, os medicamentos

irinotecan e topotecan, que agem inibindo a atividade da enzima topoisomerase I. Esses fármacos têm como base o alcaloide camptotecina, isolado da árvore ornamental chinesa *Camptotheca acuminata* Decne. O hidrocloreto de irinotecan (Camptosar) é indicado para o tratamento de câncer colorretal metastático, enquanto o hidrocloreto de topotecan (Hycamtin) é utilizado no combate ao câncer ovariano metastático. Outro exemplo é a podofilotoxina, que deu origem aos derivados semissintéticos etoposídeo e teniposídeo. Estes atuam bloqueando a fase S ou o início da fase G2 do ciclo celular pré-mitótico, através de sua interação com a topoisomerase II, inibindo sua atividade (Brandão et al., 2010).

Outra categoria de fármacos inclui aqueles que se ligam aos microtúbulos, estruturas fundamentais para a composição do citoesqueleto, sendo responsáveis pelo desenvolvimento e pela forma das células, além de desempenharem papéis cruciais no transporte de moléculas, sinalização celular e no processo de mitose. Duas substâncias ativas notáveis com essa atividade são vimblastina e vincristina, representantes dos alcaloides de Vinca, isoladas das folhas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. O mecanismo de ação dessas substâncias envolve a ligação às β -tubulinas, resultando na inibição da polimerização dos microtúbulos. Por outro lado, o paclitaxel, embora pertencente à mesma classe, diferencia-se em sua atividade, pois atua como estabilizador de microtúbulos, inibindo sua despolimerização e, conseqüentemente, induzindo a morte celular. Este composto é um diterpeno da família dos taxanos extraído da casca da árvore *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae). A vimblastina (Velban) é utilizada na terapia da doença de Hodgkin e do câncer testicular, enquanto a vincristina trata leucemia e linfomas. Já o paclitaxel e seus derivados são indicados para o tratamento de câncer de pulmão, ovário e mama (Brandão et al., 2010).

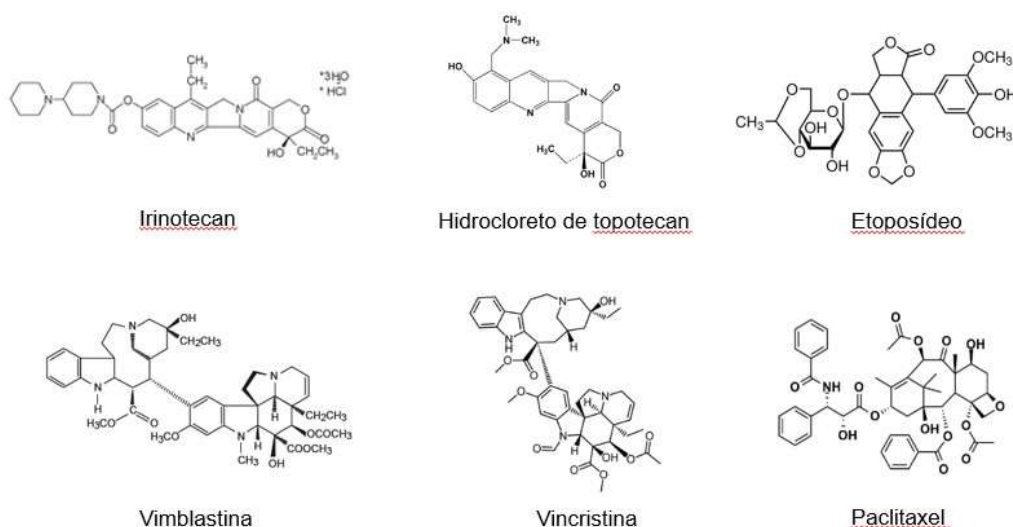


Figura 4 - Exemplos de estruturas moleculares de quimioterápicos derivados de plantas. Imagem criada pela autora.

De acordo com a literatura, muitos estudos mostram interesse na busca por novas substâncias ativas com propriedades quimioterápicas. Além disso, vale ressaltar que a maior parte das terapias atuais ainda levam o paciente a sofrer com efeitos adversos agressivos, alguns deles são: queda de cabelo, prisão de ventre, diarreia, feridas na boca, enjoo e vômito, hiperpigmentação, entre outros, os quais prejudicam a qualidade de vida do indivíduo. Tendo em vista estes contrapontos, torna-se de extrema importância a busca por novas substâncias ativas com propriedades quimioterápicas. (INCA, 2010; Joshny; Devi; Hari, 2012).

4.2 FLOROGLUCINÓIS

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças sempre foi uma prática constante, desde os primórdios da civilização humana até os dias atuais. Nesse contexto, a busca por novos agentes terapêuticos de origem natural está associada a uma diversidade de fitoquímicos com efeitos biológicos, os quais têm sido cada vez mais explorados em pesquisas (Saleem; Aleem; Usman; Mahomoodally, 2020; Joshny; Devi; Hari, 2012).

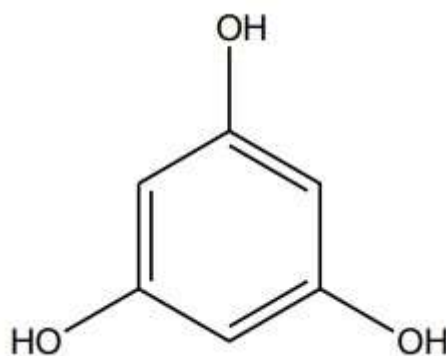


Figura 5 – Estrutura molecular de floroglucinóis (Lunardelli et al., 2015).

Esta categoria abrange compostos que consistem em duas unidades de floroglucinol conectadas por uma ligação de metileno ou pela formação de um anel cromano. Seus derivados são uma importante classe de metabólitos secundários, incluídos na classe de compostos fenólicos encontrados em alimentos e identificados em diversas famílias de plantas (Lunardelli et al, 2015). Esses compostos são predominantemente encontrados em gêneros como *Dryopteris* e *Aspidium* (samambaias), *Myrtus*, *Mallotus*, *Hypericum*, *Eucalyptus* e *Helichrysum*. Além disso, foram identificados em algumas espécies dos gêneros *Kunzea*, *Acronychia*, *Hagenia*, *Euphorbia*, *Agrimonia* e *Melicope*. Relatos também indicam a presença desses compostos em alguns microorganismos (El Gaafary, 2022).

Compostos pertencentes à classe dos floroglucinóis estão sendo cada vez mais objeto de estudo para avaliar sua atividade antitumoral. Em um estudo *in vitro* foram utilizadas células cancerígenas CD44, nas quais se observou uma redução de sua população após tratamento, juntamente com alterações na expressão de reguladores diretamente relacionados à tumorigênese, incluindo Sox2, CD44, Oct4, Notch2 e β -catenina. É relevante ressaltar que o floroglucinol sintético (1, 3, 5-trihydroxybenzene) demonstrou capacidade de inibir o gene KRAS, bem como as vias de sinalização subsequentes, como a PI3K/AKT e RAF-1/ERK (Kim et al., 2015).

Em um estudo adicional, um floroglucionol, derivado de um florotanino presente em algas marrons, foi empregado para suprimir a capacidade metastática das células de câncer de mama. Ele efetivamente inibiu os fenótipos mesenquimais das células de câncer de mama do tipo basal, sem induzir efeitos citotóxicos. Além disso, observou-se a inibição das vias de sinalização PI3K/AKT e RAS/RAF-1/ERK. De acordo com dados obtidos *in vitro*, a molécula também demonstrou eficácia contra

metástases *in vivo* de células de câncer de mama, resultando na supressão significativa de sua capacidade metastática para os pulmões e no prolongamento da sobrevida dos ratos (Kim et al., 2015).

Outro exemplo de isolado pertencente ao mesmo grupo é a calcitrinona A, que demonstrou inibição da proliferação e indução de apoptose nas células MDA-MB-231 (uma linha celular de câncer de mama triplo-negativo). Este efeito foi acompanhado pela redução dos níveis totais de ATP intracelular. A confirmação desses efeitos *in vivo* foi realizada utilizando xenotransplantes de câncer de mama, nos quais se observou acúmulo de células na fase S do ciclo celular, e em ensaios com cavalos-marinhos, nos quais foi observada uma inibição precoce da fosforilação oxidativa mitocondrial. Além disso, um ensaio *in silico* foi conduzido por meio de docking, revelando que a Calcitrinona A apresentou alta afinidade com a SQR (succinato-coenzima Q redutase), exibindo atividade inibitória (El Gaafary, 2022).

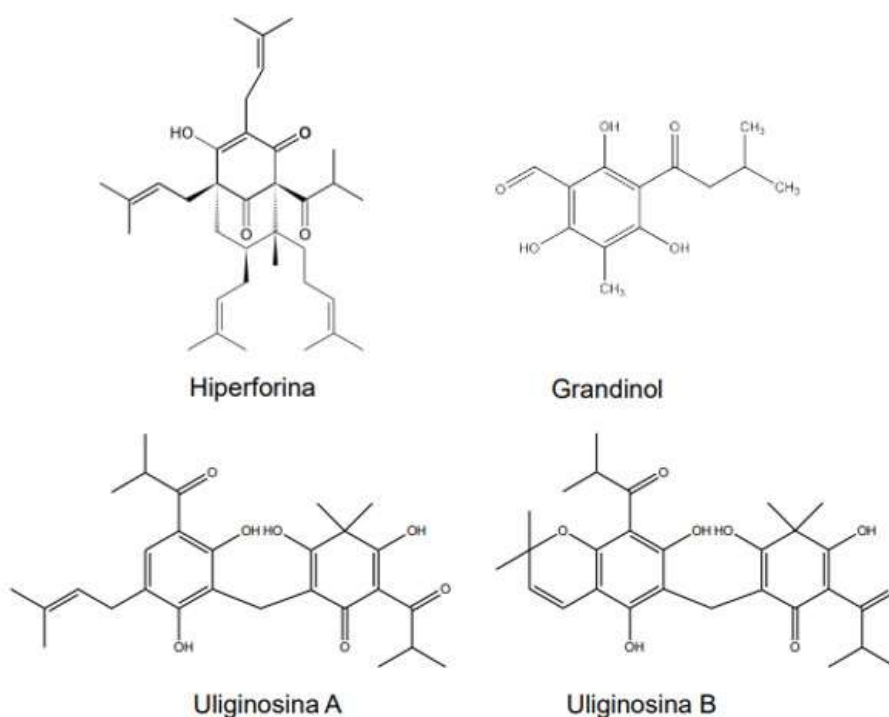


Figura 6 – Exemplos de derivados da classe dos floroglucinóis (Lunardelli et al., 2015).

4.2.1 Uliginosina B

A uliginosina B (ULI) é um acilfloroglucinol natural, representada na figura 8,

que ocorre em *Hypericum caprifoliatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum*, *H. carinatum*, *H. linoides*, *H. perforatum* L. (Figura 7), dentre outras espécies, sendo nativas do sul do Brasil. Foi proposto como uma nova estrutura molecular para o desenvolvimento de fármacos, devido a achados em pesquisas que envolvem ações analgésicas, antidepressivas, antimicrobiana, antifúngica e antiproliferativa (Tocci et al., 2020; Bridi et al., 2022). Nestes estudos pré-clínicos, a molécula apresentou-se promissora, porém ainda precisa-se investigar seu mecanismo de ação mais a fundo (Stolz et al., 2016).



