

Atividade antitumoral e inibitória de topoisomerase II- α humana do flavonoide luteolina isolado de *Prosopis juliflora*

Antitumor and human topoisomerase II- α inhibitory activity II- α of the flavonoid luteolin isolated from *Prosopis juliflora*

Actividad inhibidora de la topoisomerasa II- α antitumoral y humana del flavonoide luteolina aislado de *Prosopis juliflora*

Recebido: 18/03/2022 | Revisado: 26/03/2022 | Aceito: 07/04/2022 | Publicado: 13/04/2022

Rosiane Aleixo Diniz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8910-0803>
Universidade Católica de Brasília, Brasil
E-mail: rosiannediniz@gmail.com

Adrielle Antônia da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0784-3903>
Centro Universitário Maurício de Nassau, Brasil
E-mail: adrielle.silva770@hotmail.com

Giani Maria Cavalcante

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0143-3364>
Instituto de Tecnologia de Pernambuco, Brasil
E-mail: gianime@icloud.com

Luiz Andrade Lins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5100-9388>
Universidade Católica de Brasília, Brasil
E-mail: luizlinss@gmail.com

Resumo

Este estudo objetivou avaliar a atividade antitumoral e inibitória da topoisomerase II- α humana do flavonoide luteolina isolado de *Prosopis juliflora* frente a células tumorais prostáticas (PC-3), com o intuito de investigação de novos fármacos de origem natural. Testes *in vitro* foram conduzidos com os extratos brutos das folhas frente as linhagens de células PC-3 e linhagem FGH. Os testes de citotoxicidade foram realizados através de MTT (3-(4,5-dimetiazol-2il) 2,5-difenil tetrazólio de brometo) com monitorização após 24 h de exposição das células tumorais e não tumorais a diferentes concentrações dos extratos (100; 50; 25; 10 $\mu\text{g/mL}$). A luteolina extraída das folhas da *P. juliflora* apresentou resultados positivos sobre a inibição de DNA topo II- α enzima essencial no processo de replicação das células cancerígenas a partir da concentração 50 μM . Ademais, apresentou atividade antitumoral frente a células PC-3 a partir da menor concentração testada 10 μM , e ausência de citotoxicidade frente a células normais. Sugere-se o estudo químico para extração e isolamento de compostos ativos oriundo dos extratos de folha da *P. juliflora*, para investigar a possível atividade antitumoral destes compostos em ensaio *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Atividade antitumoral; Câncer prostático; Produtos naturais; *Prosopis juliflora*.

Abstract

This study aimed to evaluate the antitumor and inhibitory activity of human topoisomerase II- α of the flavonoid luteolin isolated from *Prosopis juliflora* against prostate tumor cells (PC-3), with the aim of investigating new drugs of natural origin. *In vitro* tests were conducted with crude leaf extracts against PC-3 and FGH cell lines. Cytotoxicity tests were performed using MTT (3-(4,5-dimethiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) with monitoring after 24 h of exposure of tumor and non-tumor cells to different concentrations of extracts (100; 50; 25; 10 $\mu\text{g/mL}$). Luteolin extracted from the leaves of *P. juliflora* showed positive results on the DNA topo II- α enzyme essential in the replication process of cancer cells from the 50 μM concentration. Furthermore, it showed antitumor activity against PC-3 cells from the lowest concentration tested 10 μM , and absence of cytotoxicity against normal cells. A chemical study for the extraction and isolation of active compounds from *P. juliflora* leaf extracts is suggested, to investigate the possible antitumor activity of these compounds in *in vitro* and *in vivo* assays.

Keywords: Antitumor activity; Prostate cancer; Natural products; *Prosopis juliflora*.

