

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

GABRIELA SILVA NEUBERN DE OLIVEIRA

**Evaluation of the antitumor effect of vanillin and divanillin on  
murine osteosarcoma cells**

**Avaliação do efeito antitumoral da vanilina e divanilina em células  
de osteossarcoma murino**

BAURU  
2021



GABRIELA SILVA NEUBERN DE OLIVEIRA

**Evaluation of the antitumor effect of vanillin and divanillin on  
murine osteosarcoma cells**

**Avaliação do efeito antitumoral da vanilina e divanilina em células  
de osteossarcoma murino**

Tese constituída por artigo apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral, Estomatologia, Radiologia e Imaginologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

**Versão Corrigida**

BAURU

2021

Silva Neubern de Oliveira, Gabriela  
Evaluation of the antitumor effect of vanillin and  
divanillin on murine osteosarcoma cells / Gabriela  
Silva Neubern de Oliveira. -- Bauru, 2021.  
129p. : il. ; 31 cm.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Odontologia  
de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de  
Oliveira

**Nota:** A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a  
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos  
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: 

Data: 14/10/2021

Comitê de Ética da FOB-USP  
Protocolo nº:  
Data:

# FOLHA DE APROVAÇÃO



## Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

**Assistência Técnica Acadêmica  
Serviço de Pós-Graduação**

### FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada e defendida por  
**GABRIELA SILVA NEUBERN DE OLIVEIRA**  
e aprovada pela Comissão Julgadora  
em 01 de outubro de 2021.

Prof. Dr. **LUIZ FERNANDO FERRAZ DA SILVA**  
FNE/SP

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **ANA PAULA FAVARO TROBONE GARLET**  
UNISAGRADO

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **MARILIA AFONSO RABELO BUZALAF**  
FOB-USP

Prof. Dr. **RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA**  
Presidente da Banca  
FOB - USP

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação



---

---

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha mãe, **Nea Silva de Oliveira** (*in memoriam*)

*Aos prantos começo a escrita desta dedicatória. Não é para menos, ela é dedicada a uma das pessoas que mais amo nessa vida, minha mãe **Nea**, que eu “perdi” fisicamente em abril de 2020. Lembro-me como se fosse ontem do dia em que tudo aconteceu: um misto de angústia, medo, pânico, uma dor avassaladora e uma saudade insuportável me invadiram. Naquele dia uma parte de mim também se foi. Sei que levarei pra sempre comigo essa saudade, mas também sei que, junto com ela, vou levar o amor que sinto por ela e que ela sente por mim. Amor esse que, hoje eu sei, é além da vida, da morte, do tempo.*

*Deixo aqui registradas para que fiquem eternizadas as últimas palavras mais marcantes que ouvi dela: “Eu te amo, e como amo!”. A recíproca é muito verdadeira, minha mãe: eu também **te amo**, e como amo, para **sempre!***

---

Minha mãe faleceu de leucemia. Eu espero que os resultados deste trabalho, por mais simples que sejam, possam colaborar com os conhecimentos acerca dos tratamentos que envolvem a cura do câncer. E que possam, assim, diminuir o sofrimento que acompanha o paciente e toda a família.

*“Quando o amor é forte, nenhum adeus é para sempre”.*

Autor desconhecido

---

---



---

---

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

### **A Deus,**

Por tudo! Pela vida, família, saúde, amigos e por sempre estar iluminando meu caminho.

### **A meus pais,**

Nea (*in memoriam*) e Cesar,

Obrigada por serem tão maravilhosos, pelo amor incondicional, por todo apoio e incentivo. Por não terem medido esforços, desde o início dos meus estudos, para que eu pudesse chegar até aqui e por terem feito de mim a pessoa que sou hoje. Sem vocês, nada disso seria possível. Eu amo vocês!

### **As minhas irmãs,**

*Caroline e Priscila,*

Por fazerem parte da minha vida, com muito amor. Por todos os conselhos que foram essenciais para que eu conseguisse chegar onde estou e para que eu me desenvolvesse como pessoa; por serem minha inspiração e meus grandes exemplos.

### **Aos meus sobrinhos,**

*Valentina, Aurora, Rafael e Eva,*

Por preencherem minha vida com amor e alegria.

### **Ao meu namorado,**

*Amauri*

Pelo amor e companheirismo em todos os momentos, por ter me acompanhado durante todo o curso do doutorado com muito respeito, carinho, paciência e incentivo. Sua presença, alegria e pontos de vista tornaram tudo mais fácil. Eu amo você!

---

---



---

---

**Aos meus cunhados Rafael e Ricardo,**

Grandes amigos que também fazem parte da minha vida e me servem como exemplo, tanto como pessoas quanto como profissionais. Obrigada pelos conselhos!

*Eu amo cada um de vocês!*

---

---



---

---

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. **Rodrigo Cardoso de Oliveira**, pela excelente orientação, paciência e disponibilidade. Só tenho a agradecer!

Ao Professor Dr. **Valdecir Farias Ximenes** da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), pela parceria que muito contribuiu para a realização deste estudo.

Aos professores da disciplina de Bioquímica **Ana Carolina Magalhães, Marília Afonso Rabelo Buzalaf e Rodrigo Cardoso de Oliveira**, obrigada pelos valiosos ensinamentos e atenção para com todos os alunos.

***Aos amigos do grupo de pesquisa,***

**Cintia Tokuhara**, Mariana Liessa, Adriano Pessoa, Kelly Inácio, Ana L. Pagnan, Vanessa Fakhoury, Adriana Matos, Flavia Amadeu. Obrigada pelos momentos juntos, pela amizade, pelos ensinamentos compartilhados e por terem, de alguma forma, contribuído para a realização deste trabalho. Foi um prazer trabalhar com pessoas como vocês! Desejo toda sorte do mundo a cada um.

Às técnicas e especialistas do laboratório de bioquímica, **Larissa e Thelma**. Por toda atenção e por sempre estarem dispostas a ajudar. Obrigada por compartilharem seus conhecimentos.

**Aos colegas e amigos do laboratório de bioquímica**. Obrigada pelos momentos de descontração, convivência, experiências compartilhadas e por terem me auxiliado de alguma forma, seja por um simples conselho ou ideia.

À grande amiga **Nara Ligia Martins Almeida**. Obrigada por toda agradável convivência durante toda a graduação e a pós-graduação, pelos conselhos, conversas, sinceridade e confiança. Muito obrigada por sua amizade!

Aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), **Rafaela Alavarce, Marcia Graeff e Marcelo Milanda**. Obrigada pelos auxílios nos experimentos, pela dedicação e competência ao lidar com as questões do laboratório e, também, pela amizade.

---

---



---

---

À secretária do departamento **Dalva Ribeiro de Oliveira**. Obrigada pelos conselhos, apoio e orientações, não só com assuntos relacionados à pós-graduação, mas também com assuntos relacionados à vida. Obrigada por toda atenção prestada a mim e aos demais alunos da pós.

A todos os professores da FOB-USP e HRAC, pelos ensinamentos, atenção e incentivo.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP**, pela oportunidade de ter realizado a iniciação científica, o mestrado e o doutorado, que tanto contribuem para a minha vida profissional. Todos esses anos ficarão para sempre em minha memória.

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

---

---



---

---

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

**Martin Luther King**

---

---



---

---

## RESUMO

O osteossarcoma é o tumor maligno primário mais comum do tecido ósseo e acomete principalmente crianças e adolescentes. Está associado a altas taxas de mortalidade, com etiologia pouco conhecida; sendo assim, estudos que envolvem conhecimentos acerca do tema se fazem necessários. A vanilina, o principal composto obtido do extrato natural da baunilha tem demonstrado, em diversas pesquisas, possuir propriedades antitumorais, assim como o seu dímero, chamado divanilina. O uso de compostos naturais para o tratamento da doença tem se tornado uma alternativa promissora, principalmente como agentes adjuvantes. O artigo 1 teve como principal objetivo reunir, por meio de uma revisão sistemática da literatura, plantas provenientes do bioma Cerrado brasileiro que possuem efeitos contra células tumorais. Foram identificadas 39 espécies no total e informações como composto majoritário e modo de ação nas células tumorais foram incluídas. O artigo 2 teve como objetivo avaliar as propriedades antitumorais dos compostos vanilina e divanilina em células ósseas tumorais murinas. Para isso, as linhagens de células ósseas normal (MC3T3-E1) e tumoral (UMR-106) foram cultivadas e mantidas em condições apropriadas para o estudo in vitro. Foram avaliados o efeito dos compostos vanilina e divanilina na viabilidade celular das linhagens normal e tumoral e formação de colônias, migração, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células tumorais, além da análise proteômica. Ambos os compostos mostraram exercer efeitos na viabilidade celular das linhagens normal e tumoral e diminuir a formação de colônias. O composto vanilina foi capaz de inibir o processo de migração e a divanilina diminuiu a produção de EROs. Quanto à análise proteômica, ambos os compostos mostraram agir sobre a expressão de importantes proteínas envolvidas na progressão tumoral. Nossos resultados sugerem que os compostos vanilina e divanilina possuem propriedades contra células ósseas tumorais murinas. O uso destes poderia ser uma alternativa promissora para o tratamento adjuvante do câncer ósseo, no entanto, necessitando de mais estudos.