Figura 7 – Imagem ilustrativa da espécie *Hypericum perforatum* L. (Horto Didático de Plantas Medicinais do (HU)/(CCS) – UFSC, 2020)

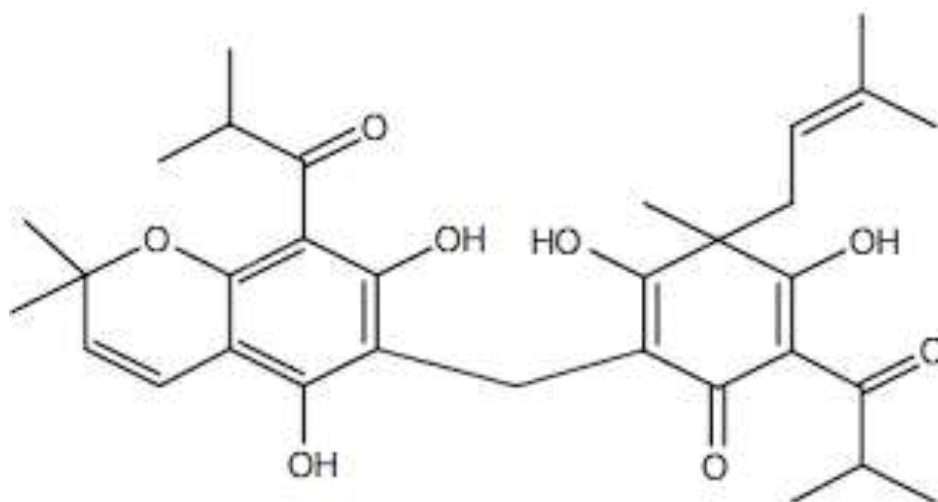


Figura 8 – Estrutura química da ULI (Sakamoto et al, 2012).

Um deles é de Stolz e colaboradores (2014) que avaliaram os efeitos antinociceptivos e de coordenação motora da ULI em camundongos por meio dos testes de placa quente (15 e 90 mg/kg, ip) e rotarod (90 mg/kg, ip). Os resultados corroboram a influência da neurotransmissão monoaminérgica e representam a primeira evidência da participação da neurotransmissão glutamatérgica nos efeitos da ULI. Também já foi observado seu efeito antinociceptivo nos testes de placa quente e contorções abdominais em camundongos, em doses que não comprometeram a coordenação motora (15 mg/kg, i.p.). Em doses mais elevadas (90 mg/kg, i.p.), a ULI manifestou efeito atáxico no aparelho rotarod, entretanto, a ativação dos receptores parece ser indireta, uma vez que a ULI não se ligou aos receptores opioides e dopaminérgicos. Dessa forma, sua ação antinociceptiva provavelmente decorre de sua capacidade de inibir a recaptação de monoaminas, resultando na ativação dos receptores de dopamina e na estimulação indireta do sistema opioide (Stolz et al, 2012).

Por sua vez, diferentes sistemas foram avaliados como alvos da ULI, a fim de investigar mecanismos farmacológicos e toxicológicos da mesma. O sistema purinérgico contribui para a modulação e regulação da síntese de monoaminas e possui importância na transmissão de dor. A ULI demonstrou ter efeito antinoceptivo *in vivo* neste sistema através da sua ação na sua interação com a enzima AMPCP (ecto-5-nucleotidase) em ensaios *in silico* (Stolz et al., 2016).

Como citado anteriormente, seu efeito foi visto em microrganismos, investigando sua ação antimicrobiana e antifúngica. Seu efeito antimicrobiano foi

demonstrado por seu valor de concentração inibitória mínima, com menor valor para *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), resistente a metilina *S. aureus* (MRSA) e *S. aureus* resistente MLSb (Bridi et al., 2022). E sua atividade antifúngica foi confirmada pela análise quimiogenômica, ensaio onde avalia genes que estão relacionados a resistência e sensibilidade à um composto com possível ação antifúngica. O estudo sugere que a ULI pode agir na regulação da expressão do gene CCT5 (subunidade da chaperonina citosólica), importante na regulação do ciclo celular e outras funções essenciais para a célula, tendo um efeito significativo no bloqueio da morfogênese das hifas em *Candida* (Tocci et al., 2020). Já em parasitas, observou-se sua atividade leishmanicida contra *L. amazonenses*, principalmente quando associado a outro floroglucinol, o qual apresentou como possível mecanismo de ação a disfunção mitocondrial no parasita (Dagnino et al., 2017). Além da sua ação anti-*Trichomonas vaginalis*, porém com baixa seletividade, pois também tem efeito citotóxico contra células de mamíferos (células epiteliais renais) (Cargnin et al., 2012).

A ULI possui distintas atividades investigadas desde *in silico* até *in vivo*. Na literatura alguns de seus efeitos observados *in vitro* foi sua ação proliferativa. Utilizando frações enriquecidas de floroglucinóis (PEF) foi possível observar aumento da viabilidade celular de HaCat (linhagem celular de queratinócitos), sendo confirmado seu efeito por ter maior quantidade de células nas fases S e G2/M nas células tratadas com PEF nas concentrações de 10 e 15 µg/mL (Bridi et al., 2016). Em estudo posterior, foi relatado ação proliferativa da ULI em células-tronco mesenquimais e em fibroblastos MRC5, nas concentrações de 10 mM e 5 mM respectivamente, analisado pelo ensaio MTT *in vitro* (Bridi et al., 2019).

Também foram avaliadas características farmacocinéticas para compreender melhor seu mecanismo de ação. Seus parâmetros de toxicidade previstos indicaram uma baixa toxicidade para a maioria dos compostos. Como a maioria dos floroglucinóis não prenilados, este resultado estava em conformidade com os critérios da regra de Lipinski, o qual prevê em ensaios *in silico* a farmacocinética de um composto químico para sua administração oral (Da silva et al., 2023). Além disso, foi investigado o efeito antiproliferativos *in vitro* de dois floroglucinóis diméricos, incluindo a ULI, isolados de *Hypericum myrianthum*. Os floroglucinóis foram eficazes na redução da viabilidade na linhagem celular OVCAR-3. Portanto estes resultados

preliminares indicam um potencial terapêutico combinado desses compostos para certos tipos de tumores, fornecendo uma base científica para investigações futuras (Pinhatti et al, 2013).

4.3 *Caenorhabditis elegans*

O organismo modelo proposto por Sydney Brenner em 1965, *Caenorhabditis elegans*, é um nematoide não-parasita (Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016) de vida livre, encontrado globalmente em matéria vegetal e animal em decomposição, onde obtém seu suprimento alimentar a partir de bactérias. Em ambientes laboratoriais, sua cultura é controlada em meio de crescimento de nematoide (nematode growth medium – NGM), mantida a 20°C em uma incubadora, com a bactéria *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento. Pode ser mantido em meio sólido NGM (NaCl, peptona, ágar bacteriológico, KHPO₄, CaCl₂, MgSO₄, colesterol, nistatina e estreptomicina) ou no meio K (KCl e NaCl), sendo este líquido (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015).

Este organismo tornou-se um modelo animal aplicado em estudos biológicos celulares, genéticos e neurobiológicos, visando identificar e compreender a funcionalidade de mecanismos de transporte nuclear. Assim, contribui para a elucidação de vias bioquímicas relacionadas a doenças como obesidade, diabetes e doença de Alzheimer. Além disso, o nematoide é empregado no reconhecimento de mecanismos de ação de novas drogas, especialmente anti-helmínticos. O nematoide destaca-se também em pesquisas na área toxicológica, sendo explorado em ensaios que avaliam poluentes ambientais. Os experimentos são categorizados com base em parâmetros biológicos, tais como sobrevivência, crescimento, locomoção, fertilidade, reprodução, autofluorescência, metabolismo, desenvolvimento, alimentação e tempo de vida. Além disso, são utilizados marcadores celulares que determinam estresse oxidativo, mudanças em genes ou expressão proteica, RNA interferente, apoptose celular, parada do ciclo celular, dano no DNA ou expressão da proteína verde fluorescente (GFP) (Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016).

Suas características fazem dele um modelo de estudo essencial para diversos tipos de pesquisas. O *C. elegans* foi o primeiro organismo multicelular com o genoma completamente sequenciado, compartilhando entre 60% e 80% dos genes humanos um ortólogo em seu genoma. Destes, 38% representam genes codificadores de

proteínas ortólogas ao genoma humano, enquanto 40% dos genes associados a doenças humanas têm ortólogos no *C. elegans* (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015). A notável performance desse modelo na genética, aliada à sua estrutura simples, resultou no desenvolvimento de várias ferramentas, documentadas na literatura, incluindo milhares de cepas mutantes e transgênicas caracterizadas e a aplicação de RNA interferente (silenciamento da expressão de genes) (Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016).

Além disso, o modelo apresenta vantagens que facilitam sua manutenção e uso em ensaios experimentais, como a capacidade de auto-fertilização do hermafrodita, a possibilidade de congelamento da população por longos períodos e sua reutilização conforme necessário, tamanho pequeno que permite crescimento e armazenamento com facilidade, e um intervalo de temperatura de desenvolvimento entre 12°C e 25°C (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015). O corpo transparente do *C. elegans* possibilita a visualização de tipos celulares em todos os estágios de desenvolvimento. Na fase adulta, após passar por quatro estágios larvais, o hermafrodita possui 959 células, incluindo 302 neurônios, enquanto os machos têm 1031 células (Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016). No estágio inicial (L1), o organismo tem 0,25mm de comprimento, chegando a 1 mm quando adulto. Como representado nas imagens da figura 5, este nematoide passar por quatro estágios larvais (L1 a L4) até chegar na idade adulta (hermafrodita e macho) (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015). A maioria da população desses nematoides é composta por hermafroditas, cujo sistema reprodutor inclui dois ovários, ovidutos, uma espermateca e um útero. Os hermafroditas começam a produzir espermatozoides na fase larval L4 e oócitos nos primeiros dias de vida adulta. Seu ciclo reprodutivo dura entre 2,5 a 4 dias, e apresentam uma expectativa de vida entre 12 e 20 dias (Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016).

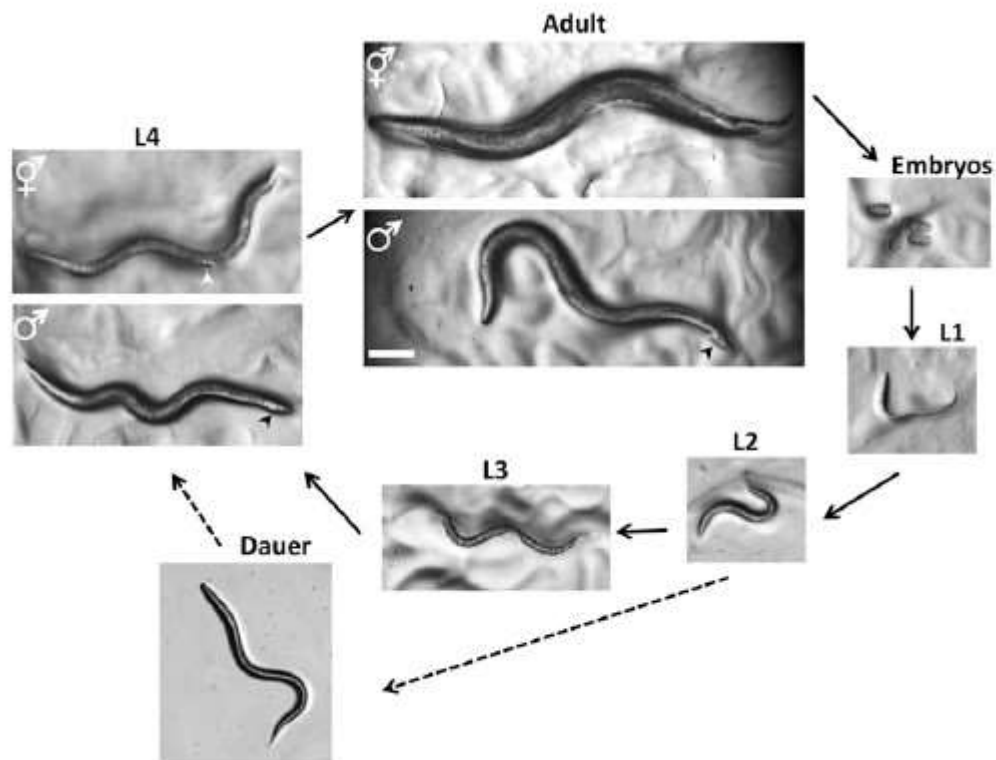


Figura 9 – Ciclo de vida do nematoide *Caenorhabditis elegans* (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015).