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antitumoral e inhibitoria de la topoisomerasa humana II- α del flavonoide luteolina aislado de *Prosopis juliflora* contra células tumorales de próstata (PC-3), con el objetivo de investigar nuevos fármacos de origen natural. Se realizaron pruebas *in vitro* con extractos de hojas crudas contra

líneas celulares PC-3 y FGH. Se realizaron pruebas de citotoxicidad utilizando MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiazol-2il) 2,5-difeniltetrazolio) con seguimiento a las 24 h de exposición de células tumorales y no tumorales a diferentes concentraciones de extractos (100; 50; 25; 10 $\mu\text{g/mL}$). La luteolina extraída de las hojas de *P. juliflora* mostró resultados positivos en la enzima ADN topo II- α esencial en el proceso de replicación de las células cancerosas a partir de la concentración de 50 μM . Además, mostró actividad antitumoral frente a células PC-3 desde la concentración más baja ensayada 10 μM , y ausencia de citotoxicidad frente a células normales. Se sugiere un estudio químico para la extracción y aislamiento de compuestos activos de extractos de hojas de *P. juliflora*, para investigar la posible actividad antitumoral de estos compuestos en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Palabras clave: Actividad antitumoral; Cáncer de próstata; Productos naturales; *Prosopis juliflora*.

1. Introdução

O câncer é o principal problema de saúde pública mundial, definido como uma das quatro principais causas de morte antes dos 70 anos de idade (Bray et al., 2018). Segundo dados do INCA (2020), o câncer de próstata é a neoplasia mais prevalente em homens, a exceção dos casos de pele não melanoma, com estimativa de 66 mil novos casos em cada ano do triênio 2020-2022. É caracterizado como uma neoplasia da terceira idade, no qual tanto a incidência como a mortalidade aumentam exponencialmente após os 50 anos de idade.

A próstata é uma glândula que faz parte do sistema reprodutivo masculino, cuja principal função é eliminar a urina que se acumula na bexiga e produzir o esperma que conduz os espermatozoides pelo canal uretral durante o ato sexual. O câncer prostático pode surgir de forma silenciosa, por vezes assintomática, podendo apresentar-se inicialmente com o crescimento benigno dessa glândula, e como sintoma inicial apenas a dificuldade ao urinar. Porém, com o avançar da doença pode culminar em disúria, dor óssea, insuficiência renal, e em doença metastática (Kruger & Cavalcanti, 2018).

A Prostatovesicuclectomia radical (cirurgia radical) e radioterapia são os melhores recursos terapêuticos relacionados ao câncer de próstata, entretanto sua utilização é indicada na fase localizada da doença (Ministério da Saúde, 2002). Devido ao grande potencial terapêutico das espécies vegetais, estas têm sido fonte para a produção de novos compostos terapêuticos a fim de serem utilizados contra uma variedade de doenças. Aproximadamente dois terços dos compostos anticancerígenos advêm de produtos naturais ou derivados destes (Viana et al., 2017; Amaria et al., 2019).

Dada à relevância do câncer de próstata, relacionado à morbidade e mortalidade, o qual corresponde à quarta causa de morte por neoplasia no Brasil, correspondendo a 6% do total de óbitos por este grupo nosológico, é essencial o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas de enfrentamento a doença. Nesta perspectiva, é imprescindível o desenvolvimento de novos agentes antitumorais, como bem como mecanismos para sua avaliação em culturas de células tumorais, e assim selecionar compostos eficientes e seguros que possam ser utilizados no tratamento de neoplasias (INCA, 2020; Urban et al., 2021).

Pesquisas relacionadas à categorização e utilização de substâncias naturais ou sintéticas originadas de espécimes vegetais veem emergindo nos últimos anos como uma abordagem promissora no tratamento do câncer. A fauna brasileira possibilita uma infinidade de espécimes vegetais com potencial terapêutico que podem proporcionar a descoberta de novos compostos anticancerígenos mais eficazes e menos tóxicos. Nesta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral e inibitória de topoisomerase II- α humana do flavonoide luteolina isolado de *Prosopis juliflora* frente a células tumorais prostáticas.

2. Metodologia

Folhas de *P. juliflora* foram coletadas aleatoriamente em espécies arbóreas distribuídas na área do Departamento de Ciências Florestal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e a confirmação da espécie foi feita por profissionais botânicos do Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho da UFRPE.

A luteolina foi isolada das folhas, e a extração do flavonoide, seguiram os procedimentos cromatográficos empregados e a identificação por comparação foi realizada conforme as metodologias descritas por Preeti et al. (2017) e Prabha et al. (2017).

Células tumorais de próstata linhagem PC-3 e as células não tumorais de Fibroblastos linhagem FGH foram obtidas juntos ao banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ), as células foram mantidas conforme as recomendações da BCRJ/UFRJ.