**Palavras-chave:** Osteossarcoma. Vanilina. Divanilina.

---

---



---

---

## ABSTRACT

### **Evaluation of the antitumor effect of vanillin and divanillin on murine osteosarcoma cells**

Osteosarcoma is the most common primary malignant tumor of bone tissue and affects mainly children and adolescents. It is associated with high mortality rates, with a poorly known etiology; therefore, studies involving knowledge about the subject are necessary. Vanillin, the main compound obtained from the natural extract of vanilla, has been shown, in several studies, to have antitumor properties, as well as its dimer, called divanillin. The use of natural compounds for the treatment of the disease has become a promising alternative, mainly as adjuvant agents. The main objective of article 1 was to gather, through a systematic literature review, plants from the Brazilian Cerrado biome that have effects against tumor cells. A total of 39 species were identified and information as major compound and mode of action on tumor cells was included. Article 2 aimed to evaluate the antitumor properties of vanillin and divanillin compounds in murine bone tumor cells. For this purpose, normal (MC3T3-E1) and tumor (UMR-106) bone cell lines were cultivated and maintained under appropriate conditions for in vitro study. The effect of vanillin and divanillin compounds on cell viability of normal and tumor cell lines and colony formation, migration, production of reactive oxygen species (ROS) in tumor cells, in addition to proteomic analysis were evaluated. Both compounds have been shown to exert effects on cell viability of normal and tumor cell lines and were reduce colony formation. The compound vanillin was able to inhibit the migration process and divanillin decreased the production of ROS. As for proteomic analysis, both compounds were shown to act on the expression of important proteins involved in tumor progression. Our results suggest that vanillin and divanillin compounds have properties against murine bone tumor cells. The use of these could be a promising alternative for the adjuvant treatment of bone cancer, however, needing further studies

**Keywords:** Osteosarcoma. Vanillin. Divanillin.

---

---



---

---

## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                                   |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b>  | - Fórmula estrutural da vanilina e divanilina .....                                                                                                               | 21 |
| <b>Figura 2</b>  | - Efeito de diferentes concentrações de vanilina e divanilina na viabilidade celular pelo ensaio de MTT após 72h de incubação. ....                               | 77 |
| <b>Figura 3</b>  | - Efeito de diferentes concentrações de vanilina e divanilina na viabilidade celular por teste colorimétrico de violeta cristal após 72h de incubação .....       | 77 |
| <b>Figura 4</b>  | - Imagens microscópicas e quantificação da formação de colônias de UMR-106 tratadas com vanilina e divanilina .....                                               | 79 |
| <b>Figura 5</b>  | - Efeitos da vanilina e divanilina na produção de espécies reativas de oxigênio em UMR-106.....                                                                   | 80 |
| <b>Figura 6</b>  | - Imagens microscópicas e quantificação do ensaio de migração celular das células UMR-106 .....                                                                   | 81 |
| <b>Figura 7</b>  | - Diagrama de Venn. Mostra o número de proteínas identificadas nas células UMR-106 tratadas ou não (controle) com vanilina e divanilina .....                     | 83 |
| <b>Figura 8</b>  | - Distribuição funcional de proteínas identificadas com diferença na expressão em células ósseas tumorais (UMR-106) expostas ou não (controle) à vanilina.....    | 84 |
| <b>Figura 9</b>  | - Distribuição funcional de proteínas identificadas com diferença na expressão em células ósseas tumorais (UMR-106) expostas ou não (controle) à divanilina ..... | 85 |
| <b>Figura 10</b> | - Distribuição funcional de proteínas identificadas com diferença na expressão em células ósseas tumorais (UMR-106) expostas à vanilina versus divanilina.....    | 86 |

---

---



---

---

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

**Tabela 1** - Espécie da planta, nome popular, partes utilizadas, tipo de extrato (fração), linhagens celulares tumorais e referências .....39

**Tabela 2** - Espécie da planta, composto majoritário e provável modo de ação ..53

### ARTIGO 2

**Tabela 1** - Proteínas com expressão significativamente alterada nas células de osteossarcoma UMR-106 tratadas com divanilina ou não tratadas (controle) .....91

**Tabela 2** - Proteínas com expressão significativamente alterada nas células de osteossarcoma UMR-106 tratadas com vanilina ou não tratadas (controle) .....97

**Tabela 3** - Proteínas com expressão significativamente alterada nas células de osteossarcoma UMR-106 tratadas com vanilina ou divanilina .....102

---

---



---

---

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

|                               |                                                     |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------|
| ATP                           | Adenosina trifosfato                                |
| ASK1                          | Apoptosis Signal-regulating Kinase 1                |
| CDK-6                         | Cyclin-dependent kinase 6                           |
| CO <sub>2</sub>               | Dióxido de carbono                                  |
| DCFH                          | 7'- diclorofluoresceína                             |
| DCFH-DA                       | 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína              |
| DMEM                          | Dulbecco's Modified Eagle Medium                    |
| DMSO                          | Dimetilsulfóxido                                    |
| DNA                           | Ácido desoxirribonucleico                           |
| DOX                           | Doxorubicin                                         |
| ERN                           | Espécies reativas de nitrogênio                     |
| EROs                          | Espécies reativas de oxigênio                       |
| FAK                           | Quinase de adesão focal                             |
| SFB                           | Soro fetal bovino                                   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio                              |
| HPLC                          | Cromatografia líquida de alta performance           |
| JAK2                          | Janus kinase-2                                      |
| MC3T3-E1                      | Linhagem de pré-osteoblasto                         |
| αMEM                          | Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification |
| MMP                           | Metaloproteinase de matriz                          |
| NaOH                          | Hidróxido de sódio                                  |
| NF-κB                         | Nuclear factor kappa B                              |
| O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>  | Ânion superóxido                                    |
| OS                            | Osteossarcoma                                       |
| PBS                           | Solução salina tamponada com fosfato                |
| PI3K                          | Fosfoinosítideo 3-quinase                           |
| PLGS                          | ProteinLynx Global Server                           |
| PLK1                          | Polo like kinase 1                                  |
| RFU                           | Relative fluorescence unit                          |
| STAT-3                        | Signal transducer and activator of transcription 3  |

---

---



---

---

|         |                                            |
|---------|--------------------------------------------|
| UMR-106 | Linhagem de osteosarcoma murino            |
| TGF     | Fator de crescimento transformador         |
| IGF     | Fator de crescimento semelhante a insulina |
| CTGF    | Fator de crescimento do tecido conjuntivo  |

---

---



---

---

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                |            |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                         | <b>17</b>  |
| 1.1      | Câncer .....                                                                                   | 17         |
| 1.2      | Osteossarcoma.....                                                                             | 18         |
| 1.3      | Vanilina e divanilina .....                                                                    | 21         |
| <br>     |                                                                                                |            |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                         | <b>27</b>  |
| <br>     |                                                                                                |            |
| <b>3</b> | <b>ARTIGOS .....</b>                                                                           | <b>31</b>  |
| 3.1      | ARTIGO 1 - Activity of Brazilian Cerrado plants in tumor cell lines – A systematic review..... | 31         |
| 3.2      | ARTIGO 2 - Antitumor effect of vanillin and divanillin on murine osteosarcoma cells .....      | 65         |
| <br>     |                                                                                                |            |
| <b>4</b> | <b>DISCUSSÃO AMPLIADA E FUNDAMENTADA.....</b>                                                  | <b>115</b> |
| <br>     |                                                                                                |            |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                                         | <b>121</b> |
| <br>     |                                                                                                |            |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                       | <b>125</b> |

---

---



# 1 INTRODUÇÃO

---



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

A formação de tumores é um processo de múltiplos estágios que envolve uma série de eventos como o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. As modificações podem ser iniciadas por agentes externos e fatores genéticos hereditários. A transformação e progressão de células cancerosas envolve eventos complexos, incluindo “*downregulation*” de vários genes que são fundamentais para os processos de proliferação, diferenciação e morte celular. Apesar do desenvolvimento de novos tratamentos, o câncer ainda é a segunda maior causa de morte nos países ocidentais. Uma das causas é o fato de que vários tipos de tumor desenvolvem mecanismos para evitar a morte celular induzida por tratamentos convencionais (SAINZ; LOMBO; MAYO, 2012; KHAN et al., 2016).

O desenvolvimento do câncer compreende certas capacidades biológicas adquiridas que incluem sustentação da sinalização proliferativa, resistência à morte celular, indução da angiogênese, capacidade de invasão e metástase. A instabilidade do genoma e a inflamação também são características da doença. Além das células tumorais, os tumores apresentam um repertório de células normais que contribuem para o “microambiente tumoral” (HANAHA, WEINBERG, 2011; CARMONA-FONTAINE et al., 2017). O microambiente tumoral, que inclui sinais químicos (como fatores de crescimento e citocinas) e sinais biofísicos (pressão intersticial e mecânica da matriz), é extremamente complexo e desempenha um papel importante na progressão e metástase do tumor à medida que evolui ao longo do tempo (ZHANG et al., 2016).

A metástase é o resultado da disseminação de células tumorais a partir da neoplasia primária para um órgão/tecido distante e posterior adaptação no novo microambiente. O processo de disseminação constitui-se num evento multi-passos no qual as células cancerosas devem ultrapassar a matriz extracelular, entrar na corrente sanguínea, sobreviver ao transporte através do sistema circulatório e, finalmente, chegar ao novo órgão/tecido. O desenvolvimento de metástases sinaliza

---

mau prognóstico, dando origem a altas taxas de mortalidade, sendo os pacientes com câncer de pulmão, cólon e mama os principais associados a estas altas taxas (AGBARYA et al., 2014; SILVA et al., 2016).

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Espera-se que a incidência mundial da doença passe de 14 milhões em 2012 para 22 milhões nos próximos 20 anos, o que leva a um aumento significativo dos custos de saúde e a grande necessidade da melhor compreensão de seus mecanismos para que melhores terapias sejam desenvolvidas (ZHANG et al., 2016). Os tumores apresentam um grande grau de heterogeneidade genética e fenotípica que dificultam o diagnóstico e tratamento (CARMONA-FONTAINE et al., 2017).