4.4. *C. elegans* e modelos de câncer

Como mencionado anteriormente, o *C. elegans* é um modelo de pesquisa com inúmeras vantagens para a análise genética, molecular e celular de genes associados a doenças humanas. De maneira mais específica, estudos têm explorado aspectos da evolução, desenvolvimento, especificação do destino celular, regulação das células-tronco, tumorigênese e envelhecimento (Kobet et al., 2014).

Para uma compreensão mais aprofundada das vias moleculares e fisiológicas da tumorigênese, é crucial considerar suas características-chave, tais como proliferação contínua, resistência à morte celular, instabilidade do genoma, indução da angiogênese, invasividade, metástase e desregulação do metabolismo energético. A elucidação desses mecanismos biológicos facilita o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para conter ou prevenir a formação de tumores. Portanto, a escolha deste modelo animal, com foco nos processos de autofagia e apoptose, pode ajudar a esclarecer a base molecular das células cancerosas, utilizando seus recursos

de mutação gênica, além de possibilitar a identificação de novos agentes anticâncer (Kyriakakis et al., 2015).

Os mecanismos abordados neste estudo estão diretamente relacionados a uma das cepas transgênicas utilizadas nos ensaios experimentais, a cepa MT4244 (*unc-24(e138); let-60(n1046) IV*). Como já mencionado anteriormente, a via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK é conservada em diversas espécies, incluindo o nematoide *C. elegans* (Kobet et al., 2014). Portanto, a via Ras/Raf/MEK/ERK no nematoide apresenta muitas semelhanças com a dos humanos. Um dos receptores transmembrana, LET-23 (homólogo do EGFR), estimula a ativação do LET-60 (homólogo de Ras), iniciando a cascata composta por LIN-45 (homólogo de Raf), MEK-2 (homólogo de MEK-1) e MPK-1 (homólogo de ERK). Essa via desempenha funções como a progressão do ciclo meiótico, ativação do oócito, especificação do destino dos espermatozoides, espermatogênese, apoptose fisiológica, orientação de axônios e desenvolvimento da vulva (Kobet et al., 2014). Considerando a relevância dessa via no desenvolvimento de tumores, optou-se por utilizar um modelo de hiperplasia com esse genótipo, no caso, a cepa MT4244. A superexpressão do gene *let-60*, apresentada por ela, é responsável pela regulação positiva do desenvolvimento da vulva, localizada no córtex celular em estruturas da linhagem germinativa do nematoide, com a formação do fenótipo chamado multivulvas ou pseudovulvas (Figura 10). Além disso, esse gene possui homólogos humanos associados ao câncer de glândula endócrina, câncer do sistema gastrointestinal e ao HRAS humano (proto-oncogene HRas, GTPase) (WORMBASE, 2021). A utilização dessa cepa transgênica em pesquisas visa a ensaios com substâncias que possam modular negativamente a via Ras/Raf/MEK/ERK, objetivando-se a prevenção ou atraso da formação de multivulvas.

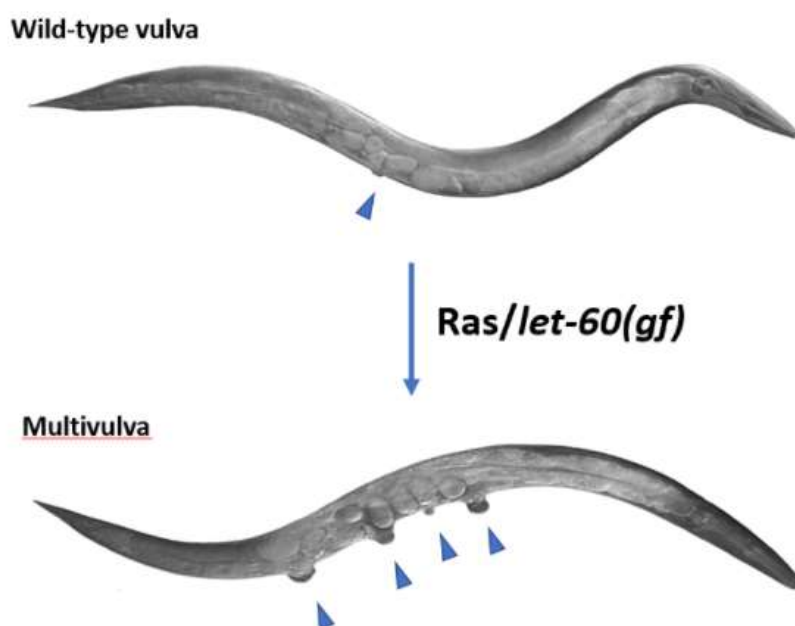


Figura 10 - Comparação entre cepa N2 (tipo selvagem) e transgênica *let-60* (multivulva) (Sickkids, 2021).

Estudos anteriores do nosso grupo utilizaram a cepa mutante MT4244 para avaliar o potencial antitumoral do extrato de brácteas de *Bougainvillea glabra* Choisy, a qual demonstrou, na concentração de 50 µg/mL, causar redução da área de hiperplasia e a frequência do desenvolvimento do fenótipo nos vermes tratados, além da média de tumores por verme (Pereira et al., 2024). Já no estudo descrito por (Medina et al., 2021), verificou-se que quando expostos ao etodolac e ao itraconazol, a redução no fenótipo foi mais expressiva com uma menor concentração ($p=0,0021$) em comparação aos outros medicamentos testados com a cepa MT2124. As contagens foram realizadas ao longo de 120 horas a 15°C.

Adotando esse modelo alternativo para ensaios iniciais, almeja-se avaliar a segurança da ULI e esclarecer seu mecanismo farmacológico. Como mencionado, este modelo também é empregado na pesquisa de novas terapias contra o câncer. Isso proporciona uma abordagem que se assemelha a algumas alterações e sinais encontrados na patologia (Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016).

4.5. Docking molecular

A busca por novos medicamentos é um desafio complexo, que inclui testes *in vitro* de potenciais fármacos, validação *in vivo*, entre outras etapas. A identificação do composto principal desempenha um papel crucial no sucesso do projeto, antes dessas fases, os pesquisadores precisam conduzir uma análise abrangente das moléculas candidatas. Porém, testar um vasto banco de dados, mesmo em ambiente *in vitro*, é um procedimento demorado e com custo elevado. De fato, o processo de descoberta de medicamentos geralmente leva cerca de 12 anos desde o início até a comercialização, com um custo de aproximadamente de 1,8 bilhões de dólares. O Centro Tufts para o Estudo do Desenvolvimento de Medicamentos, em 2016, relatou um aumento de quase 145% nos custos associados ao desenvolvimento e lançamento de novos medicamentos na última década (Stanzione; Giangreco; Cole, 2021; Crampon et al., 2022). Assim, a utilização do docking molecular para prever a posição, orientação e conformação ideal de uma molécula pequena (Figura 11), candidato a fármacos, ao interagir com uma proteína apresenta a vantagem adicional de facilitar a otimização durante o desenvolvimento de fármacos. Essa abordagem não apenas é crucial para identificar possíveis efeitos colaterais de medicamentos ou toxicidades moleculares, mas também desempenha um papel fundamental na farmacodinâmica (Stanzione; Giangreco; Cole, 2021).

Possuir uma compreensão precisa de como e onde a molécula de interesse se liga permite a concepção de modificações de maneira deliberada, visando aprimorar a interação proteína-ligante, melhorar a atividade e prevenir modificações que possam resultar em conflitos entre a proteína e o ligante (Stanzione; Giangreco; Cole 2021). O acoplamento molecular utiliza as estruturas tridimensionais de duas moléculas, o ligante e o alvo, para antecipar a orientação preferida do primeiro em relação ao segundo quando ligados entre si, formando assim um complexo estável. Para tanto, conta com a ajuda do Protein Data Bank (PDB) que é utilizado por ser um banco de dados de estruturas 3D de proteínas e inclui quase 90% das estruturas resolvidas com cristalografia de raios X (e quase 99% se apenas as estruturas para as quais a afinidade de ligação ligante-proteína for conhecida). Na descoberta de agentes farmacológicos, o ligante é um princípio ativo e o alvo é uma macromolécula biológica (por exemplo, uma proteína ou DNA). No entanto, o docking cobre uma gama mais ampla de possibilidades de pares: proteína-DNA, proteína-RNA, proteína-açúcar, proteína-peptídeo e compostos proteína-pequenos. Portanto é uma ferramenta com

objetivo de reduzir o tempo e os custos associados ao desenvolvimento de medicamentos, facilitando o trabalho dos investigadores e das indústrias farmacêuticas (Crampon et al., 2022).

Existem muitos estudos que usam como ferramenta o docking molecular para elucidar o mecanismo de ação pelo qual a molécula testada age. Tang e colaboradores (2020) realizaram ensaios experimentais com células HeLa, das linhagens celulares PANC-1 e MDA-MB-231 com novos compostos isolados dos frutos de *Garcinia nujiangensis*, da classe dos acilfloroglucinois, e estes apresentaram atividade citotóxica moderada. Para explicar seu mecanismo antitumoral, os autores realizaram acoplamento virtual com a proteína mTOR (uma serina/treonina-proteína quinase), o que confirmou os achados nos ensaios *in vitro*.

Neste estudo a proteína alvo escolhida foi o EGFR. Este receptor passa por dimerização na presença de seu ligante no domínio extracelular. Esse evento inicia cascatas de sinalização, ativando o domínio quinase intracelular, seguido por autofosforilação. Esse processo está diretamente envolvido na formação de metástase, proliferação celular e angiogênese. O EGFR é objeto de estudo devido ao seu papel crucial em processos celulares e mutações nesse receptor podem levar ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer (Roney, 2023). Alguns inibidores do EGFR já estabelecidos na terapia são: Erlotinibe, Afatinibe, Gefitinibe, Osimertinibe (células com mutação T790M), Dacomitinibe e Amivantamabe (mutação do exon 20). Todos estes medicamentos são utilizados no tratamento de câncer de pulmão de não pequenas células com mutações no gene EGFR, porém destacam-se diversos efeitos colaterais, dentre eles: erupções cutâneas no rosto e no tórax, infecções na pele, diarreia, aftas, perda de apetite, alteração do ritmo cardíaco, entre outros (American Cancer Society, 2022).

Este receptor vem sendo bastante utilizado para estudos com docking molecular através da sua forma co-cristalizada disponível no PDB. Os modelos que foram escolhidos para este trabalho foram o EGFR humano na sua forma ativa (código PDB: 7KXZ), na sua forma inativa (código PDB: 1M14) e seu homólogo em *C. elegans*, LET-23 (código PDB: 5WNO) (Beyett et al., 2022; Liu et al., 2018; Stamos, Sliwkowski, Eigenbrot, 2002).

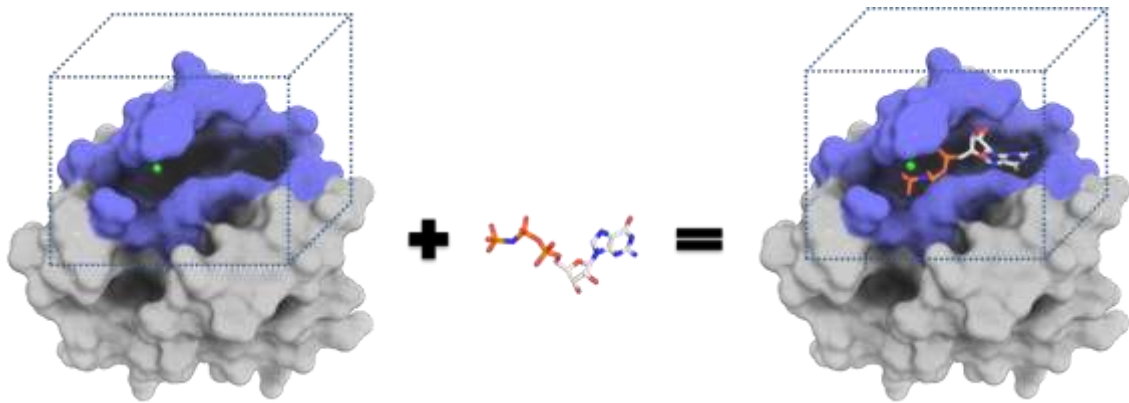


Figura 11 – Imagem ilustrativa da interação de uma proteína alvo e seu ligante (GMMSB, 2019).