A atividade antitumoral de luteolina foi avaliada através da viabilidade celular das células tumorais de próstata linhagem PC-3. Para isso, 100 μL de cultivo celular ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram adicionados em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 24h com uma demanda de 5% de CO_2 em estufa B.O.D. Em seguida, as células foram tratadas com luteolina nas concentrações de 10; 25; 50 e 100 μM por 24h, conforme a metodologia descrita por Oliveira et al. (2010). O mesmo procedimento foi realizado com as células FGH para avaliar a citotoxicidade do flavonoide em células não tumorais. Passada as 24h, o tratamento foi removido e foram adicionados aos poços meios PBS com MTT (brometo 3 - [4,5-dimetiltiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio) na relação peso/volume de 2,0 mg/mL. A placa foi incubada por 3h a 37 °C, em seguida, o meio foi retirado e 150 μL de DMSO foram adicionados para solubilizar o formazam elevadas ao leitor de placas para leitura de absorbância em $\lambda = 570$ nm (Mosmann, 1993). Como controle positivo foi utilizado o fármaco padrão docetaxel (80 mg) e como controle negativo foi utilizado meio de cultura suplementado com SBF sem células. Os experimentos foram feitos em triplicadas e os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet, utilizando o software BioEstat versão 5.0.

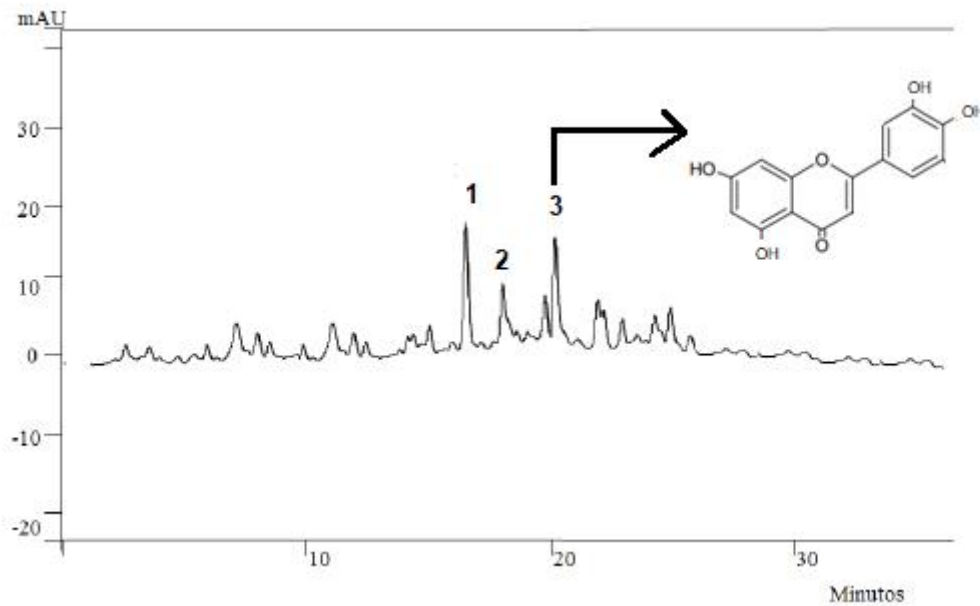
Para avaliar a capacidade inibitória de luteolina sobre a atividade enzimática de topoisomerase, amostras de topoisomerase II- α humana (DNA topo II- α), foram obtidas junto a Sigma-Aldrich®, e mantidas conforme recomendação do fornecedor.

O ensaio de capacidade inibitória foi realizado conforme a metodologia descrita por Branco et al. (2008) com adaptações. Para realizar o experimento 2 unidades de DNA topo II- α foram incubadas por 20 minutos a 37 °C com 0,35 μg de DNA pBR322 em presença de luteolina nas concentrações de 5; 50; 70 e 90 μM , contendo um volume final de 50 μL completado com tampão Tris 15 mM pH 7.0 (100 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 mM de MgCl_2 e 0,5 mM de ATP), seguindo o protocolo descrito no *kit* da Invitrogen®. Ensaio com ausência de luteolina e com o fármaco toptecano (4 mg) foram realizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A reação foi interrompida com a adição de 10 μL de tampão de parada (50% glicerol, 50% SDS). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% equilibrada com tampão TAE pH 8,5 (40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético PA e 1 mM de EDTA) por 1 h a 40 V. Ao término da corrida, o gel foi revelado com solução de brometo de etídio (5 mg/mL), lavado em água destilada e fotografado sob luz ultravioleta com câmera digital.