Pesquisadores têm investigado as propriedades de compostos obtidos de plantas medicinais a fim de desenvolver novas drogas capazes de controlar a doença. O uso destes compostos no tratamento do câncer pode reduzir os efeitos colaterais adversos e ajudar no tratamento. Nos últimos anos, vários fitoquímicos têm sido estudados e muitos deles mostraram eficácia anticancerígena promissora contra diferentes tipos de câncer como, por exemplo, carcinoma epidérmico bucal humano, leucemia, câncer colorretal humano, câncer de próstata e osteossarcoma (WU et al., 2016; BHANDARI, 2017).

## **1.2 Osteossarcoma**

Osteossarcoma é um tumor ósseo maligno primário derivado de células mesenquimais ósseas e caracterizado pela proliferação de células neoplásicas que produzem diretamente osso imaturo ou osteóide. A maioria dos casos da doença ocorre nos ossos longos, mas também pode envolver outros ossos do corpo. É sugerido que o osteossarcoma tenha início nas células responsáveis pela formação óssea derivadas do mesênquima primitivo e ocorre geralmente nos ossos de crescimento rápido, como das pernas e braços (MOORE; LUU, 2014; ZOU; ZHANG; LI 2017; ZHOU et al., 2020). É a malignidade óssea mais comum em crianças e adolescentes, porém, a etiologia da doença permanece ainda desconhecida. A incidência anual estimada de osteossarcoma no mundo é de quatro casos por

---

milhão de pessoas, sendo pacientes com menos de 20 anos os principais acometidos pela doença (YONG et al., 2017).

Os mecanismos envolvidos na patogênese e progressão do osteossarcoma incluem alterações na diferenciação de células-tronco mesenquimais, expressão anormal de oncogenes e supressores de tumor e desregulação de várias vias de sinalização (DENDULURI et al., 2015). Novas terapias estão sendo investigadas para melhorar o tratamento da doença. Foram estudados alvos moleculares que modelam ativamente processos celulares tais como o controle do ciclo celular, proliferação, metabolismo e apoptose, porém, continua a ser um desafio o desenvolvimento de novas terapias eficazes para o tratamento desta doença heterogênea e complexa (SAMPSON et al., 2015). Apesar da quimioterapia convencional e excisão cirúrgica do tumor primário, o tumor ósseo frequentemente leva à morte do paciente devido à metástase pulmonar; assim, há uma crescente sensação de urgência para que se identifiquem novos marcadores biológicos e novas abordagens terapêuticas inovadoras (KUMAR; FUCHS, 2015; SHAIKH et al., 2016).

Embora a etiologia do osteossarcoma não seja bem compreendida, vários fatores demonstram estarem envolvidos no desenvolvimento da doença. Um desses fatores é a alteração genética dos supressores de tumor. Diversos fatores ambientais podem culminar na mutação destes genes, fazendo com que eles percam sua função. O p53 e o retinoblastoma (Rb) são genes supressores de tumor bem conhecidos; portanto, foi comprovado que mutações nestes genes estão envolvidas na patogênese do osteossarcoma (BROADHEAD, 2011; DU, 2016). A expressão desregulada de fatores de crescimento também leva a proliferação acelerada de células ósseas. Estes incluem fator de crescimento transformador (TGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e Fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (BROADHEAD, 2011).

Outro fator relacionado à patogênese da doença é a angiogênese, processo essencial para o crescimento sustentado do câncer e metástase. O fator induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) é um fator de transcrição que medeia as respostas homeostáticas a condições de hipóxia, por meio da ativação de diversos genes alvo envolvidos na angiogênese, metabolismo energético, eritropoiese, proliferação

---

celular e viabilidade, remodelação vascular e respostas vasomotoras. Este fator de transcrição é altamente expresso em diversos tipos de tumor, entre eles, o osteossarcoma (BROADHEAD, 2011; LI et al., 2016; Zhang et al., 2021). Diversos estudos mostram que as interleucinas estão envolvidas em uma variedade de tipos de tumor. A interleucina-6, por exemplo, pró-inflamatória, funciona como ativador de Janus kinase 2 (JAK2) / transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3 (STAT3); STAT3 é um fator de transcrição que participa da regulação da proliferação celular e apoptose e é identificado como um oncogene em vários tipos de tumor, inclusive o osteossarcoma. A interleucina-6 desempenha um papel importante na disseminação e invasão do câncer por meio da vascularização tumoral e angiogênese (WU et al., 2017; SHI et al., 2020).

Algumas vias de sinalização estão envolvidas na patogênese do osteossarcoma. Estas incluem as vias Notch, Wnt, Hedgehog, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase (PI3K)/AKT e JAK/STAT. Alguns compostos naturais mostraram interferir nestas vias de forma eficaz, incluindo curcumina, trissulfeto de dialilo, resveratrol, apigenina, ciclopamina e sulforafano. Estes compostos podem induzir a modulação destas vias de sinalização do câncer e, possivelmente, facilitar novas modalidades de tratamento para o osteossarcoma. Estes vários fitoquímicos já demonstraram eficácia considerável em uma variedade de outros tipos de tumores, o que mostra que compostos naturais representam uma alternativa promissora para o tratamento da doença (ANGULO et al., 2017). Os compostos isolados de plantas com potenciais bioativos anticancerígenos representam um recurso valioso para o tratamento do câncer e têm atraído cada vez mais o interesse nos últimos anos (XU, 2016).

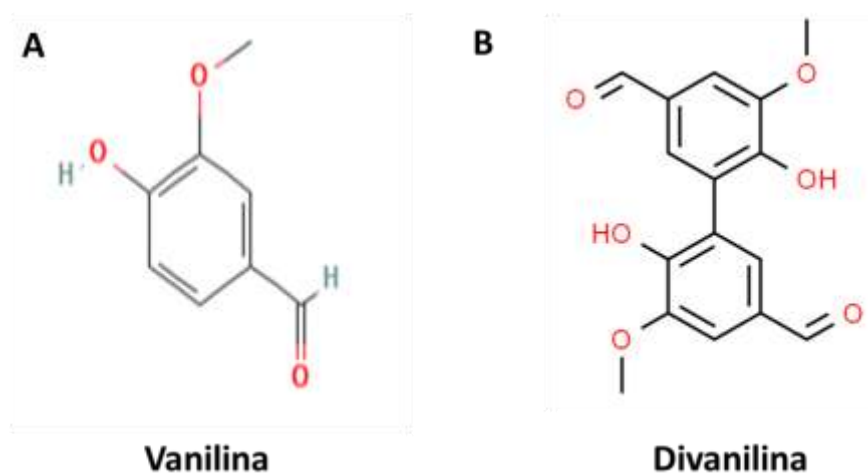
Pesquisas clínicas e epidemiológicas forneceram evidências que sustentam o papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de nitrogênio (ERN), conhecidas coletivamente como estresse oxidativo, na etiologia do câncer. Fatores como inflamação crônica, infecção e hipóxia são as principais fontes de estresse oxidativo celular (SAED; DIAMOND; FLETCHER, 2017). Foi sugerido que a capacidade antimutagênica da vanilina, além da remoção de EROs, se deve ao aumento da reparação recombinante recA-dependente, inibição da reparação de SOS propensa a erros e inibição de união de extremidade de DNA não homóloga (TAI et al., 2011).

---

Diversos compostos têm sido estudados no intuito de encontrar um possível agente que traga benefícios para o tratamento do osteossarcoma. A vanilina, composto utilizado neste estudo mostrou, em diversos relatos da literatura, possuir uma capacidade antiproliferativa, sendo assim, uma possível droga utilizada no tratamento de tumores (CARRASCO-GOMEZ et al., 2014; BEZERRA; SOARES; SOUSA, 2016; LI et al., 2021).

### 1.3 Vanilina e divanilina

A baunilha é uma das essências mais utilizadas nas indústrias de bebidas e alimentos, além do uso em perfumaria e produtos farmacêuticos. É amplamente cultivada na Indonésia, Madagascar e China, entre outros continentes. O extrato natural da baunilha, obtido das orquídeas *Vanilla planifolia* ou *Vanilla tahitensis* (família Orchidaceae) apresenta mais de 200 componentes, sendo o composto principal a vanilina (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) (Figura 1). Outros compostos incluem ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, ácido p-hidroxibenzóico, açúcares e lipídeos. A vanilina é um pó branco cristalino, apresenta um odor doce e intenso de baunilha, sendo assim utilizada como ingrediente em diversos produtos alimentícios (KAUR; CHAKRABORTY, 2013; CHEE et al., 2017). A figura 1 mostra a fórmula estrutural da vanilina.



**Figura 1.** Fórmula estrutural. (A) Vanilina (B) Divanilina.

A vanilina é um aldeído fenólico natural e suas propriedades incluem efeitos antimutagênicos, antioxidantes e antimicrobianos contra bactérias, leveduras e bolores (HO et al., 2012; SHARMA et al., 2016; TAKMA; KOREL, 2017). Dentre todos os metabólitos secundários de plantas, os compostos fenólicos têm se destacado por serem amplamente estudados e comumente utilizados como antioxidantes em uma variedade de aplicações. Os antioxidantes desempenham um papel importante para a saúde, pois são capazes de prevenir e eliminar os radicais livres, retardar o processo de envelhecimento, aliviar doenças crônicas e degenerativas tais como hipertensão, doenças autoimunes, aterosclerose e câncer (MINH et al., 2016; VIŠNJEVEREC; SCHWARZKOPF, 2020).

Diversos estudos relatam que alguns produtos naturais bioativos desempenham um importante papel no desenvolvimento de drogas anticâncer, revelando excelente potencial farmacoterapêutico. A atividade antioxidante é comumente encontrada em muitas destas moléculas, especialmente nas substâncias fenólicas. Considerando o envolvimento do estresse oxidativo e das espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento de processos cancerígenos, substâncias que apresentam capacidade antioxidante como, por exemplo, a vanilina, podem representar uma nova abordagem de tratamento (BEZERRA; SOARES; SOUSA, 2016).