5. MATERIAIS, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está organizada na forma de um manuscrito científico que será submetido à revista Chemistry & Biodiversity. Neste contém descritos os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas que fazem parte desta dissertação.

5.1 Manuscrito

Evaluation of the antiproliferative action of uliginosin B *in silico* and *in vivo* using the nematode *Caenorhabditis elegans*

Maria Eduarda O. de Souza^{1,4}, Flávia Suelen de O. Pereira^{1,4}, Analluzi Copceski¹, Gilsane von Poser², Stela M. K. Rates², Favero R. Paula³, Daiana S. Ávila^{1,4}

¹ Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans*,
Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana-RS, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do
Rio Grande Do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil

³ Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de medicamentos, Universidade
Federal do Pampa, Campus Uruguaiana-RS, Brasil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa,
Campus Uruguaiana-RS, Brasil

***Corresponding author:** Daiana Silva de Ávila, Laboratório de Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans*, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, RS, Brasil, daianaavila@unipampa.edu.br.

5.2 Abstract

Cancer is considered one of the main public health problems, being the second highest cause of death in the world. The use of drugs derived from natural products is already in the clinic, but molecules that are more effective and have fewer adverse effects have been continuously investigated. *In vitro* studies have already reported possible antiproliferative action of the bioactive compound uliginosin B (ULI), a dimeric fluroglucinol extracted from *Hypericum* species. However, no *in vivo* evidence of this effect has been obtained. Therefore, the objective of this work was to evaluate its antiproliferative activity through the Ras pathway using the nematode *Caenorhabditis elegans*, and also to obtain *in silico* evidence using molecular docking. For the *in vivo* assays, the strains used were N2 (wild type) and MT4244 (*unc-24(e138); let-60(n1046) IV*), which presents a gain of function in the homologous Ras protein and, therefore, leads to the formation of tumorous multivulva. Worms in the L1 larval stage were exposed to ULI at concentrations of 1, 5, 10 and 20 μ M, with an acute treatment lasting 30 minutes. The experimental tests indicated that ULI was safe in terms of toxicological parameters, and the worms on their first and second day as adults demonstrated a delay in the development of the multivulva phenotype (MV), with statistical significance at 5, 10 and 20 μ M. However, they did not show any change in average amount of MV of each worm, as well as in the tumors area. In the molecular docking, the human epithelial growth factor receptor (EGFR), which starts the Ras pathway, showed a more specific interaction with ULI in relation to its homologous in *C. elegans*, confirming its interaction with the tyrosine kinase portion. So far, it is possible to suggest that ULI delayed the development of the MV phenotype, but without changing the number of tumors, and this can be explained because ULI does not present specificity in the interaction with the EGF receptor in the nematode, but perhaps can be promising against human cancer cell lines.

Keywords: molecular docking; cancer; alternative model; uliginosin B

5.3 INTRODUCTION

Active compounds derived from natural sources are abundant and have a wide spectrum of structural diversity due to the variety of metabolites across plant species (Costa-Lotufo et al, 2010; Ekiert; Szopa, 2020). Anticancer medicines originated from natural compounds account for around 60% of all chemotherapies, and in the last 30 years there has been a significant increase in studies with natural products with cytotoxic action that have contributed for the development of the current therapies. Therefore, the importance of ensuring the efficacy and safety of these molecules and the search for new therapeutic sources stands out (Costa-Lotufo et al, 2010; Rao et al, 2019).

Like other substances of interest, ULI has been used in pharmacological research. Phloroglucinol derivatives are an important class of secondary metabolites, included within the class of phenolic compounds found in foods and identified in several plant families (Lunardelli et al, 2015). ULI is present in different species of *Hypericum*, and possess several activities, including antidepressant (Stein, 2012), anticonvulsant (Lunardelli, 2015), antinociceptive (Stolz, 2011), besides acting on the purinergic system in the regulation of dopamine, (Da silva, 2022), as well as a possible antiproliferative action (Pinhatti et al., 2013). Thus, this molecule has promising activity against cancer.

An oncogenic condition presents abnormal cellular aspects that manifest due to changes in gene expression, originating from endogenous or exogenous (environmental) mutagenic agents (Ward, 2002; Rang et al., 2020). According to IARC (International Agency for Research on Cancer), an increase of around 19.3 million cases and 10 million deaths have been reported (Rang et al., 2020; INCA, 2020; IARC, 2020). These data contribute to the relevance of the search for new drugs with more effective antitumor action and fewer adverse effects (Joshny; Devi; Hari, 2012). In a study by Kang and colleagues (2014), a phloroglucinol was used to investigate its anticarcinogenic effect on the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in HT-29 human colon cancer cells. The treatment significantly inhibited the expression of Ras, Raf and the mammalian target of rapamycin (mTOR), consequently reducing the viability of colon cancer cells.

The Ras signaling pathway is one of the heavily researched targets for the development of cancer therapies. This pathway is responsible for cell proliferation and differentiation, cell cycle and anti-apoptosis action (Guo et al., 2020; Kobet et al., 2014; Garavello, 2011). The *Ras* gene, when deregulated by mutations in its isoform, is related to almost a third of all types of human cancers, such as endocrine glands and gastrointestinal system (Santarpia, 2012). We can find a homologous in *Caenorhabditis elegans*, named *let-60*. In a genetic analysis, it was seen that the nematode gene encodes a protein structure with 84% similarity, with 164 conserved amino acids of the protein encoded by the *Ras* gene from other species, thus maintaining its biochemical functions (Han; Sternberg, 1990). It is already a well-established model for screening drug candidates, including those in the antitumoral class, due to the availability of transgenic tumorous animals (Liu, 2018).

Notably, the free-living nematode *C. elegans* has around 60 to 80% of genes orthologous to humans, and for this reason, they have facilitated the development of cellular markers, gene changes or protein expression (Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016). Furthermore, its laboratory cultivation is inexpensive, as it is a hermaphrodite worm, with a maximum length of 1mm when adult, a transparent body, short reproductive cycle and lifespan. Among these advantages, it becomes a model that facilitates the understanding of biochemical pathways related to human diseases in pharmacology, and for the extrapolation of some findings to humans (Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016; Corsi; Wightman; Chalfie, 2015).

Gene mutation resources are also used to obtain strains that have changes in gene expression related to cancer, such as in mammals, in the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway (Kyriakakis, 2015). As already mentioned, in *C. elegans* this pathway triggers the expression of genes that control oocyte formation, progression of the meiotic cycle, specification of sperm fate, spermatogenesis, vulva development and apoptosis (Kobet et al., 2014). Considering *C. elegans* and also Ras/Raf/MEK/ERK, the MT4244 transgenic strain presents a gain of function of the *let-60* gene, which belongs to a pathway signaled by the interaction of its ligand (for example, EGF) with the LET-23 receptor (homologous to the human endothelial growth factor receptor – EGFR). Therefore, it has a positive regulation in the formation of the vulva, leading to the development of the multi-vulva phenotype, which is tumorous (Wormbase, 2022).

Still little is known about the antiproliferative action of ULI, therefore this study seeks to evaluate its safety and action as an antitumoral drug using the model strain of hyperplasia in *C. elegans*, , in addition to molecular modeling tools to further understand the involvement of the Ras pathway in this molecule effect.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Chemicals

Dimethyl sulfoxide (DMSO) PA ACS 1Lt was obtained from Synth (Diadema, SP, Brazil). Hydrochloric acid (HCl), ethanol, ammonium hydroxide (NH₄OH), and sodium hydroxide (NaOH) were acquired from Labsynth (Diadema, SP, Brazil). For the *C. elegans* analyzes we use levamisole (RIPERCOL® L 150F; SP, Brazil). All other reagents were of analytical grade and were obtained from local suppliers.

5.4.2 ULI Extraction and isolation

The aerial parts of *H. polyanthemum* were used to isolate ULI, and it was chemically characterized by chromatography and spectroscopy methods (STOLZ, 2012), by the research group of Prof. Dr. Gilsane von Poser (Pharmacognosy Laboratory, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS).

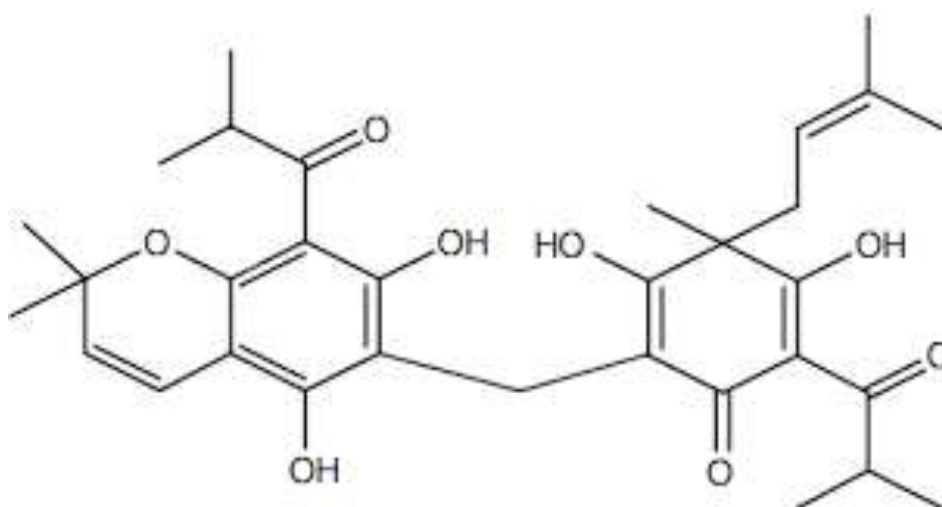


Figure 1 - Chemical structure of ULI (Sakamoto et al, 2012).

5.4.3 *C. elegans* strains, culture conditions and synchronization

The strains used in this study were: N2 (wild type) and MT4244 [*unc-24(e138) let-60(n1046) IV*] (multivulva phenotype). The animals were kept in the incubator at 20°C and cultivated in the nematode growth medium (NGM), seeded with the bacteria *Escherichia coli* OP50 (*E. coli*) as food source (Stiernagle, 2006). For synchronization, the lysis solution (1M NaOH, 1% NaClO and H₂O_d) was used to break the cuticle of gravid adults and to release the eggs. After 14-16h, the first larval stage (L1) worms hatched and were used for the assays. All nematode strains and *E. coli* were purchased from the *Caenorhabditis* Genetic Center (Minnesota, USA).

5.4.4 Exposure protocol

For exposure to ULI, 1500 animals at the first larval stage (L1) were used for each treatment group. After hatching, the larvae were divided into a control group, exposed to the vehicle dimethylsulfoxide (DMSO) 5% or treated with ULI at concentrations of 1, 5, 10 and 20 µM, chosen according to the concentration curve previously carried out (unpublished data). After exposure to the samples in the liquid medium for 30 minutes, worms were washed for three times with M9 buffer to remove the treatment (characterizing acute exposure). The worms were transferred to Petri dishes with nematode growth medium (NGM) and *E. coli* OP50 seeded the day before. The worms were kept in the incubator for 48 hours for posterior analysis.

5.4.5 Survival rate

In this assay, the safety of the compounds for strains MT4244 was evaluated through the counting of the live worms in each group exposed or not to ULI. The scoring was performed 48 hours after exposure, at the L4 larval stage, in duplicates and individually repeated four (4) times. A grid was used to assist the counting of the live worms and the data was normalized to percentage of control (DMSO vehicle).