3. Resultados e Discussão

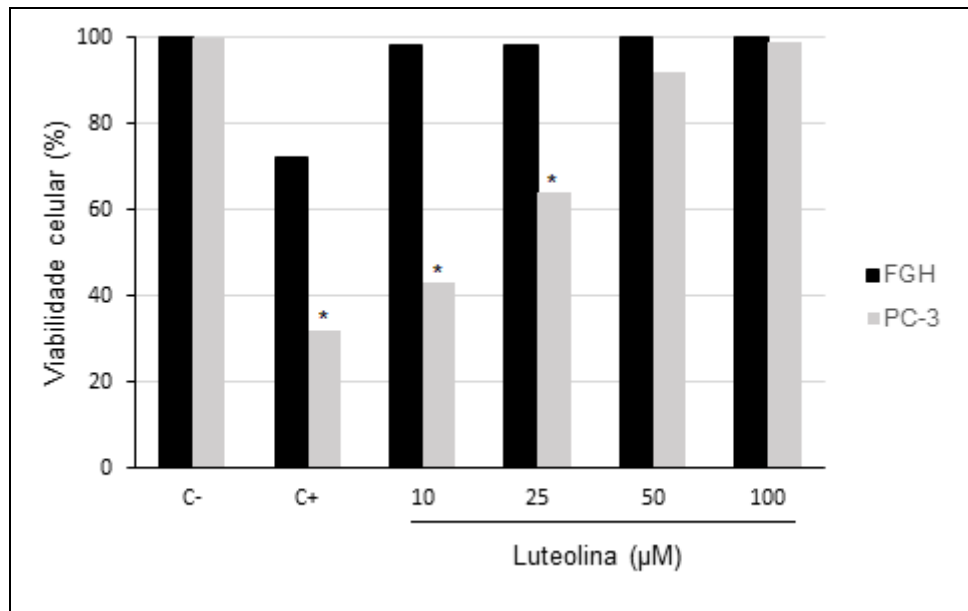
A extensa análise de HPLC-DAD mostrou luteolina (3) identificada em 21,04 minutos (Figura 1). Os tempos de retenção (tR) relacionados à luteolina foram comparados com cromatogramas de Shanmugam et al. (2016), cujo tempo de retenção registrado foi de 22,77 min.

Figura 1 – Cromatograma HPLC-DAD de *Prosopis juliflora* evidenciando o flavonoide Luteolina.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 2 – Efeitos de diferentes concentrações de luteolina isolada de *P. juliflora* sobre a viabilidade celular de FGH e PC-3. O controle negativo (C-) corresponde às células tratadas apenas com meio de cultura com SBF e o controle positivo (C+) corresponde às células tratadas com o fármaco padrão docetaxel (80 mg). *Diferença estatística significativa em relação ao controle negativo.



Fonte: Dados da pesquisa

É evidenciado na Figura 2 a atividade antiproliferativa e possível citotoxicidade da luteolina. Observa-se que o derivado flavonólico apresenta atividade antitumoral a partir da menor concentração testada, 10 µM, no qual os melhores

percentuais antitumorais obtidos até a concentração 25 μ M. Outro ponto essencial a ser observado na figura 2 é a ausência de efeitos citotóxicos da luteolina frente às células não tumorais FGH.

Segundo Mota *et al.* (2004), a primeira forma de uso medicamentoso que se tem conhecimento, se deu através das plantas medicinais. De acordo com alguns registros, a utilização de vegetais acompanha o homem desde a antiguidade. É suposto que desde essa época era a única fonte disponível para o tratamento das mais diversas moléstias. Com o passar do tempo, as civilizações perceberam que além da capacidade alimentícia, certas plantas apresentavam também poder curativo no combate às doenças.

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 80% da população mundial recorre a alguma prática da medicina tradicional no que diz respeito aos cuidados básicos de saúde, sendo que 85% dos tratamentos envolvem plantas medicinais. Desde então, a OMS tem expressado a necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário (Rosa *et al.*, 2011).