De fato, diversos estudos demonstraram que a vanilina apresenta efeitos antimutagênicos, anticancerígenos e antimetastáticos (LIRDPRAPAMONGKOL et al., 2005; LIRDPRAPAMONGKOL et al., 2009; HO et al., 2012; LI et al., 2021). Elsherbinya e colaboradores (2016) investigaram a atividade anticancerígena da vanilina contra câncer de mama e a possível potencialização sinérgica dos efeitos quimioterapêuticos de *doxorubicin* (DOX) pela vanilina. Os resultados mostram que a vanilina exerceu efeitos anticancerígenos comparáveis a DOX e potenciados sinergicamente tanto *in vivo* como *in vitro*. Ofereceu também um efeito inibidor de crescimento *in vitro* e citotoxicidade mediada por apoptose (aumento da caspase-9 e razão Bax: Bcl-2) juntamente com um efeito antimetastático. Além disso, a vanilina foi capaz de proteger contra a nefrotoxicidade induzida por DOX em ratos.

Foi demonstrado que compostos derivados da vanilina foram capazes de reduzir a atividade da quinase Plk1, um regulador chave da mitose. Plk1 é

---

superexpressa em todos os tumores humanos hoje analisados; seu nível de expressão indica mal prognóstico e serve como medida da agressividade de um tumor (CARRASCO-GOMEZ et al., 2014). A vanilina também mostrou possuir efeitos citolíticos e citostáticos em linhagens celulares de câncer colorretal humano (HO et al., 2009). Outro estudo, ainda, mostrou que a vanilina inibiu a expressão de metaloproteinase-9 por meio da ação sobre o fator nuclear NF- $\kappa$ B em células de carcinoma hepatocelular humano (LIANG et al., 2009). Lirdprapamongkola e colaboradores (2005) também revelaram a capacidade da vanilina de agir sobre a atividade enzimática de Metaloproteinase 9 da matriz (MMP-9).

Uma descoberta importante foi de que a divanilina (Figura 1), um homodímero da vanilina, possui um maior potencial anti-metastático do que o agente aromatizante vanilina. O estudo conduzido por Jantaree e colaboradores (2017), mostrou que a divanilina exibiu uma maior potência do que a vanilina na inibição da invasão de células de carcinoma hepatocelular. As formas monomérica e dimérica destinam-se à regulação do processo de invasão, inibindo a fosforilação de FAK e Akt. Estudos de ancoragem molecular sugeriram que os dímeros devem ligar-se mais firmemente do que a vanilina ao bolso Y397 do domínio FAK FERM. O mesmo foi constatado para o composto diapocinina, o homodímero da apocinina (JANTAREE et al., 2017).

Considerando-se os pontos apresentados e o fato de que não há registros na literatura sobre os efeitos da vanilina e divanilina em células de osteossarcoma, o presente estudo dispõe-se a investigar o possível papel antiproliferativo da vanilina e seu derivado divanilina em células de osteossarcoma murino.

---

---



## **2 OBJETIVOS**

---



## **2 OBJETIVOS**

A presente tese é constituída por 2 artigos. O Artigo 1, intitulado “Activity of Brazilian Cerrado plants in tumor cell lines – A systematic review”, possui como objetivos:

1. Reunir, por meio de uma revisão sistemática da literatura, artigos relacionados a plantas provenientes do bioma Cerrado brasileiro que possuem ação sobre diferentes células tumorais.

O Artigo 2, intitulado “Antitumor effect of vanillin and divanillin on murine osteosarcoma cells”, possui como objetivos avaliar:

1. Os efeitos de diferentes concentrações dos compostos vanilina e divanilina na viabilidade celular de células ósseas tumorais (UMR-106) e ósseas normais (MC3T3-E1);
  2. A capacidade de formação de colônias por células de osteossarcoma após o tratamento com vanilina e divanilina;
  3. O efeito dos compostos vanilina e divanilina na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) intracelular na linhagem UMR-106;
  4. O efeito da vanilina e seu dímero na migração celular de UMR-106;
  5. Avaliação do efeito dos compostos vanilina e divanilina na expressão de proteínas totais na linhagem de célula óssea tumoral, UMR-106.
- 
-



**3 ARTIGOS**

---



### **3 ARTIGOS**

#### **3.1 ARTICLE 1**

The article presented in this thesis was written according to the Revista Einstein - instructions and guidelines for article submission

Activity of Brazilian Cerrado plants in tumor cell lines – A systematic review

Atividade de plantas do Cerrado Brasileiro em linhagens de células tumorais - Uma revisão sistemática

**Oliveira, G.S.N.de<sup>1</sup>; Oliveira, R.C.de<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Brasil. Endereço postal: Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, R. Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, ZIPCODE:17012-901, Bauru, SP, Brasil.

E-mail: [rodrigocardoso@usp.br](mailto:rodrigocardoso@usp.br)

---

## RESUMO

**Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi reunir, por meio de uma revisão sistemática da literatura, artigos relacionados a plantas provenientes do bioma Cerrado brasileiro que possuem ação sobre diferentes células tumorais.

**Metodologia:** Foram utilizadas diferentes palavras-chave nos mecanismos de busca das bases de dados Pubmed, Scielo, Science Direct, Scopus e Lilacs. Dos estudos encontrados, foram excluídos os títulos que não refletiam o objetivo da presente revisão, os que não disponibilizam o acesso ao texto completo e os que foram publicados antes de 2005. Foram selecionados os artigos referentes à atividade de plantas do Cerrado em células tumorais publicados nos últimos dezesseis anos, totalizando trinta e nove artigos. Número de registro da presente revisão: #CRD42020205579.

**Resultados e conclusão:** Os extratos das plantas estudadas demonstraram significativos efeitos antiproliferativos contra diversas linhagens de células tumorais. Foram identificadas 39 espécies de plantas que pertencem às famílias: Combretaceae, Annonaceae, Celastraceae, Verbenaceae, Solanaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Bignoniaceae, Erythroxylaceae, Sapotaceae, Asteraceae, Elaeocarpaceae, Apocynaceae, Anacardiaceae, Calophyllaceae, Lythraceae, Mimosaceae, Burseraceae, Fabaceae e Moraceae. Os extratos foram obtidos de diferentes partes das plantas e foram utilizadas diferentes frações dos mesmos. Pode-se concluir que o Cerrado possui uma ampla variedade de plantas com ação antitumoral, sendo necessário realizar mais estudos para que sejam descobertas outras espécies com potencial anticancerígeno, além de estudos in vivo.

**Descritores:** Cerrado. Plantas medicinais. Câncer.

## ABSTRACT

**Objectives:** The aim of this study was to gather, through a systematic literature review, articles related to plants from the Brazilian Cerrado biome that have action on different tumor cells.

**Methodology:** Different keywords were used in the search mechanisms of Pubmed, Scielo, Science Direct, Scopus and Lilacs databases. Of the studies found, titles that did not reflect the purpose of this review, those that do not provide access to the full text, and those that were published before 2005 were excluded. Articles referring to

---

the activity of Cerrado plants in tumor cells published in the last sixteen years were selected, totaling thirty-nine articles. Registration number of this review: #CRD42020205579.

Results and conclusion: The extracts from the studied plants demonstrated significant antiproliferative effects against several tumor cell lines. 39 species of plants were identified belonging to the families: Combretaceae, Annonaceae, Celastraceae, Verbenaceae, Solanaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Bignoniaceae, Erythroxylaceae, Sapotaceae, Asteraceae, Elaeocarpaceae, Apocynaceae, Anacardiaceae, Calophyllaceae, Lythraceae, Mimosaceae, Morseraceae. The extracts were obtained from different parts of the plants and different fractions were used. It can be concluded that the Cerrado has a wide variety of plants with antitumor action, and further studies are needed to discover other species with anticancer potential, in addition to in vivo studies.

Key words: Cerrado. Medicinal plants. Cancer.

## **INTRODUÇÃO**

O câncer caracteriza-se como um crescimento celular descontrolado ou proliferação celular capaz de invadir outros tecidos. Existem aproximadamente cem tipos que se denominam pelo tecido, órgão ou tipo celular nos quais a doença se inicia. Produtos químicos, radiações, dieta inadequada, infecção, fatores ambientais e fumo consistem em alguns dos principais fatores de risco <sup>(1)</sup>. A doença é um problema relevante para a saúde pública e o tratamento representa um obstáculo, pois muitas vezes não se obtêm sucesso. É considerado a principal causa de morte em países desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento, o que leva a um aumento considerável dos custos de saúde e a grande necessidade da melhor compreensão de seus mecanismos, para que melhores terapias sejam desenvolvidas para o controle da doença <sup>(2,3)</sup>.

---

No que diz respeito ao tratamento do câncer, as plantas medicinais representam uma alternativa promissora. Estas são fonte de importantes moléculas bioativas com ampla diversidade estrutural que demonstram, de forma geral, menor toxicidade e maior seletividade contra células tumorais<sup>(4)</sup>. Ademais, também demonstram ser capazes de diminuir os efeitos colaterais induzidos pelos medicamentos sintéticos e aumentar a taxa de sobrevivência para muitos pacientes<sup>(5)</sup>. Reconhece-se que muitos produtos naturais apresentam uma rica diversidade química, sendo uma fonte para a identificação de novas estruturas e, consequentemente, para a fabricação de novas drogas<sup>(6)</sup>. Atualmente, as fontes de produtos naturais utilizadas para o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer incluem, além de plantas, organismos marinhos e micro-organismos, sendo mais diversificadas do que no passado. Contudo, as plantas continuam sendo uma fonte promissora de produtos naturais para a quimioprevenção, visto que cerca de 25% das terapias atuais disponíveis provêm de plantas<sup>(7,8)</sup>.