5.4.6 Body length and body area

As one of the tests of toxicity parameters, the size of the worm was also measured, both in length and in its body area, 48 hours after treatment. The plates containing the treated animals were washed with M9 buffer solution, then transferring the worms from each group to microtubes. These were centrifuged and washed 3 (three) times with M9 buffer and transferred to slides. Images of 10 worms per group were taken in the scale microscope (Nikon eclipse 50i microscope). This experiment was repeated four (4) times.

5.4.7 Brood size

Worms of the strains N2 and MT4244 at the L4 larval stage were individually transferred from the treatment plates to smaller Petri dishes with 10 μ L of *E. coli* OP50 inoculated on the same day. The animals were monitored for four (4) days, counting the number of larvae (progeny). The assay was performed in triplicate for each group and repeated four (4) times.

5.4.8 Egg laying and egg hatching tests

Strains N2 and MT4244 were evaluated in these assays. For the egg laying test, two treated worms from each group were transferred to Petri dishes with NGM medium containing 10 μ L of levamisole solution (500 mM), a cholinergic agonist that induces the expulsion of the eggs, and another 5 μ L of bacteria *E. coli* OP50. After one (1) hour, the number of released eggs was counted. The number of eggs of the two animals was averaged. In the egg production test, five (5) worms from each group were individually transferred into five drops of lysis solution (1M NaOH, 1% NaClO, and distilled H₂O) on a slide. After 2 minutes, the cuticle of the animals breaks, and the number of the eggs is counted. The number of eggs of the five animals was averaged. Both assays were performed on the first (1st) and third (3rd) day of adult worms. The assays were performed in triplicates for each group and repeated four (4) times.

5.4.9 Longevity and phenotype quantification of multivulva

Strains N2 and MT4244 were used, and after counting survival, twenty-five (25) worms were transferred to smaller Petri dishes containing 10µL of *E. coli OP50*, and kept at 20°C. In the following days, the number of live worms was counted daily, until there were no live worms left. The quantification (number of animals that developed mv) and number (average number of mv in each animal) of multivulva was evaluated on days one (1), two (2), three (3) and five (5) of an adult in the MT4244 strain, which has the multivulva (mv) phenotype (n= 10-15 worms), using the average number of living animals together with the longevity assay. The percentage of worms with the mv phenotype was calculated by the total number of living worms of the same age, and the average number of mv of each worm was calculated. The experiments were performed in duplicates and repeated four (4) times.

5.4.10 Quantification of the area of the multivulva phenotype

MT4244 treated worms were used to quantify the area of the multivulvas formed in ten (10) worms from each group, which were chosen at random for imaging. First, from the treatment plates, the worms were transferred to microtubes with M9 buffer solution, washed three (3) times, on their 1st or 2nd day of adulthood to separate the larvae, and poured into plates with NGM and 150µL of *E. coli OP50*. On the following day, 2nd or 3rd day of adults were washed and transferred to slides along with 20 µL of Levamisole solution to paralyze them and to capture the images in the microscope (Fluoid® Cell Imaging Station). The quantification of the area of the mv was performed using the Image J software, with the average of the values of the mv of each worm and the average of the area of five (5) worms in each group used for the analysis. The assay was repeated four (4) times independently.

5.4.11 *In silico* analysis

5.4.11.1 Molecular modeling and Ligand preparation

The uliginosin B ligand, in pdb format (Protein Data Bank), was prepared using Spartan '14 software. To calculate the geometry of the molecule, the molecular mechanisms MMFF (Molecular Force Field) followed by the semi-empirical model AM1

and DFT 6.31G* were chosen, leaving its charge neutral. This structure in format pdb was used in docking studies.

The molecular structures of proteins tyrosine kinase domain of the activated (PDB code: 7KXZ) and inactivated (PDB code: 1M14) human endothelial growth factor receptor (EGFR). In addition to the *C. elegans* model with the homologous protein LET-23 kinase (PDB code: 5WNO) were downloaded from protein data bank (<https://www.rcsb.org/search>). Protein preparation was not performed.

Docking studies were performed using two methods blind and semiflexible methods. Firstly, blind molecular docking was carried out, through the website <http://www.swissdock.ch/docking>. Flexible docking were performed using iGEMDOCK program, programmed to perform Stable Docking (slow). For the protein configurations, the reference ligand was retained or not, and using 6 Å for the binding site radius. The validation of molecular docking were carried out applying redocking with the same proteins were also carried out.

5.4.12 Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. First, the Shapiro-Wilk normality test was performed (all $p > 0.05$), and when they presented normal distribution, the one-way parametric analysis (ANOVA) was performed, followed by the Tukey multiple comparison test. When the data did not show normal distribution, the non-parametric test chosen was the Kruskal-Wallis followed by the Dunn's multiple comparisons test. The results of the longevity test were analyzed by Kaplan Meier. Results were determined to be significant when the significance was $p < 0.05$, using Graph Pad Prism 8.0.1 software for such analyses.

5.5 Results

5.5.1 Exposure to ULI did not alter the survival rate and development of the animals.

In the parameters that evaluated the toxicity of the compound on the nematode (survival and body size), ULI was safe at the concentrations tested for the MT4244

strain, as demonstrated in Figure 1. The same was observed when the development parameters (area and length body) remained at similar values to the control group.

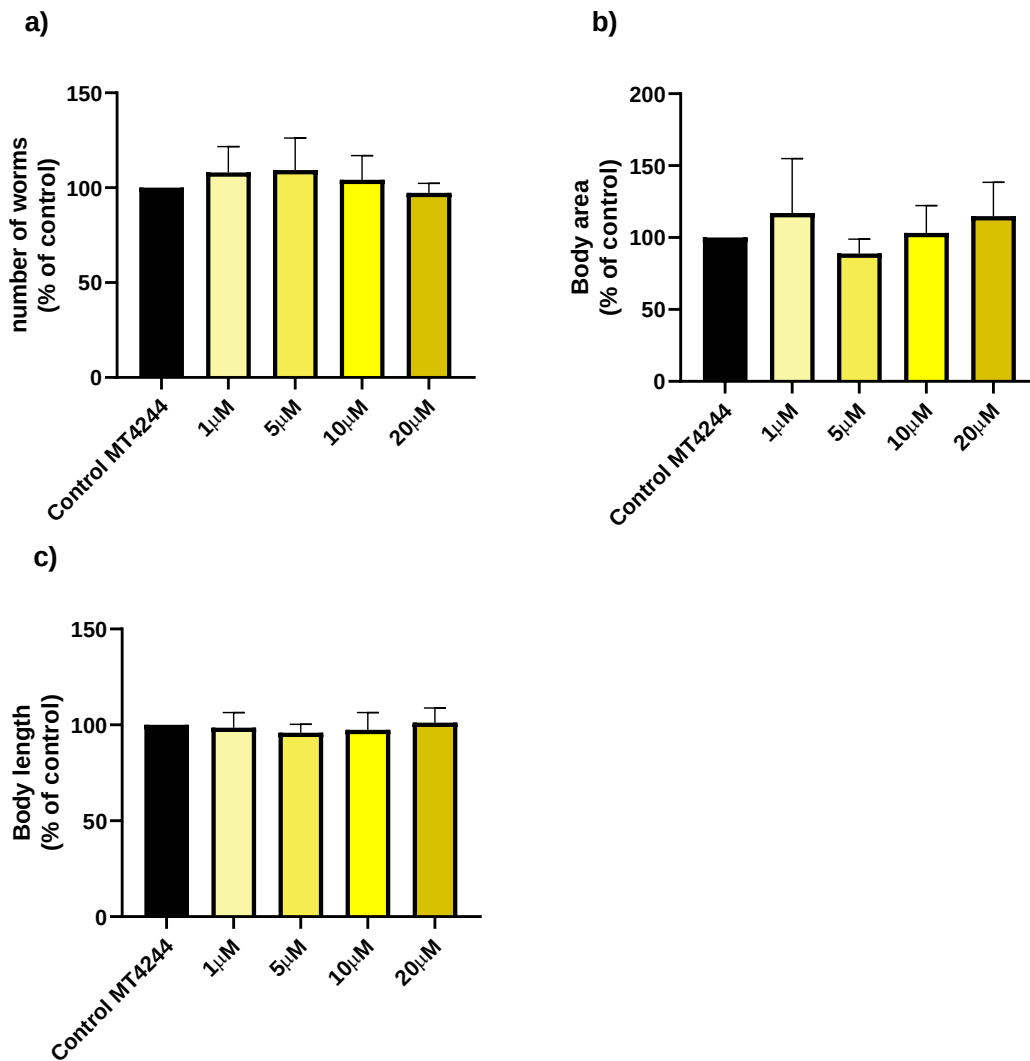


Figure 2 – Survival and development rate of the animals exposed to concentrations of 1, 5, 10 and 20 µM of ULI. a) Survival rate (n=4). b) Body area (n=3). c) Body length (n=3). The control groups of all graphs were normalized to 100%. Statistical analysis showed normal distribution using the Shapiro-Wilk test, followed by one-way ANOVA..

5.5.2 Exposure to the ULI did not improve the reproductive parameters of the MT4244 strain

Regarding the reproductive parameters, the treated worms did not show changes in egg laying (Fig. 2 a and b), and in the egg production test (Fig. 2 c and d), both at the first (72h after exposure) and at the third (120h after exposure) adult day. In the progeny number test, there was a decrease in the number of larvae in the control groups and those treated only with the MT4244 strain in relation to the control group with the N2 strain (no treatment) (Fig. 2 e and f).