Atualmente, inúmeros medicamentos utilizados na terapia de diversas enfermidades, incluindo o câncer, são derivados direta ou indiretamente de fontes naturais, especialmente de plantas. Diversas características, como a infinidade de constituintes fitoquímicos com potencial terapêutico, e efeitos colaterais menos agressivos, tornam essas substâncias como promissoras alternativas ao desenvolvimento de novos fármacos (Ahmad *et al.*, 2017).

Um dos pontos positivos relacionados à *P. juliflora* relaciona-se ao seu rápido crescimento, potencial energético e adaptativo a condições adversas, como restrição de nutrientes. É uma árvore nativa da América e Caribe, comum em todos os estados do nordeste brasileiro, principalmente em regiões áridas e semiáridas (Nascimento *et al.*, 2014; López-Franco *et al.*, 2013).

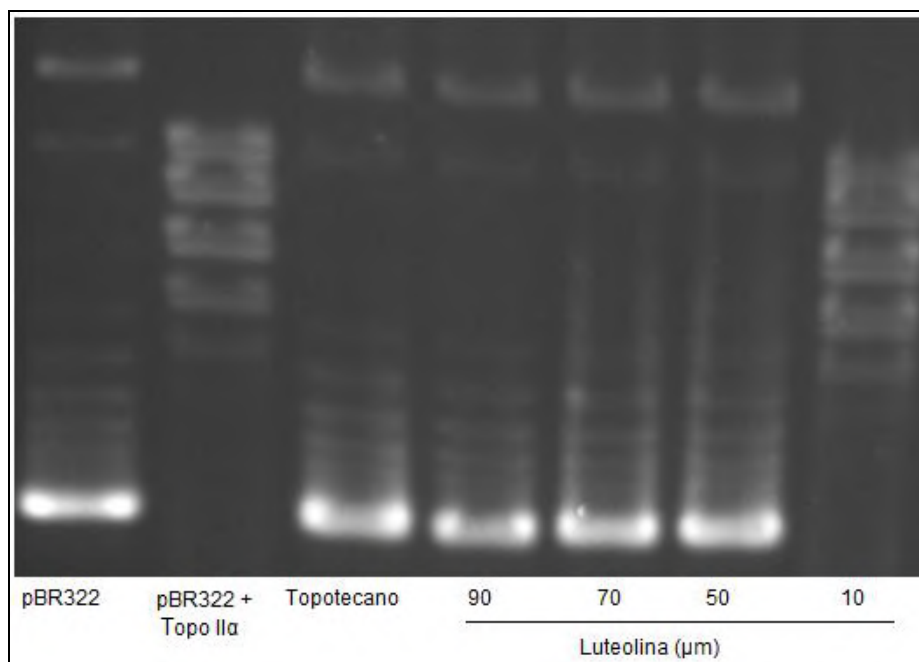
Tradicionalmente, a *P. juliflora* é utilizada como remédio popular para o tratamento de diversas doenças como gripe, resfriado, inflamação, sarampo, diarreia, e na cicatrização de feridas. A luteolina (C6-C3-C6), um de seus principais compostos, é um flavonoide extraído de suas folhas, apresenta propriedades anti-inflamatória, antioxidante, como também potente antineoplásico (Gurushidhappa *et al.*, 2018; Hassan *et al.*, 2019).

Evidenciada em literatura científica, a luteolina atua na modulação do apoptose, inibição da proliferação celular, metástase e angiogênese. Além disso, sensibiliza uma variedade de células cancerosas para a citotoxicidade induzida terapêuticamente através da supressão das vias de sobrevivência celular e da estimulação das vias de apoptose, com comprovada ação antineoplásica frente a cânceres de boca, fígado, mama e estômago (WU *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2012; HONG *et al.*, 2014).

É preciso salientar, que de acordo com Yip *et al.* (2016), os efeitos citotóxicos das terapias anticâncer constituem um dos principais fatores limitantes a sua utilização. Como evidenciado na figura 2, a luteolina da *P. juliflora* não apresentou ação citotóxica frente às células normais. Em comparação com a droga padrão utilizada para tratamento da doença, o docetaxel que inviabilizou aproximadamente 20% das células não cancerígenas. Em relação à ação terapêutica frente a células neoplásicas da linhagem PC-3, a luteolina apresentou uma maior efetividade quando comparada a droga padrão no tratamento do câncer prostático.