O Cerrado, conhecido como a “Savana das Terras Tropicais”, é um bioma brasileiro que ocupa cerca de 20% do território nacional. A vegetação, bastante heterogênea, com biodiversidade taxonômica que chega a ser maior do que a da floresta amazônica, ocorre especialmente nos estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Ceará. A região é considerada um hotspot mundial de biodiversidade e apresenta diversas espécies de plantas que são amplamente utilizadas na medicina popular e nas pesquisas científicas. Devido à ampla diversidade, há um crescente aumento de interesse no Cerrado, a fim de que novas plantas medicinais com compostos biativos sejam descobertas<sup>(9, 10, 11)</sup>. As espécies presentes no bioma já são utilizadas por comunidades locais para o tratamento de diversas doenças e pesquisas com modelos biológicos já demonstraram o potencial

---

promissor de várias moléculas provenientes destas espécies <sup>(12)</sup>. A ação benéfica das plantas já foi comprovada em processos inflamatórios, contra micro-organismos, câncer, dentre outras enfermidades <sup>(13)</sup>.

A busca por novos medicamentos que exibem ação contra vários tipos de tumores é um dos assuntos mais interessantes no campo da pesquisa de produtos naturais<sup>(14)</sup>. Nesta área, as plantas são consideradas bastante promissoras, uma vez que seus derivados são amplamente utilizados para controle do câncer. Um exemplo é *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), uma planta a partir da qual foram isolados “Vinblastine (Velban®)” e “Vincristine (Oncovin®)” que podem ser utilizados no tratamento de vários tipos de tumor <sup>(15)</sup>. A interrupção do ciclo celular, a indução da apoptose e a inibição de fatores angiogênicos nas células cancerosas são efeitos importantes que se associam a esses medicamentos baseados em plantas<sup>(16)</sup>. Neste sentido, o Cerrado se destaca visto que muitos compostos com importantes atividades biológicas já foram obtidos a partir de plantas deste bioma <sup>(14)</sup>.

Diante da importância do assunto exposto, nos surgiu a necessidade de reunir, na presente revisão sistemática, as publicações dos últimos 16 anos relacionadas à ação das plantas do bioma Cerrado brasileiro em diferentes linhagens de células tumorais humanas ou animais.

## **MÉTODOS**

A presente revisão sistemática está registrada na base PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews) sob o número de registro #CRD42020205579.

---

---

### **Tipos de estudo**

Os artigos relacionados aos efeitos de plantas provenientes do bioma Cerrado brasileiro em células tumorais humanas e animais, que utilizaram grupos controle plausíveis para o estudo (não tratado, veículo, veículo tratado e quimioterápicos padrão), in vitro, publicados entre 2005 e 2020, nos idiomas inglês ou português foram incluídos. Não foram considerados métodos, tempo e concentração de extratos/compostos. As informações sobre as plantas reunidas no presente artigo incluem: espécies, nome popular, parte usada da planta, tipo de extrato, célula alvo, provável ativo principal dos extratos e modo de ação.

### **Estratégia de busca**

Nossa pesquisa sobre a ação de plantas do cerrado brasileiro sobre células tumorais foi realizada utilizando as bases de dados Pubmed, Scielo, Science Direct, Scopus e Lilacs. Filtro de data (2005 – 2020), de texto completo e tipo de artigo (Artigos de Pesquisa) foram aplicados. A busca incluiu texto livre e termos MeSH (Medical Subject Heading): 1: Cerrado plants and Tumor Cell Lines; 2: Medicinal Plants and Cerrado and Tumor Cell Lines; 3: Medicinal Herbs and Cerrado and Tumor Cell Lines; 4: Phytotherapy and Cerrado and Tumor Cell Lines e 5: Pharmaceutical Plants and Cerrado and Tumor Cell lines. A última atualização da pesquisa foi em janeiro/2021.

## **RESULTADOS**

Um total de 225 artigos científicos foram selecionados nas cinco bases de dados consultadas. Após a exclusão dos títulos duplicados, resumos não relacionados e artigos “not open access”, restaram 35 artigos. Após uma busca livre,

---

4 artigos foram incluídos, totalizando 39 artigos científicos. Trinta e nove espécies de plantas são citadas, juntamente com o nome popular, parte usada da planta, tipo de extrato, célula alvo e referência (Tabela 1). Também foram reunidas as seguintes informações: componente majoritário do extrato e provável modo de ação sobre células tumorais (Tabela 2 – ANEXO).

---

---



**TABELA 1.** Espécie da planta, nome popular, partes utilizadas, tipo de extrato (fração), linhagens celulares tumorais e referências.

| Espécie                                      | Nome popular                | Parte usada da planta  | Tipo de extrato | Célula alvo                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Anacardium humile</i>                     | ‘Cajuzinho’                 | Casca (c) e folhas (f) | Etanólico       | NCI- H292 (pulmão) (-)<br>HEp-2 (laringe) (-)<br>HT-29 (cólon) (-)<br>HL-60 (leucemia promielocítica) (-)<br>MCF-7 (mama) (C, F,+)                                                                |
| <i>Tabebuia avellanedae</i>                  | ‘Purple ipê’                | Casca e folhas         |                 | NCI- H292 (-), HEp-2 (F +)<br>HT-29 (-), HL-60 (F +)<br>MCF-7 (-)                                                                                                                                 |
| <i>Brosimum gaudichaudii</i> <sup>(17)</sup> | ‘Inharé’                    | Casca e folhas         |                 | NCI- H292 (F, +), HEp-2 (-)<br>HT-29 (F, +), HL-60 (-)<br>MCF-7 (C, +)                                                                                                                            |
| <i>Annona coriacea</i> <sup>(18)</sup>       | ‘Marola’<br>‘Araticum-liso’ | Sementes               | Metanólico      | *Todas as linhagens<br><br>*UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama),<br>NCI/ADR/RES (ovário), 786-0 (rim), NCI-H460<br>(pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon),<br>K562 (leucemia), UA251 (glioma) (+) |
| <i>Annona crassiflora</i> <sup>(19)</sup>    | “Araticum”                  | Sementes e casca       | Fenólico        | NCIADR/RES (ovário) (+)<br>U251 (glioma) (+)<br>MCF-7 (mama) (+)<br>NCI-H460 (pulmão) (-)<br>PC-3 (próstata) (+)<br>OVCAR-03 (ovário) (+)<br>HT-29 (cólon) (+)<br>K562 (leucemia) (+)             |

|                                                       |                                                             |                       |                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Austroplenckia populnea</i></b> <sup>(20)</sup> | ‘Mangabarana’<br>‘Marmelo-do-campo’<br>‘Mangabeira-brava’   | Samaras               | Compostos puros<br>(proanthocyanidin A e<br>4'-O-methyl-<br>epigallocatechin)<br><br>três extratos brutos<br>(etanol,<br>acetato de etila<br>e clorofórmio) | A549 (pulmão) (+)<br>HS578T (ducto mama) (+)<br>MCF-7 (ducto mama) (+)<br><br>A549 (-)<br>HS578T (-), MCF-7 (-)                                                                                               |
| <b><i>Calea pinnatifida</i></b> <sup>(21)</sup>       | ‘Quebra-tudo’<br>‘Cipó-cruz’<br>‘Aruca’                     | Componentes<br>aéreos | Diclorometano                                                                                                                                               | UACC-62 (melanoma) (+)<br>MCF-7 (mama) (+)<br>786-O (rim) (+)<br>NCI-ADR/RES (ovário) (+)<br>NCI-H460 (pulmão) (+)<br>PC-3 (próstata) (+)<br>OVCAR-3 (ovário) (+)<br>HT29 (cólon) (+)<br>K-562 (leucemia) (+) |
| <b><i>Calotropis procera</i></b> <sup>(22)</sup>      | ‘Algodão de seda’<br>‘Leiteiro’<br>‘Queimadeira’<br>‘Ciúme’ | Caule                 | acetato de etila,<br>acetona<br><br>hexânico, metanólico<br>diclorometano                                                                                   | B-16/F10 (melanoma - murino) (+)<br>HCT-8 (cólon- humano) (+)<br>CEM (leucemia humana) (+)<br><br>B-16/F10 (-)<br>HCT-8 (-)<br>CEM (-)                                                                        |
| <b><i>Campomanesia adamantium</i></b>                 | ‘Guavira’                                                   | Folhas                | Óleo essencial                                                                                                                                              | MCF-7 (mama) (+)<br>HeLa (cervical) (+)<br>M059J (glioblastoma) (+)                                                                                                                                           |