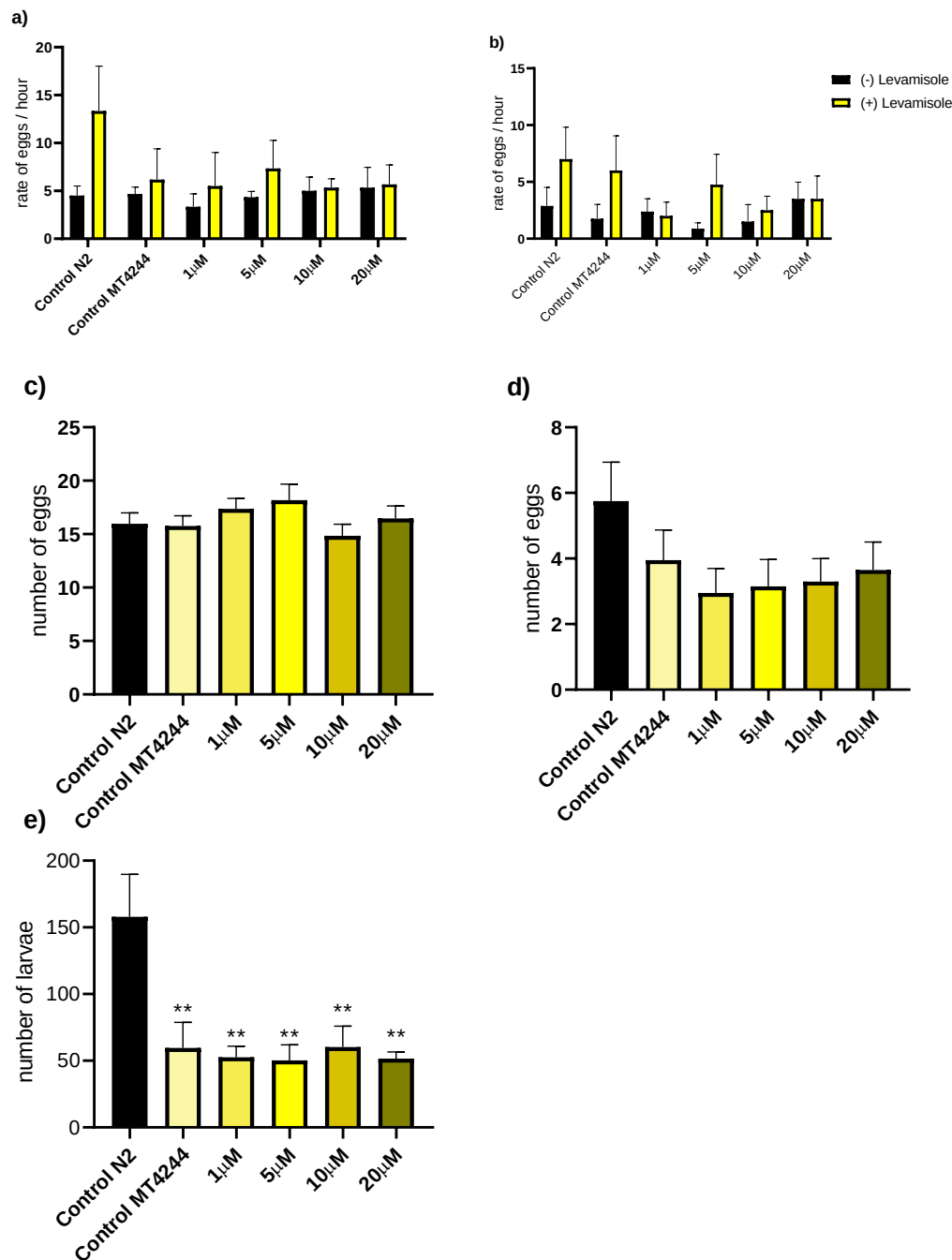


Figure 3 – Evaluation of reproductive parameters in worms treated at concentrations of 1, 5, 10 and 20 μ M of ULI. a) Quantification of the number of eggs expelled without and with the stimulus of levamisole in the worms, on the first and (n=3) (b) third day of adulthood (n=4). Statistical analysis showed normal distribution by the Shapiro-Wilk test, followed by the two-way ANOVA analysis. c) Quantification of the average number of eggs inside the animals, on the first (n=6) and (d) third day of adulthood (n=4). Analysis using the Shapiro-Wilk test was not normal, so the Kruskal-Wallis test was performed, followed by the Dunn's multiple comparison test. e) Size of the progeny of the animals (n=4) Statistical analysis showed normal distribution using the Shapiro-Wilk test, followed by one-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test. (*) Indicates a statistically significant difference in relation to the control group with $**p < 0.001$.

5.5.3 Exposure to ULI did not extend the lifespan of the worm, but delayed the development of the multivulva phenotype of MT4244 animals

It was possible to observe a significant reduction in the average lifespan of the control group of the MT4244 strain compared to the N2 strain, both without exposure to ULI. However, ULI did not prolong the lifespan of the mutant strain (Fig 4, a). Along with the longevity assay, the quantification of the multivulva (mv) number was carried out. It was observed a delay in the formation of these phenotypes, with a reduction in the concentration of 5 on the first day of adulthood (Fig. 4, b); followed by the second day, with a reduction in groups exposed to the highest concentrations (Fig. 4, c). However, on the third adult day, like the fifth, there was no significant reduction in mv in the treated animals (Supplementary Figure). The average number of mv were also calculated over the four days (Supplementary Figure), as the average mv area was quantified (Fig. 4, e; Supplementary Figure), but both results did not show statistical significance.

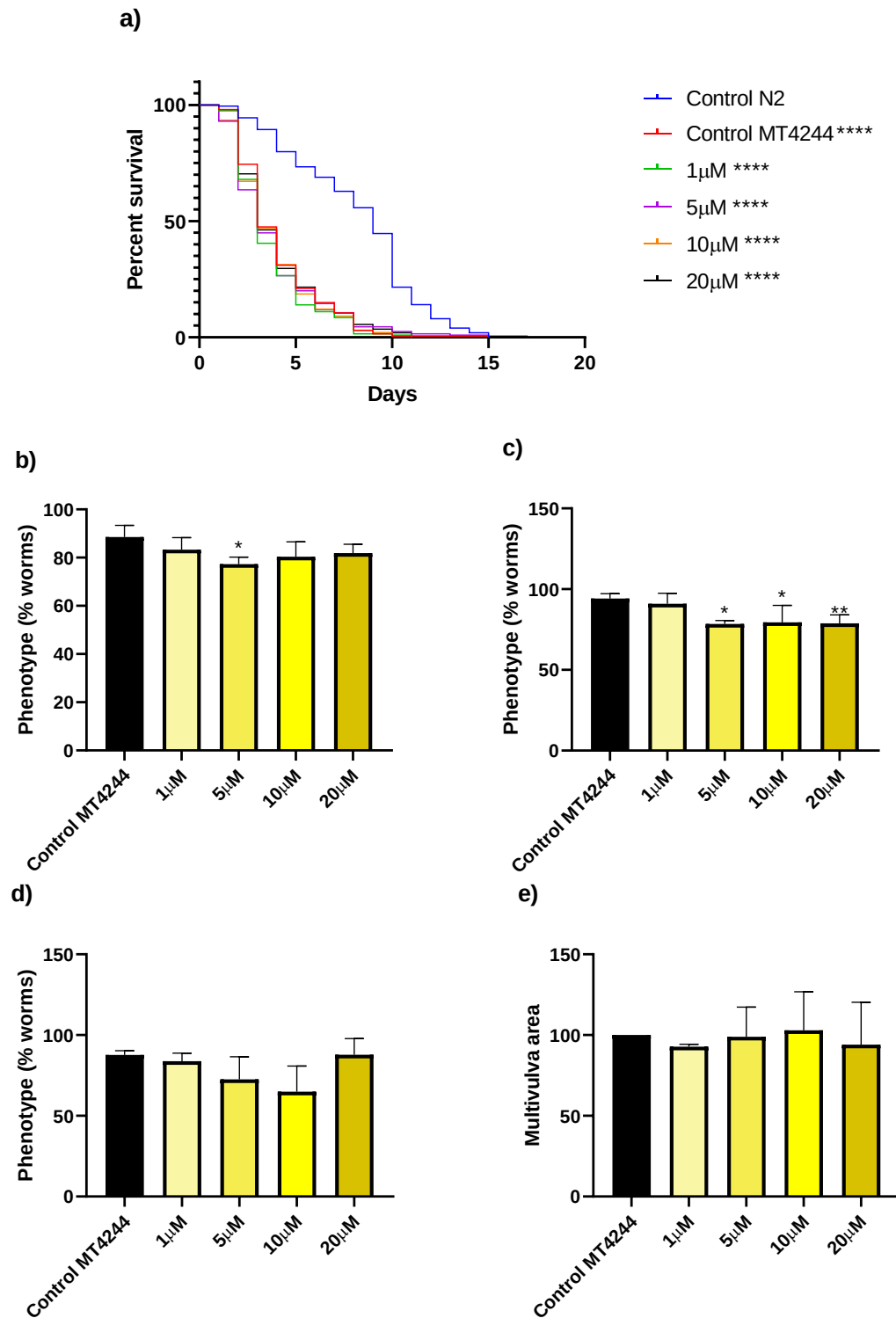


Figure 4– Longevity assay and quantification of animals that developed the mv phenotype after exposure to concentrations of 1, 5, 10 and 20 μ M of ULI. a) Survival rate over the days of the animals. Statistical analysis was performed by Kaplan Meier. (*) Indicates a statistically significant difference in relation to the N2 control

group with other groups with **** $p < 0.0001$. (n=4). b), c) and d) Percentage of worms that developed the phenotype, on the first (b), second (c) and third (d) day of adulthood. Statistical analysis showed normal distribution using the Shapiro-Wilk test, followed by one-way ANOVA and Dunn's multiple comparisons test. (*) Indicates a statistically significant difference in relation to the control group with * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (n=4). e) Determination of the average mv area of the worms on the third day of adulthood (n=3).

5.5.4 ULI showed greater interaction specificity of the active site of the human EGFR protein

In order to understand the molecular mechanism of ULI on the Ras pathway, the proteins that are part of via were searched in the PDB. The crystallized structure of LET-23 present in *C. elegans* and homologous to human EGFR, more specifically its tyrosine kinase domain, was found available, and therefore chosen for this study. Through blind coupling, it was possible to suggest, as shown in fig. 4, that there was a lack of specificity between the ULI and the *C. elegans* protein, due to the proposal of several interaction sites. This contrasts significantly with human forms, which tend to bind, for the most part, to specific active sites of the receptor.

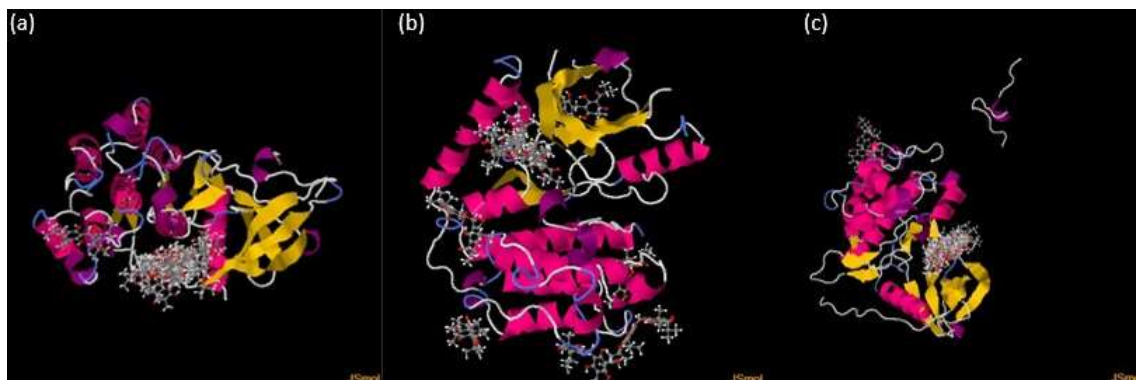


Figure 5 – Blind molecular docking with EGFR protein. (a) Possible sites of interaction of ULI with the human protein in the active form 7KXZ. (b) Interactions of ULI with the *C. elegans* 5WNO protein. (c) Interactions of ULI with the human protein in the inactive form 1M14.

5.5.5 SemiFlexible Docking

In both target proteins, 7KXZ (active human protein) and 5WNO (*C. elegans* protein), even with or without its reference ligand in its structure, ULI showed a similar interaction with its binding site, demonstrating that it did not prevent its interaction with the site.

Firstly, with the 7KXZ protein (with or without ligand), there was a total activation energy values (-92.9 and -93 kcal/mol) and interaction with amino acid residues such as Phenylalanine (PHE 723), Lysine (LYS 745), threonine (THR 790) and cysteine (CYS 797). There was an interaction energy of -12.6; -8; -4.4; -4.2 kcal/mol, for the protein with the ligand and -12.7; -8.1; -4.3; -4.1 kcal/mol with the unbounded protein, respectively. In the *C. elegans* protein, 5WNO, total activation energy of -102.1 and -101.4 kcal/mol. The residues bound to ULI are: Alanine (ALA 893), Glycine (GLY 894), asparagine (ASN 970), leucine (LEU 891) and Glycine (GLY 892). With interaction energy of -4.5; -8.7; -2.9; -7.2; -8.2 kcal/mol; for the protein with ligand e -4.7; -8.6; -3.1; -7.3; -7.8 kcal/mol with the unbounded protein.

In order to investigate whether ULI also interacted with the human EGRF protein in its inactive form, the protein code 1M14 was chosen. In the same way, the interaction energy was calculated, at -100.6 kcal/mol, with the amino acid residues that interacted with the ULI being: Arginine (ARG 808), Glutamine (GLU 673), Alanine (ALA 674) and Proline (PRO 675), with an interaction energy of -16.8; -4.5; -10.2; -5.8 kcal/mol, respectively (supplementary material).