O mecanismo de ação da luteolina, foi avaliado através da atividade inibitória sobre a atividade enzimática de topoisomerase II- α humana, por meio da inerterconversão do DNA pBR322 para a forma relaxada através da DNA topo II α em presença ou ausência do flavonoide (Figura 3).

Figura 3 – Placa de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a análise da atividade inibitória da Topo II α humana pela luteolina isolada de *P. juliflora* em diferentes concentrações. Todas as linhas contêm 0,35 μ M de pBR322 (DNA super helicoidal) e 2 unidades de DNA topoisomerase II- α humana, com exceção da amostra pBR322.



As topoisomerasas são enzimas nucleares essenciais no processo de replicação do DNA. A topoisomerase II, existente nas isoformas alfa e beta, atua na liberação da fita de DNA enovelada, transcrição, condensação dos cromossomos e recombinação. Como é essencial a manutenção e replicação do DNA, quando estas funções são desativadas, as células ficam vulneráveis. Além disso, devido o metabolismo exacerbado das células tumorais, a expressão dessa enzima é maior que nas células normais. Nessa perspectiva, as topoisomerasas são alvos importantes no desenvolvimento de novas drogas, principalmente antitumorais (Sampaio *et al.*, 2006; Hande, 2006).

A luteolina nas concentrações 90; 70 e 50 μ M apresentaram resultados positivos sobre a atividade da DNA topo II- α . Este resultado é observado através da similaridade ao resultado apresentado pelo fármaco padrão (topotecano), que ao inibir a atividade enzimática, impede o relaxamento do DNA super helicoidal, que migra pelo gel de agarose mais facilmente do que o DNA relaxado (pBR322 + DNA topo II- α).

4. Conclusão

Dada a ausência de citotoxicidade em células normais, em associação com a inibição da proliferação celular demonstrada a partir da menor dose testada, bem como o mecanismo de ação frente a topoisomerase II- α humana, enzima essencial no processo de replicação das células cancerígenas, evidenciam que a *P. juliflora* como um potencial recurso para obtenção de substâncias isoladas a serem testadas em ensaios de atividade antitumoral.

Referências

- Ahmad, R., Ahmad, R., Ahmad, N., Naqvi, A. A., Shehzad, A., & Al -Ghamdi, M. S. (2017) Role of traditional Islamic and Arabic plants in cancer therapy. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7, 2, 195-204.
- Amaria, N. R., Menzie, A. M., Burton, E. M., Scolyer, R. A., Tetzlaff, M. T., Antdbacka, R., Ariyan, C., Bassett, R., Carter, B., Daud, A., Faries, M., Fecher, L. A., Flaherty, K. T., Gershenwald, J. E., Hamid, O., Hong, A., Kirkwood, J. M., Lo, S., Margolin, K., Messina, J., Michael, A. P., M. A., Rizos, H., Ross, M.