|                                                  |                  |                         |                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Protium ovatum</i>                            | 'Almecega'       | Folhas<br>Frutas verdes |                                                                   | MCF-7 (-), HeLa (-), M059J (+)<br>MCF-7 (-), HeLa (-), M059J (-)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>Cardiopetalum calophyllum</i> <sup>(23)</sup> | 'Imbirinha'      | Folhas                  |                                                                   | MCF-7 (+), HeLa (+), M059J (+)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <i>Chresta sphaerocephala</i> <sup>(13)</sup>    | "João-bobo"      | Folhas (f)<br>Casca (c) | Hexânio (f)<br><br>Hexânico (c)<br><br>Metanólico<br>Etil acetato | U251 (glioma) (+), UACC-62 (melanoma) (+), MCF7 (mama) (-), NCI-ADR/RES (ovário) (+), 786-0 (rim) (+), NCI-H460 (pulmão) (+), OVCAR-3 (ovário) (+), PC-03 (próstata) (+), HT29 (cólon) (+) e K-562 (leucemia) (+)<br><br>U251 (-), UACC-62 (+), MCF-7 (+), NCI-ADR/RES (-), 786-0 (-), NCI-H460 (-), OVCAR-3 (+), PC-3 (+), HT29 (-), K-562 (+)<br><br>não mostrou nenhum efeito antiproliferativo<br>não mostrou nenhum efeito antiproliferativo |
| <i>Dipteryx alata</i> Vog. <sup>(24)</sup>       | 'Baru'           | Sementes                | Fenólico                                                          | HT29 (cólon) (+)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>Eremanthus matogressensis</i>                 | Não informado    | Folhas                  | (composto isolado)                                                | T98G (+) e U87MG (+)<br>(Glioblastoma multiforme)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <i>Eremanthus seidelii</i> <sup>(25)</sup>       | Não informado    | Folhas                  | (composto isolado)                                                | T98G (-), U87MG (-)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <i>Erythroxylum daphnites</i> <sup>(26)</sup>    | 'Fruta-de-pomba' | Folhas                  | Hexânico                                                          | SCC-9 (oral) (+)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                     |                  |        |                                         |                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------|------------------|--------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Erythroxylum suberosum</i></b>                | 'Mercurinho'     | Folhas | Aquoso<br>Etanólico<br>Hexânico         | FaDu (+), SCC-25 (+), SCC-9 (-)<br>FaDu (+), SCC-25 (-), SCC-9 (-)<br>FaDu (+), SCC-25 (-), SCC-9 (+)    |
| <b><i>Erythroxylum daphnites</i></b>                |                  | Folhas | Aquoso<br>Etanólico<br>Hexânico         | FaDu (-), SCC-25 (-), SCC-9 (-),<br>FaDu (+), SCC-25 (-), SCC-9 (-),<br>FaDu (+), SCC-25 (-), SCC-9 (-), |
| <b><i>Erythroxylum subrotundum</i></b>              |                  | Folhas | Aquoso<br>Etanólico<br>Hexânico         | FaDu (-), SCC-25 (-), SCC-9 (-),<br>FaDu (-), SCC-25 (-), SCC-9 (-),<br>FaDu (-), SCC-25 (+), SCC-9 (+), |
| <b><i>Pouteria torta</i></b>                        |                  | Folhas | Aquoso<br>Etanólico<br>Hexânico         | FaDu (-), SCC-25 (-), SCC-9 (-),<br>FaDu (-), SCC-25 (-), SCC-9 (-),<br>FaDu (+), SCC-25 (-), SCC-9 (-), |
| <b><i>Pouteria ramiflora</i><sup>(27,28)</sup></b>  |                  | Folhas | Aquoso<br>Etanólico<br>Hexânico         | FaDu (+), SCC-25 (-), SCC-9 (-),<br>FaDu (+), SCC-25 (-), SCC-9 (-),<br>FaDu (-), SCC-25 (-), SCC-9 (-), |
|                                                     | 'Fruta-de-veado' |        |                                         | SCC-25, SCC-9 (língua)/<br>FaDu (hipofaringe)                                                            |
| <b><i>Erythroxylum Suberosum</i><sup>(29)</sup></b> |                  | Folhas | Aquoso<br><br>Etanólico<br><br>Hexânico | SCC-9 (oral) (+)<br>FaDu (hipofaringe) (+)<br><br>SCC-9 (-), FaDu (+)<br><br>SCC-9 (-), FaDu (-)         |

|                                            |                 |                 |                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Ixora brevifolia</i> <sup>(30)</sup>    | 'Ixora-arborea' | Galhos          | Extrato bruto e hidrometanólico, hexânico                                    | U251 (glioma) (+)<br>K562 (leucemia) (+)                                                                                                                                                                                             |
| <i>Kielmeyera coriacea</i> <sup>(31)</sup> | 'Pau-santo'     | Frutas e Folhas | Óleo essencial                                                               | MDA-MB-231(mama) (+)<br>DU-145 (próstata) (+)<br><br>MDA-MB-231 (-)<br>DU-145 (-)                                                                                                                                                    |
| <i>Kielmeyera coriacea</i> <sup>(32)</sup> | 'Pau-santo'     | Casca da raiz   | Hexânico                                                                     | HL-60 (leucemia) (+)<br>HCT-8 (côlon) (+)<br>MDA-MB-435 (mama) (+)<br>SF-295 (glioblastoma) (+)                                                                                                                                      |
| <i>Kielmeyera coriacea</i> <sup>(33)</sup> | Não informado   | Folhas          | Clorofórmio<br><br>Hidroalcoólico<br>Acetato de etila<br>Hexânico<br>Heptano | B16F10-Nex2 (melanoma murino) (+)<br>HCT (côlon) (+), Siha (cervical) (+)<br>A2058 (melanoma) (+), SKmel28 (melanoma) (+) and<br>MeWO (melanoma) (+)<br><br>B16F10-Nex2 (-)<br>B16F10-Nex2 (-)<br>B16F10-Nex2 (-)<br>B16F10-Nex2 (-) |

44 **Artigos**

|                                                                 |                                |                |                              |                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Lafoensia pacari</i></b> <sup>(34)</sup>                  | ‘Dedaleira’<br>‘Mangava-brava’ | Casca do caule | Metanólico                   | TRH- 18 (+)<br>(colorectal)                                                                                                                           |
| <b><i>Lafoensia pacari</i></b> <sup>(35)</sup>                  | ‘Dedaleira’<br>‘Mangava-brava’ | Casca do caule | Etanólico                    | H460 Human NSCLC (pulmão) (+)<br>A549 (NSCLC, adenocarcinoma) (+)<br>H2023 (NSCLC, adenocarcinoma) (+)<br>E9 murina (pulmão) (+)                      |
| <b><i>Lafoensia pacari</i></b> <sup>(36)</sup>                  | ‘Dedaleira’<br>‘Mangava-brava’ | Casca do caule | Metanólico<br>e frações      | U-937 (+), Jurkat<br>Daudi (leucemia) (+)                                                                                                             |
| <b><i>Lippia salviaefolia</i></b> <sup>(37)</sup>               | Não informado                  | Partes aéreas  | aromadendrin<br>‘phloretin’  | HEK-293(rim) (-)<br>M14 (melanoma) (+)<br>HEK-293 (+)                                                                                                 |
| <b>*<i>Lychnophora trichocarpha</i> Spreng.</b> <sup>(38)</sup> | ‘Arnica<br>brasileira’         | Partes aéreas  | Etanólico<br>‘lychnopholide’ | * 30 linhagens de células tumorais humanas                                                                                                            |
| <b><i>Maytenus ilicifolia</i></b> <sup>(39)</sup>               | ‘Espinheira santa’             | Casca da raiz  | Etanólico                    | HL-60 (Leucemia) (+)<br>K-562 (leucemia mielocítica crônica) (+),<br>SF-295 (glicoblastoma) (+),<br>HCT- 8 (cólon) (+)<br>MDA / MB-435 (melanoma) (+) |

|                                                       |                              |        |                                         |                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------|------------------------------|--------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Mimosa caesalpiniiifolia</i><sup>(40)</sup></b> | ‘Sabiá’<br>‘Sansão-do-campo’ | Folhas | Etanólico                               | MCF-7 (mama) (+)                                                                                                              |
| <b><i>Myrcia bella</i><sup>(41)</sup></b>             | ‘Mercurinho’                 | Folhas | Hidroalcoólico                          | ACP02 (gástrico) (+)                                                                                                          |
| <b><i>Myrcia guianensis</i></b>                       | Não informado                | Folhas | Hidroetanólico                          | K562 (leucemia) (+), MCF-7 (mama) (+),<br>786-0 (renal) (-), NCI-H460 (pulmão) (-),<br>PC-3 (próstata) (-), HT-29 (cólon) (-) |
| <b><i>Myrcia bella</i></b>                            | ‘Jacarezinho’                | Folhas |                                         | K562 (+), MCF-7 (+),<br>786-0 (-), NCI-H460 (-)<br>PC-3 (-), HT-29 (-)                                                        |
| <b><i>Myrcia falax</i><sup>(42,28)</sup></b>          | Não informado                | Folhas |                                         | K562 (+), MCF-7 (-),<br>786-0 (-), NCI-H460 (-)<br>PC-3 (-), HT-29 (-)                                                        |
| <b><i>Palicourea rígida</i><sup>(43)</sup></b>        | ‘Douradão’                   | Folhas | Extrato etanólico<br>(composto isolado) | SK-MEL-37 (melanoma) (+)                                                                                                      |
|                                                       |                              |        | Hexânico                                | OSCC-3 (oral) (+)<br>MCF-7 (mama) (+)                                                                                         |