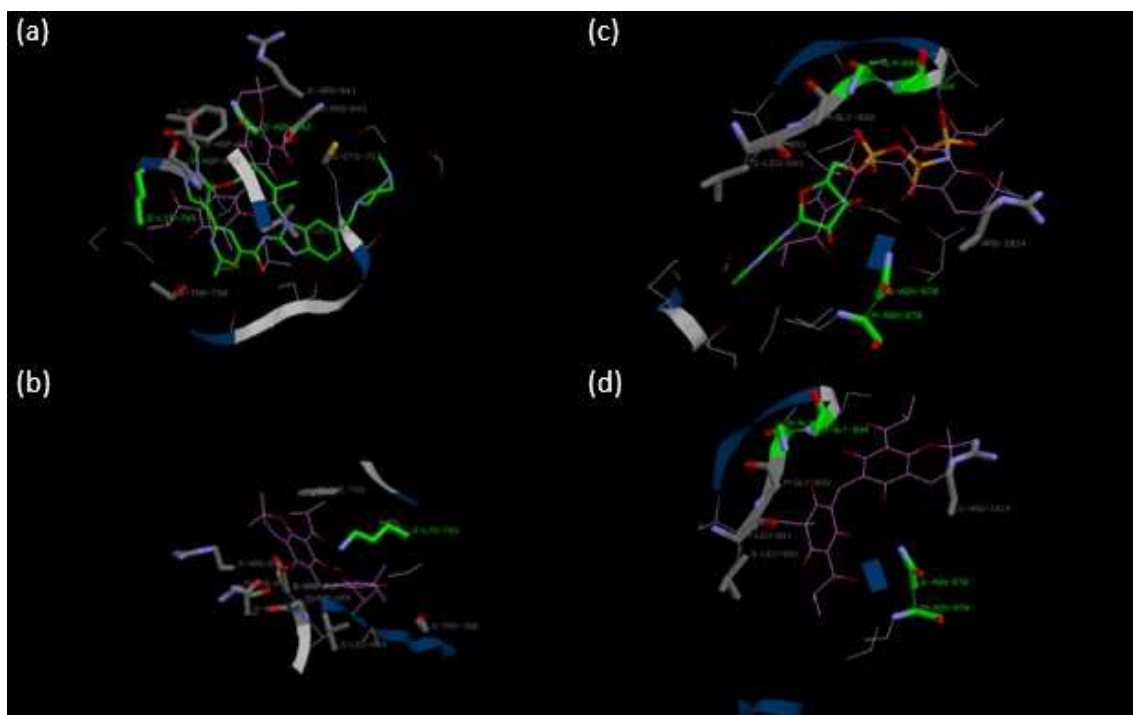


Figure 6 – Analysis using the redocking method. (a) and (b) Molecular docking and redocking with ULI and the 7KXZ protein. (c) and (d) Molecular docking and redocking with ULI and the 5WNO protein.

5.6 Discussion

Epidemiological data demonstrate an increase in diagnosis as well as the mortality rate resulting from cancer in the next years (INCA, 2020; IARC, 2020). Therefore, this work aimed to investigate whether ULI would present antiproliferative effect through one of the signaling pathways already known to be involved in oncogenesis, the RAS/ERK/MAPK pathway. In this work, it was possible to observe *in vivo* a small delay in the development of the multivulva phenotype caused by increased Ras pathway signaling by the reduction in the number of worms that developed mv on the first and second day of adulthood. However, these results were not as potent as we hypothesized. Indeed, blind docking contributed to clarify this finding, since ULI has a higher specificity for both forms of human EGFR proteins than the *C. elegans* LET-23. Therefore, it revealed one of the limitations found in this study, the structural difference between the human protein and that of *C. elegans*, which may be one of the causes of the observed results.

As demonstrated in both survival and body size assays, these did not show significant changes in relation to control, therefore ULI proved to be safe for the MT4244 strain at the concentrations tested. Notably, in previous analyzes performed in our lab, N2 strain exposed to ULI presented a significant mortality at 20 μM (unpublished data). Therefore, we tested lower concentrations in this study. Our group has also evaluated LaSOM 335 in both N2 and MT4244 strains, which reduced survival in both strains at the highest concentration tested, 600 μM (Kagami, 2023). Therefore, ULI is highly toxic to the worms and, potentially, to mammals as well.

Then, we assessed the antiproliferative effect of ULI in *C. elegans*. ULI delayed the formation of the multivulva phenotype in strain MT4244. This strain is related to overstimulation of the RAS/ERK/MAPK pathway, which is homologous to the human signaling pathway. This pathway is activated through the transmembrane receptor EGFR (homologous to LET-23 in *C. elegans*), which ligands are endothelial growth factors (EGF), transforming factors (TGF) or tumor necrosis factor. This pathway begins with the interaction of the intracellular Grb2/SOS complex, which will couple to the receptor and activate the Ras protein (G protein), followed by a cascade of phosphorylation and activation of the intracellular proteins Raf kinase, MEK (MAP kinase- kinase) and ERK MAPK (MAP kinase). ERK MAPK regulate target genes, in the cell nucleus, responsible for cell growth, proliferation, differentiation and apoptosis (Kobet et al., 2014; Garavello, 2011). When this pathway is altered, tumorigenesis can occur. Some examples are mutations in the *ras* gene, which is present in around 30% of all types of cancer (Guo et al., 2020), in addition to receptor tyrosine kinases (RTKs), which increased expression or activation by its ligands leads to the process of angiogenesis and cancer progression, and may even develop metastasis (Talukdar et al., 2020). For that reason, this pathway is a great target for chemotherapy agents.

Similarly, another study investigated the antitumor effects of itraconazole, disulfiram, etodolac and ouabain, using different types of tumorous *C. elegans* strains, including those associated with the Ras pathway (SD939 and MT2124). It was observed that both N2 and tumorous mutants presented a decrease in the survival rate when exposed to the highest concentrations of itraconazole, disulfiram, etodolac and ouabain (600 and 1000 $\mu\text{g/mL}$). Remarkably, they all demonstrated the potential to reduce the multivulva phenotype in the MT2124 strain, at a concentration range between 370 and 400 $\mu\text{g/mL}$ (Medina, 2020).

Studies of the antiproliferative activity of *Hypericum* spp. extract and fractions have been already evaluated *in vitro*. Two benzophenones (carifenone A and carifenone B, isolated from *H. carinatum*) showed moderate activity against the tumor cell lines HT-29 (human colon carcinoma cells), U-251 (human glioma cell line) and OVCAR-3 (human ovarian carcinoma cells) at a concentration of 100 µg/ml. Notably, the dimeric phloroglucinols japonicin A and ULI showed effects only in the OVCAR-3 cell line (Pinhatti, 2013). This finding could explain our results, which showed a statistical difference in the number of multivulva in animals on the first and second day of adulthood, demonstrating an effect on the development of the phenotype.

In order to understand ULI promising effects, whether it is directly related to any of the Ras pathway intermediates, an approach that has contributed to *in vivo* results includes *in silico* assays, such as molecular docking. Docking is a currently used tool that includes software for identifying, optimizing and repositioning drugs, identifying targets by reverse screening and understanding the relationships between different molecular targets for a given disease (Pinzi, 2019). In this study, we focused on the beginning of the Ras pathway, the EGFR.

The epidermal growth factor receptor (EGFR) undergoes dimerization when its ligand is present in its extracellular domain, from which a signaling cascade begins and activates the intracellular kinase domain. This is followed by autophosphorylation, which will activate the whole Ras pathway. When altered, the entire process will be accelerated and may result in cell proliferation, angiogenesis and metastasis. EGFR has been studied for playing important roles in cellular processes, and several chemotherapy agents interact with this receptor as mechanism of action. In this work, it was chosen to evaluate the interaction of ULI in the tyrosine kinase domain of EGFR, both the human structure and that of *C. elegans*, due to its availability in the PDB (named LET-23).

However, a study that determined and analyzed the sequence of the EGFR domains with that of *C. elegans*, the LET-23 homologous receptor, indicated that it does not share a part of the canonical sequences which can alter its allosteric activation compared to the human receptor (RONEY, 2023). This can corroborate with the different interactions that were identified in our results, which showed greater specificity of ULI with human proteins (7KXZ and 1M14) compared to that of *C. elegans* (5WNO).

However, it is necessary to continue to understand the antiproliferative mechanisms of ULI and other phloroglucinols that are gaining prominence in several studies. ULI demonstrated an affinity for interaction with human EGFR, therefore, further investigation of the antiproliferative effect of ULI in other *in vivo* models will be necessary, in order to better understand these findings.

5.7 Conclusion

According to the results found in this study, a potential delay in the development of the mv MV phenotype of strain MT4244 was observed in the first two days of adulthood. We sought to understand the possible mechanism of this phenomenon by investigating its interaction with human and nematode EGFR proteins. The molecular docking results corroborate the *in vivo* findings, using *C. elegans* model, indicating greater specificity with the active site of the human EGFR. Furthermore, the application of the flexible redocking method confirmed the possible interaction with the tyrosine kinase domain of this receptor, thus suggesting a potential antiproliferative action.

5.8 Acknowledgements

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (scholarship CAPES Financial Code 001 for MEOS) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), scholarship for FSOP.

5.9 References

BEYETT, Tyler S. et al. Structural analysis of the macrocyclic inhibitor BI-4020 binding to EGFR kinase. **bioRxiv**, p. 2022.08. 27.505540, 2022.

BRIDI, Henrique et al. Phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species induce *in vitro* proliferation of cells involved in the wound healing process. **Natural Product Research**, v. 35, n. 22, p. 4648-4652, 2021.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387–407, 2015.

COSTA-LOTUFO, Leticia V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

EKIERT, Halina Maria; SZOPA, Agnieszka. Biological activities of natural products. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5769, 2020.

GARAVELLO, N. M. Caracterização do papel das proteínas quinases (PKCs) na proliferação e auto-renovação das células tronco embrionárias murinas. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

GUO, Y. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 19, n. 3, p. 1997–2007, 15 jan. 2020.

HAN, Min; STERNBERG, Paul W. let-60, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction, encodes a ras protein. **Cell**, v. 63, n. 5, p. 921-931, 1990.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA/MS). Estimativa 2020. **Brasil-estimativa dos casos novos**. mai. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>> Acesso em: 20 dez. 2023.

JOSHNY, J.; DEVI, R. D.; HARI, V. B. N. Anti-cancer and anti-microbial activity of hydro alcoholic extract of *bougainvillea glabra*. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 3, n. 4, p. 79–85, 2012.

KAGAMI, Luciano Porto et al. LaSOM 335, active against bladder cancer cells, interferes with Let-60 (h Ras) and reduces CD 73 expression/activity. **Chemical Biology & Drug Design**, 2023.

KOBET, R. A. et al. *Caenorhabditis elegans*: A model system for anti-cancer drug discovery and therapeutic target identification. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 371–383, 2014.

KYRIAKAKIS, Emmanouil; MARKAKI, Maria; TAVERNARAKIS, Nektarios. *Caenorhabditis elegans* as a model for cancer research. **Molecular & cellular oncology**, v. 2, n. 2, p. e975027, 2015.

LIU, Lijun et al. Regulation of kinase activity in the *Caenorhabditis elegans* EGF receptor, LET-23. **Structure**, v. 26, n. 2, p. 270-281. e4, 2018.

MEDINA, Paul Mark; PONCE, Jozelle Marie; CRUZ, Christian Alfredo. Revealing the anticancer potential of candidate drugs in vivo using *Caenorhabditis elegans* mutant strains. **Translational Oncology**, v. 14, n. 1, p. 100940, 2021.

PINHATTI, Amanda V. et al. Antiproliferative activity of the dimeric phloroglucinol and benzophenone derivatives of *Hypericum* spp. native to southern Brazil. **Anti-Cancer Drugs**, v. 24, n. 7, p. 699-703, 2013.

RANG, H. P. et al. *Farmacologia*. 9^o ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2020.