- I., Saw, E. A. R. P.M., Sondak, V., Sullivan, R. J., Taube, J. M., Thompson, J. F., Wiel, B. A. V. W. & Eggermont, A. M. (2019). Neoadjuvant systemic therapy in melanoma: recommendations of the International Neoadjuvant Melanoma Consortium. *Lancet Oncology*, 20, 7, 378-389.
- Branco, A., Pinto, A. C., Braz-Filho, R., Silva, E. F., & Grynberg, N. F. (2008) Echevarria, A. Rubrofusarina, um policetídeo natural inibidor da topoisomerase II- α humana. *Rev. bras. farmacogn.* 18, 1, 703-708.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68, 6, 394-424.
- Brasil. Ministério Da Saúde. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (2020). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. INCA.
- Gurushidhappa, U. B., Shivajirao, P. M., Vasudeo, N. P., Shankar, K. S., & Nivarti G.R. (2018) Prosopis juliflora (Sw.), DC induz apoptose e parada do ciclo celular em células de câncer de mama triplo-negativas: investigações in vitro e in vivo. *Oncotarget*, 9, 1, 30304-30323.
- Hande K.R. Topoisomerase II inhibitors. *Update Canc Therap*, 3,1, 3-15,2008.
- Hong, Z., Cao, X., Li, N., Zhang, Y., Lan, L., Zhou, Y., Pan, X., Shen, L., Yin, Z., & Luo, L. (2014). Luteolin is effective in the non-small cell lung cancer model with L858R/T790M EGF receptor mutation and erlotinib resistance. *British journal of pharmacology*, 171(11), 2842-2853.
- Krug, F. P. M. & Cavalcanti, G. (2018) **Conhecimento** e Atitudes sobre o Câncer de Próstata no Brasil: Revisão Integrativa. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 64(4): 561-567
- Lee, E. J., Oh, S. Y., & Sung, M. K. (2012) Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4136-4143.
- López- Franco, Y. L., Cervantes-Montano, Martínez- Robinson, K. G., Lizardi-Mendoza, J., & Robles-Ozuna, L. E. (2013) Physicochemical characterization and functional properties of galactomannans from mesquite seeds (Prosopis spp.). *Food Hydrocolloids*, 30, 2, 656-660.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 16, 65, 55-63.
- Mota, D. K. A. S., Gonzaga, L. S., Carmo, J. F. M., Ribeiro, J. B.C., Souza, R. B. L., Oliveira, T. L. S., & Santos, E. N. (2004) Plantas medicinais indicadas como anti-inflamatórias por “raizeiros” da região de Goiânia. *Infarma*, 16, 1-2, 81-82.
- Nascimento, C. E. S., Tabarelli, M., & Da Silva, C. A. D. (2014) The introduced tree Prosopis juliflora is a serious threat to native species of the Brazilian Caatinga vegetation. *Science of The Total Environment*, 481, 0, 08-113.
- Oliveira, L. P., Pinheiro, C. R., Vieira, M. S., Paula, J. R., Bara, & Valadares, M. C. (2010) Atividade citotóxica e antiangiogênica de Punica granatum L., Punicaceae. *Rev. bras. farmacogn.* 20, 2, 201-207.
- Prabha D., Mani P., Malliga P., & Darms H. U. (2017) Phytochemical and pharmacological analysis of ethanolic extracts of Prosopis juliflora (S.W). *World J Pharm Sci*. 6, 0, 2059- 2069.
- Pretti K., Sharma R. A. J., & Mala A. (2017) isolation and identification of flavonoids from Prosopis juliflora *Mint Jour of Pharma and Medical Scien*, 6:1-3.
- Rosa, C., Câmara, S. G., & Béria, J. U. (2011) Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. *Ciências & Saúde Coletiva*, 16, 1, 311 - 318, 2011.
- Sampaio Filho C., Bertoni V.D., Sampaio, C., Pimenta, A., & Brandão, M. A. (2006) Agentes antineoplásicos. In: Penildon, S. (org.) *Farmacologia*. (7a ed.) Guanabara Koogan, 1055-1070.
- Shanmugam, S., Thangaras, P., Lima, B. S., Chandran, R., Araujo, A. A. S. Narain, N., Serafini, M. R., Quintas-Junior, L. J. (2016) Effects of luteolin and quercetin 3-B-D-glucoside identified from Passiflorasubpeltata leaves against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother*, 83, 10, 1278- 1285.
- Viana, A. R., Marzari, J., Wergutz, J., & Krause, L. M. F. (2017). Produtos bioativos na prevenção e no tratamento do Câncer, em especial o melanoma. *Disciplinarum Scientia*, 18, 3, 511-528.
- Urban, K., Mehrmal, S., Uppal P., Giesey, R. L. & Delost, G. R. (2021). The global burden of skin cancer: a longitudinal analysis of the Global Burden of Disease Study, 1990-2017. *JAAD International*, 2, 3 98-108.
- Yip, K. T., Zhong, Y. Z., Putz, N. S. S., Autzen, J., Gasper, R., Hofmann, E., Scherckenbeck, J., & Stoll, R. (2016). Small molecules antagonize the MIAFibronectin interaction in malignant melanoma. *Scientific Reports*, 6, 25119, 1-12.
- Wu, B., Zhang, Q., Shen, W. & Zhu, J. (2008) Efeitos anti-proliferativos e quimiossensibilizantes da luteolina na linhagem celular AGS de câncer gástrico humano. *Mol Cell Biochem*, 313 (4) 125-132.