46 **Artigos**

|                                                   |                                                                                       |                 |                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Pouteria torta</i></b> <sup>(44,45)</sup>   | ‘Guapeva’                                                                             | Folhas          | Etanólico<br><br>Aquoso                                                                                                                                                                                             | OSCC-3 (+)<br>MCF-7 (+)<br><br>OSCC-3 (+)<br>MCF-7 (+)                                                                                                                                                                                |
| <b><i>Psidium guineense</i></b> <sup>(46)</sup>   | ‘Goiabinha-araçá’,<br>‘Araçá-do-campo’,<br>‘Araçá verdadeiro’<br>‘Goiabinha selvagem’ | Folhas          | Óleo essencial                                                                                                                                                                                                      | OVCAR-3 (ovário) (+)<br>U251 (glioma) (+), MCF-7 (mama) (+)<br>NCI-ADR/RES (ovário) (+), 786-0 (renal) (+)<br>NCI-H460 (pulmão) (+), PCO-3 (próstata) (+)<br>HT-29 (cólon) (+), K-562 (leucemia) (+)                                  |
| <b><i>Pyrostegia venusta</i></b> <sup>(47)</sup>  | ‘St. John vine’                                                                       | Flores          | Heptano<br><br>Hidroalcoólico                                                                                                                                                                                       | B16F10-Nex2 (melanoma murino) (+)<br><br>B16F10-Nex2 (-)                                                                                                                                                                              |
| <b><i>Salacia crassifolia</i></b> <sup>(48)</sup> | ‘Bacupari-do-Cerrado’,<br>‘Saputá’, ‘Seputá’                                          | Cascas do caule | Hexânico<br>Diclorometânica<br>Acetato de etila<br>Hidroalcoólico<br><br>Hexânico<br>Diclorometânica<br>Acetato de etila<br>Hidroalcoólico<br><br>Hexânico<br>Diclorometânica<br>Acetato de etila<br>Hidroalcoólico | MDA-MB-435 (melanoma) (+)<br>MDA-MB-435 (-)<br>MDA-MB-435 (-)<br>MDA-MB-435 (-)<br><br>HCT-8 (cólon) (+)<br>HCT-8 (-)<br>HCT-8 (+)<br>HCT-8 (-)<br><br>SF-295 (sistema nervoso central) (+)<br>SF-295 (-)<br>SF-295 (-)<br>SF-295 (-) |

|                                                           |                                                      |                 |                                                            |                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Salacia crassifolia</i></b> <sup>(49)</sup>         | ‘Bacupari-do-Cerrado’                                | Madeira da raiz | Hexânico                                                   | Colo205 e KM12 (cólon) (+)<br>A498 e U031 (renal) (+)<br>HEP3B and SKHEP (fígado) (-)<br>MG63 and MG63.3 (osteosarcoma) (+)                                                   |
| <b><i>Senna velutina</i></b> <sup>(28,50)</sup>           | ‘Fedegoso’                                           | Folhas          | Etanólico                                                  | Jurkat (+) e K562 (+)<br>(Leucemia)                                                                                                                                           |
| <b><i>Solanum lycocarpum</i></b> <sup>(51)</sup>          | ‘Fruit-of-wolf’<br>‘Lobeira” or “Jurubebão’          | Fruta           | Glicoalcalóide                                             | HepG2 (fígado) (+)<br>B16F10 (melanoma murino) (+)<br>HT29 (cólon), MCF-7 (mama) (+)<br>HeLa (cervical) (+), HepG2 (fígado) (+)<br>MO59J, U343 e U251 (glioblastoma) (+)      |
| <b><i>*Sloanea garckeana</i></b> <sup>(45,52)</sup>       | ‘Urucurana Brava’                                    | Folhas          | Metanólico,<br>Hexânico<br>Clorofórmio<br>Acetato de etila | UACC-62 (melanoma) (+), NCI-460 (pulmão)<br>(+),<br>MCF-7(mama) (+), NCI-ADR (mama) (+),<br>HT-29 (cólon) (+), OVCAR (ovário) (+),<br>C786-0 (rim) (+) e PCO-3 (próstata) (+) |
| <b><i>Stryphnodendron Adstringens</i></b> <sup>(53)</sup> | ‘Barbatimão’ or<br>‘Casca-da-mocidade’               | Casca do caule  | Aquoso                                                     | B16F10Nex-2 (melanoma) (+)                                                                                                                                                    |
| <b><i>Terminalia fagifolia</i></b> <sup>(54)</sup>        | ‘Capitão-do-mato’,<br>‘Mirindiba’,<br>‘Pau-de-bicho’ | Casca e folhas  | Etanólico                                                  | PC3 (próstata) (+)<br>B16F10 (melanoma murino) (+)                                                                                                                            |

|                                                    |                                                                          |                |                        |                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Terminalia fagifolia</i></b> <sup>(55)</sup> | 'Capitão',<br>'Capitão –do-cerrado'<br>'Capitão-do-campo'<br>'Mirindiba' | Casca do caule | Etanólico<br>e frações | MCF-7 (mama) (+)                                                                                                                                         |
| <b><i>Zornia brasiliensis</i></b> <sup>(56)</sup>  | 'Urinária',<br>'Urinana'<br>'Carrapicho'                                 | Partes aéreas  | Etanólico              | HL60 (leucemia promielocítica) (+)<br>MCF-7 (mama) (-)<br>HCC1954 (mama) (-)<br>T-47D (mama) (-)<br>4T1 (mama) (-)<br>HL60 (leucemia promielocítica) (-) |

**SINAL (+) = efeito na células tumoral / ( - ) efeito nulo ou muito baixo.**

\*COMPOSTO ISOLADO - *lychnopholide* e *eremantholide C*

\* ***Lychnopholide*** - Inibição total do crescimento de 30 linhagens de células tumorais humanas derivadas de oito tipos de câncer, mostrando ser inativo apenas contra o câncer de próstata e do sistema nervoso central. *Lychnopholide* mostrou atividade significativa contra todas as linhas de células de tumor humano de leucemia e pulmão (HOP-92), cólon (COLO 205, HCT-116, HCT-15, KM-12, SW-620), melanoma (LOX-IMVI, SK-MEL-5, UACC-62), ovários (IGROV1, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8), renais (786-0, ACHN, CAKI-1, RXF-393, TK-10, UO-31) e mama (MCF7, MDA-MB-231 / ATCC, MDA-MB-435, MDA-N, BT-549,)

***Eremantholide C*** - inibiu o crescimento total de 30 linhas de células tumorais humanas e foi inativo apenas contra o câncer de próstata. O composto mostrou atividade significativa contra todas as linhagens de leucemia e cólon, pulmão (HOP-92), SNC (U-251), melanoma (LOX-IMVI, M14, SK-MEL-2, SK-MEL-5, UACC-62), ovários (OVCAR-3, OVCAR-5), renais (786-0, RXF-393, SN12-C, TK-10) e mamários (MDA-MB-231 / ATCC, MDA-N, BT -549, T-47D).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Um total de trinta e nove espécies de plantas medicinais provenientes do bioma Cerrado brasileiro que apresentam propriedades antitumorais foram identificadas. As espécies estão distribuídas entre 33 gêneros e 20 famílias. As famílias incluem: Combretaceae (*Terminalia fagifolia*), Annonaceae (*Annona coriácea*, *Annona crassiflora*, *Cardiopetalum calophyllum*), Celastraceae (*Austroplenckia populnea*, *Salacia crassifolia*, *Maytenus ilicifolia*), Verbenaceae (*Lippia salviaefolia*), Solanaceae (*Solanum lycocarpum*), Myrtaceae (*Myrcia falax*, *Myrcia bella*, *Campomanesia adamantium*, *Myrcia guianensis*, *Psidium guineense*), Rubiaceae (*Palicourea rígida*, *Ixora brevifolia*), Bignoniaceae (*Pyrostegia venusta*, *Tabebuia avellaneda*), Erythroxylaceae (*Erythroxylum suberosum*, *Erythroxylum daphnites*, *E. subrotundum*), Sapotaceae (*Pouteria torta*, *Pouteria ramiflora*), Asteraceae (*Calea pinnatifida*, *Chresta sphaerocephala*, *Eremanthus matogrossensis*, *Eremanthus seidelii*, *Lychnophora trichocarpha*), Elaeocarpaceae (*Sloanea garckeana*), Apocynaceae (*Calotropis procera*), Anacardiaceae (*Anacardium humile*), Calophyllaceae (*Kielmeyera coriacea*), Lythraceae (*Lafoensia pacari*), Mimosaceae (*Mimosa caesalpiniiifolia*), Burseraceae (*Protium ovatum*), Fabaceae (*Senna velutina*, *Dipteryx alata* Vog, *Stryphnodendron adstringens*, *Zornia brasiliensis*) e Moraceae (*Brosimum gaudichaudii*). A maioria das pesquisas utilizou as folhas para a realização dos ensaios, sendo o uso destas como fontes de compostos ativos uma estratégia relevante para o manejo sustentável de espécies endêmicas, visto que não compromete a sobrevivência das espécies <sup>(57)</sup>. Além das folhas, também foram utilizados caule, casca do tronco, casca da raiz, flores, frutos, sementes, óleo essencial e compostos isolados. Deve-se aqui considerar que

---

diferentes partes da mesma planta podem sintetizar e acumular diferentes metabólitos secundários ou quantidades diferentes de certo composto <sup>(58)</sup>.

Os principais compostos responsáveis pelo potencial antitumoral e por outras várias atividades farmacológicas como, por exemplo, efeitos antimicrobianos, antioxidantes, anti-inflamatórios, contra doenças intestinais e respiratórias, incluem: esteróides glicosídeos cardiotônicos (*C. procera*), compostos fenólicos e taninos (*A. humile*), alcalóides (*S. lycocarpum*), ácidos fenólicos (*A. coriacea*), flavonóides - quercetina (*A. crassiflora*), triterpenos (*M. ilicifolia*, *P. torta*, *C. sphaerocephala*), sesquiterpenos – germacranolidos - (*C. pinnatifida*), flavonóides (*E. suberosum*, *A. populnea*, *A. coriacea*, *T. avellanadae*, *L. salviaefolia*, *C. procera* ; *E. suberosum*; *M. caesalpiniifolia*, *M. bella*, *M. falax*, *S. velutina*; *E. subrotundum*, *P. ramiflora*), espatulenol, germacreno-B e óxido de  $\beta$ -cariofileno (folhas *C. adamantium*); espatulenol,  $\beta$ -cariofileno, e  $\beta$ -mirceno (folhas *P. ovatum*);  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -pineno e limoneno (frutos verdes *P. ovatum*), espatulenol, viridiflorol, e (Z,E)-pharnesol (folhas *C. calophyllum*), ácido oleico e compostos fenólicos - ácido gálico (*D. alata* Vog., *S. adstringens*), lactonas sesquiterpênicas (*L. trichocarpha*, *E. matogressensis*; *E. seidelii*), triterpenos (*E. daphnites*), catequinas (*E. suberosum*), lignana siringaresinol e alcalóides ciclopeptídicos (*I. brevifolia*), D-germacreno, neo-intermedeol, biciclogermacreno, Viridiflorol, Globulol, Epi- $\alpha$ -muurolol e  $\delta$ -cadineno (*K. coriacea*),  $\delta$ -tocotrienol e seu dímero (*K. coriacea*), 1-eicosanol, 1-docosanol, e 2-nonadecano (*K. coriacea*), ácido elágico e outros (*L. pacari*), isômeros de galoil glicose (*M. guianensis*), alcalóide indol monoterpene (*P. rigida*), álcool sesquiterpênico espatulenol (*P. guineense*), alceno (*P. venusta*), triterpenos quinonametídios (*S. crassifolia*), compostos fenólicos (*S. garckeana*, *S. adstringens*; *T. fagifolia*; *Z. brasilienses*), polifenóis (*S. adstringens*), zorniosídeo (*Z. brasilienses*).