RAO, Tai et al. The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. **Pharmacological Research**, v. 146, p. 104283, 2019.

SANTARPIA, Libero; LIPPMAN, Scott M.; EL-NAGGAR, Adel K. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 16, n. 1, p. 103-119, 2012.

STOLZ, Eveline Dischkaln et al. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 80-87, 2012.

TALUKDAR, Sarmistha et al. EGFR: An essential receptor tyrosine kinase-regulator of cancer stem cells. **Advances in cancer research**, v. 147, p. 161-188, 2020.

TEJEDA-BENITEZ, Lesly; OLIVERO-VERBEL, Jesus. *Caenorhabditis elegans*, a biological model for research in toxicology. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237**, p. 1-35, 2016.

WARD, Laura Sterian. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 351-360, 2002.

WORMBASE. Gene let-60. 2022. Disponível em: <https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00002335#0-9f-10> Acesso em: 22 de dez. de 2023.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, foi evidenciado um possível atraso no desenvolvimento do fenótipo MV da cepa MT4244 nos primeiros dois dias de fase adulta. Buscamos compreender o possível mecanismo desse fenômeno, investigando sua interação com as proteínas EGFR humana e do nematoide (LET-23). Os resultados obtidos no docking molecular sustentam os achados *in vivo*, indicando uma maior especificidade no sítio ativo das proteínas humanas. Além disso, a aplicação do método flexível por redocking foi utilizada para confirmar a potencial interação com a porção tirosina quinase, sugerindo, portanto, uma possível ação antiproliferativa através de ligação com este sítio.

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados observados neste estudo acredito que possam contribuir e elucidar um possível efeito antiproliferativo da ULI, portanto realizar ensaios com a molécula utilizando outros modelos animais ou investigar seu possível mecanismo de ação através de estudos *in silico* com outras vias de sinalização torna-se atrativo para compreender sua atividade.

Seria interessante dar continuidade a pesquisa utilizando a ULI, como ligante, pelo método do docking molecular para investigar outros alvos da mesma via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK e avaliar sua interação e especificidades com as demais proteínas humanas, além do EGFR.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. Targeted Drug Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer. 2022. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/treating-non-small-cell/targeted-therapies.html>> Acesso em 09 de jan. de 2024.

ANGERS, Stephane; MOON, Randall T. Proximal events in Wnt signal transduction. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 7, p. 468-477, 2009.

BEYETT, Tyler S. et al. Structural analysis of the macrocyclic inhibitor BI-4020 binding to EGFR kinase. **bioRxiv**, p. 2022.08. 27.505540, 2022.

BRIDI, Henrique et al. Phloroglucinol derivatives from Hypericum species induce in vitro proliferation of cells involved in the wound healing process. **Natural Product Research**, v. 35, n. 22, p. 4648-4652, 2021.

BRIDI, Henrique et al. Antimicrobial activity of dimeric acylphloroglucinols isolated from southern Brazilian Hypericum species against to resistant bacterial. **Natural Product Research**, v. 36, n. 24, p. 6448-6452, 2022.

CHO, Eugene et al. Anti-cancer effect of cyanidin-3-glucoside from mulberry via caspase-3 cleavage and DNA fragmentation in vitro and in vivo. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 17, n. 11, p. 1519-1525, 2017.

CLEVERS, Hans; NUSSE, Roel. Wnt/ β -catenin signaling and disease. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1192-1205, 2012.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387–407, 2015.

COSTA-LOTUFO, Leticia V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAMPON, Kevin et al. Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. **Drug discovery today**, v. 27, n. 1, p. 151-164, 2022.

DA SILVA, Camila PM et al. In silico Prediction of ADMET/Drug-likeness Properties of Bioactive Phloroglucinols from Hypericum Genus. **Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1002-1017, 2023.

EISENMANN, D. M. Wormbook: The online review of *c. elegans* biology. **Research Community**, Wormbook, 2005.

EKIERT, Halina Maria; SZOPA, Agnieszka. Biological activities of natural products. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5769, 2020.

EL GAUFARY, Menna et al. The phloroglucinol calcitrinone A, a novel mitochondria-targeting agent, induces cell death in breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 162, p. 112896, 2022.

GARAVELLO, N. M. Caracterização do papel das proteínas quinases (PKCs) na proliferação e auto-renovação das células tronco embrionárias murinas. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

GUO, Y. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 19, n. 3, p. 1997–2007, 15 jan. 2020.

HALL, John E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HOLLAND, Jane D. et al. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. **Current opinion in cell biology**, v. 25, n. 2, p. 254-264, 2013.

IMRAN, Muhammad et al. Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 2277, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA/MS). Estimativa 2020. **Brasil-estimativa dos casos novos**. mai. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>> Acesso em: 20 dez. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA/MS). **Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ. 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>> Acesso em: 20 dez. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Radioterapia. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/radioterapia>> Acesso em 04 de jan. de 2024.

JOSHNY, J.; DEVI, R. D.; HARI, V. B. N. Anti-cancer and anti-microbial activity of hydro alcoholic extract of bougainvillea glabra. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 3, n. 4, p. 79–85, 2012.

KAGAMI, Luciano Porto et al. LaSOM 335, active against bladder cancer cells, interferes with Let-60 (h Ras) and reduces CD 73 expression/activity. **Chemical Biology & Drug Design**, 2023.

KIM, Rae-Kwon et al. Novel anticancer activity of phloroglucinol against breast cancer stem-like cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 286, n. 3, p. 143-150, 2015.

KIM, Rae-Kwon et al. Phloroglucinol suppresses metastatic ability of breast cancer cells by inhibition of epithelial-mesenchymal cell transition. **Cancer science**, v. 106, n. 1, p. 94-101, 2015.

KIMBLE, Judith; CRITTENDEN, Sarah L. Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 23, p. 405-433, 2007.

KOBET, R. A. et al. *Caenorhabditis elegans*: A model system for anti-cancer drug discovery and therapeutic target identification. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 371–383, 2014.

KYRIAKAKIS, Emmanouil; MARKAKI, Maria; TAVERNARAKIS, Nektarios. *Caenorhabditis elegans* as a model for cancer research. **Molecular & cellular oncology**, v. 2, n. 2, p. e975027, 2015.

LEE, Yoon-Mi et al. Dietary anthocyanins against obesity and inflammation. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1089, 2017.

LIU, Yan et al. Kushui Rose (*R. Setate* x *R. Rugosa*) decoction exerts antitumor effects in *C. elegans* by downregulating Ras/MAPK pathway and resisting oxidative stress. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 42, n. 3, p. 1411-1417, 2018.

LIU, Lijun et al. Regulation of kinase activity in the *Caenorhabditis elegans* EGF receptor, LET-23. **Structure**, v. 26, n. 2, p. 270-281. e4, 2018.

MAHALAKSHMI, Mahalingam; KUMAR, Ponnuchamy. Phloroglucinol-conjugated gold nanoparticles targeting mitochondrial membrane potential of human cervical (HeLa) cancer cell lines. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 219, p. 450-456, 2019.

MATSUBARA, Simara; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 380-385, 2006.

MEDINA, Paul Mark; PONCE, Jozelle Marie; CRUZ, Christian Alfredo. Revealing the anticancer potential of candidate drugs in vivo using *Caenorhabditis elegans* mutant strains. **Translational Oncology**, v. 14, n. 1, p. 100940, 2021.

MI, Lihan et al. Ginsenoside Rd protects transgenic *Caenorhabditis elegans* from β -amyloid toxicity by activating oxidative resistant. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1074397, 2022.

MINISTERIO DA SAÚDE. Imunoterapia contra células do câncer: custo, acesso e efetividade. Academia nacional de Medicina. Disponível em: <<https://bvsmis.saude.gov.br/imunoterapia-contras-celulas-do-cancer-custo-acesso-e-efetividade/>> Acesso em 04 de jan. de 2024

MOTA, M. DOS S. V. Análise da expressão gênica da via de NOTCH em linhagens de leucemia com o fenótipo MDR e em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda. [s.l.] **Instituto Nacional de Câncer**, 2015. Disponível em: <<https://docs.bvsalud.org/biblioref/coleciona-sus/2015/36452/36452-1647.pdf>> Acesso em: 18 de dez. de 2023.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NUSSE, Roel et al. Wnt signaling and stem cell control. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008. p. 59-66.

PEREIRA, Flávia S. O. et. Al. Bougainvillea glabra Choisy bracts extract in free and liposomal forms reduce hyperplasia induced by let-60 gain-of-function in *Caenorhabditis elegans*. 2024.

PINHATTI, Amanda V. et al. Antiproliferative activity of the dimeric phloroglucinol and benzophenone derivatives of *Hypericum* spp. native to southern Brazil. **Anti-Cancer Drugs**, v. 24, n. 7, p. 699-703, 2013.

RANG, H. P. et al. Farmacologia.9º ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2020.

RAO, Tai et al. The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. **Pharmacological Research**, v. 146, p. 104283, 2019.

SANTARPIA, Libero; LIPPMAN, Scott M.; EL-NAGGAR, Adel K. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 16, n. 1, p. 103-119, 2012.

SCHAMBONY, Alexandra; WEDLICH, Doris. Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. **Developmental cell**, v. 12, n. 5, p. 779-792, 2007.

SINGH, Inder Pal; BHARATE, Sandip B. Phloroglucinol compounds of natural origin. **Natural product reports**, v. 23, n. 4, p. 558-591, 2006.

STAMOS, Jennifer; SLIWKOWSKI, Mark X.; EIGENBROT, Charles. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. **Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46265-46272, 2002.

STANZIONE, Francesca; GIANGRECO, Ilenia; COLE, Jason C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 273-343, 2021.

STEIN, Ana C. et al. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 1, p. 66-73, 2012.

STOLZ, Eveline Dischkaln et al. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 80-87, 2012.

STOLZ, Eveline Dischkaln et al. Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, presents a multimediated antinociceptive effect in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 1774-1785, 2014.

STOLZ, Eveline Dischkaln et al. Uliginosin B, a possible new analgesic drug, acts by modulating the adenosinergic system. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

SUANTAWEE, Tanyawan et al. Cyanidin Attenuates Methylglyoxal-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in INS-1 Pancreatic β -Cells by Increasing Glyoxalase-1 Activity. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1319, 2020.

TANG, Zhongyan et al. A new cytotoxic polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol from *Garcinia nuijiangensis* screened by the LC-PDA and LC-MS. **Natural product research**, v. 34, n. 17, p. 2448-2455, 2020.

TEJEDA-BENITEZ, Lesly; OLIVERO-VERBEL, Jesus. *Caenorhabditis elegans*, a biological model for research in toxicology. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237**, p. 1-35, 2016.

TOCCI, Noemi et al. Potent Antifungal Properties of Dimeric Acylphloroglucinols from *Hypericum mexicanum* and Mechanism of Action of a Highly Active 3' Prenyl Uliginosin B. **Metabolites**, v. 10, n. 11, p. 459, 2020.

UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL'S (UICC). Globocan 2020: New Global Cancer Data. 2020. Disponível em: <<https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data#:~:text=IARC%20released%20on%2014th%20December,million%20cancer%20deaths%20in%202020>> Acesso em: 18 dez. 2023.

VASCONCELOS, M. O papel da sinalização NOTCH na diferenciação do epitélio pulmonar. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42134/tde-16052012-100050/publico/MichelleVasconcelos_Doutorado.pdf> Acesso em: 19 de dez. de 2023.

WARD, Laura Sterian. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 351-360, 2002.

WELLENBERG, Anna et al. Use of *C. elegans* as a 3R-compliant in vivo model for the chemoprevention of cisplatin-induced neurotoxicity. **Experimental Neurology**, v. 341, p. 113705, 2021.

WORMBASE. Gene let-60. 2022. Disponível em: <https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00002335#0-9f-10> Acesso em: 22 de dez. de 2023.

YANG, Ke et al. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. **Laboratory investigation**, v. 96, n. 2, p. 116-136, 2016.