---

De todos os compostos com propriedades antitumorais apresentados acima os flavonóides são os que aparecem com maior frequência. A ação anticancerígena dos flavonóides se dá por meio do efeito sobre o sequestro de radicais livres, reparação do DNA e estimulação do sistema imunológico<sup>(8)</sup>. A tabela 2 (anexo) apresenta o componente majoritário das espécies e o provável modo de ação na inibição das células tumorais. Ressalta-se que os extratos vegetais possuem milhares de compostos ativos; aqui reunimos apenas alguns dos compostos que foram identificados nas pesquisas.

As linhagens celulares cancerígenas usadas nas pesquisas incluem células de mama, cérebro, cólon, pulmão, sangue, pele, fígado, rim, próstata, ovário, boca, laringe e estômago, sendo a maioria de origem humana. Segundo Caneschi et al (2015), conforme citado por Liu, Haroun-Bouhedja & Boisson-Vidal (2000)<sup>(59)</sup>, alguns tipos celulares como, por exemplo, pulmão e mama, são mais utilizados por serem amplamente estudados na pesquisa envolvendo análise citotóxica e porque podem ser facilmente usados para comparação com diferentes compostos. Com relação à natureza do estudo, as pesquisas utilizaram ensaios in vitro, mais especificamente, a cultura de células. Este é um substituto aceito para modelos animais, pois sua aplicação reduz o número de experiências com os mesmos, o que é uma característica relevante desse método<sup>(60)</sup>.

Com relação ao tipo de extrato, podemos verificar que foram utilizados extratos etanólico, metanólico, fenólico, hexânico, aquoso, clorofórmico, hidroalcoólico, hidroetanólico, heptanólico, glicoalcalóide, acetato de etila e acetona, o que depende do solvente utilizado para o preparo do extrato. Dependendo do solvente, obtêm-se maior ou menor rendimento extrativo. Os diferentes solventes apresentam diferenças na polaridade e, conseqüentemente, na classe de compostos

---

extraída do extrato; os extratos etanólico e aquoso, por exemplo, que são os mais polares, são ricos em polifenóis<sup>(29)</sup>. A tabela 1 mostra o tipo de extrato e outros dados que foram discutidos nesta revisão, que incluem: espécie, nome popular, parte usada da planta e célula alvo. Na frente de cada linhagem celular foi colocado um sinal positivo ou negativo; o sinal (+) significa que o extrato inibiu a célula tumoral (independente do método) e sinal ( - ) significa efeito nulo ou muito baixo. Diferenças são vistas de acordo com o solvente utilizado e esse fato se deve aos compostos que são extraídos de acordo com o solvente, como também já foi discutido anteriormente.

Diante dos dados, concluímos que o bioma brasileiro Cerrado possui uma ampla variedade de espécies com propriedades antitumorais. Pesquisas mais detalhadas são necessárias para que seja feito o isolamento dos metabólitos secundários bioativos com propriedades citotóxicas. A avaliação da estrutura química desses compostos é capaz de possibilitar avaliações biológicas mais extensas<sup>(14)</sup>. Estudos adicionais com os extratos fracionados e compostos isolados também devem ser realizados para determinar o potencial terapêutico antitumoral completo dessas plantas e, ainda, como estudos futuros, ensaios *in vivo*<sup>(18,55)</sup>. Ademais, faz-se necessário realizar mais estudos para que se descubram outras espécies do Cerrado com potencial antitumoral.

---

## ANEXO

TABELA 2. Espécie, composto majoritário e provável modo de ação.

| ESPÉCIE                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | COMPOSTO E MODO DE AÇÃO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Referências                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Anacardium humile</i></li> <li>- <i>Tabebuia avellanedae</i></li> <li>- <i>Sloanea garckeana</i></li> <li>- <i>Terminalia fagifolia</i></li> <li>- <i>Zornia brasiliensis</i></li> <li>- <i>Myrcia falax</i></li> <li>- <i>Erythroxylum suberosum</i></li> </ul> | <p><b>Compostos fenólicos</b> - sequestro de radicais livres (<i>A. humile</i>). (<i>T. fagifolia</i>)</p> <p><b>Flavonóides</b> - sequestro de radicais livres, prevenção da progressão do câncer, reparo de DNA e estimulação do sistema imunológico e sua capacidade de efetuar a via que regula o crescimento e a proliferação de células e a formação de tumor (<i>T. avellanedae</i>)</p> | <p>ARAÚJO et al, 2015<br/>PEREIRA et al, 2009<br/>ROMERO et al, 2008<br/>NASCIMENTO et al, 2018</p>                                                                     |
| <i>Annona coriacea</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Ácidos fenólicos</b> (ácido ferúlico e sinápico) - inibem a formação de compostos N-nitrosos                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | LI et al, 2012                                                                                                                                                          |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Annona crassiflora</i></li> <li>- <i>Austroplenckia populnea</i></li> <li>- <i>Lippia salviaefolia</i></li> <li>- <i>Myrcia bella</i></li> <li>- <i>Senna velutina</i></li> <li>- <i>Brosimum gaudichaudii</i></li> </ul>                                        | <b>Flavonóides</b> – antioxidante; sequestro de radicais livres, reparação do DNA e estimulação do sistema imunológico                                                                                                                                                                                                                                                                          | <p>PRADO et al, 2020<br/>CANESCHI et al, 2015<br/>ARAÚJO et al, 2015<br/>FUNARI et al, 2011<br/>SERPELONI et al, 2015<br/>CAMPOS et al, 2016<br/>ARAÚJO et al, 2015</p> |
| <i>Calea pinnatifida</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>Sesquiterpenos</b> (germacranolidos) - potentes indutores de apoptose, inibidores de NF-κB                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | MARCHETTI et al, 2012                                                                                                                                                   |
| <i>Calotropis procera</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>Esteróides glicosídeos cardiotônicos</b> - ativação de vias apoptóticas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | MAGALHÃES et al, 2010                                                                                                                                                   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Campomanesia adamantium</i></li> <li>- <i>Protium ovatum</i></li> <li>- <i>Cardiopetalum calophyllum</i></li> </ul>                                                                                                                                              | <b>Sesquiterpenos</b> - capacidade de ativar a apoptose, de interromper o ciclo celular ou de inibir marcadores proangiogênicos, invasivos e proliferativos                                                                                                                                                                                                                                     | AMBROŽ et al, 2019                                                                                                                                                      |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Chresta sphaerocephala</i></li> <li>- <i>Erythroxylum daphnites</i></li> <li>- <i>Erythroxylum subrotundum</i></li> <li>- <i>Pouteria torta</i></li> <li>- <i>Pouteria ramiflora</i></li> <li>- <i>Salacia crassifolia</i></li> </ul>                            | <b>Triterpenos</b> - inibem o crescimento tumoral, a progressão do ciclo celular e induzem a apoptose de células tumorais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>                                                                                                                                                                                                                                      | <p>SALEEM, 2009;<br/>ELIAS et al, 2016<br/>ELIAS et al, 2013<br/>DE OLIVEIRA et al, 2012</p>                                                                            |

|                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Dipteryx alata</i></p> <p><i>Myrcia spp</i></p>                       | <p><b>Compostos fenólicos –</b><br/> <b>Ácido gálico (GA)</b> - regulação de diversas vias de sinalização; inibe proliferação<br/> <b>Galotaninos (GT)</b> - supressão da ativação de NF-κB induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF-α)<br/> - Antioxidantes</p> | <p>FARIED et al, 2007<br/> AI-HALABI et al, 2011<br/> SANTOS et al, 2018<br/> RODRIGUES et al, 2017</p> |
| <p><i>Eremanthus matogressensis</i></p> <p><i>Eremanthus seidelii</i></p>   | <p><b>Lactonas sesquiterpênicas (goyazensolide e lychnofolide) –</b><br/> possível interferência na angiogênese internamente e na remodelação do microambiente tumoral externamente pela capacidade de degradar proteoglicanos</p>                                  | <p>IZUMI et al, 2020</p>                                                                                |
| <p><i>Erythroxylum suberosum</i></p> <p><i>Mimosa caesalpiniiifolia</i></p> | <p><b>Catequinas</b> - antioxidante</p>                                                                                                                                                                                                                             | <p>ELIAS et al, 2015<br/> SILVA et al, 2014</p>                                                         |
| <p><i>Kielmeyera coriacea</i></p>                                           | <p><b>Sesquiterpenos do tipo elemeno</b> - inibidores de proliferação celular, estimulantes de apoptose e indutores de paragem do ciclo celular na célula maligna</p>                                                                                               | <p>LEMES et al, 2017</p>                                                                                |
| <p><i>Kielmeyera coriacea</i></p>                                           | <p><b>δ-tocotrienol e dímero</b> – interrupção da progressão do ciclo celular/ indução de apoptose celular</p>                                                                                                                                                      | <p>MESQUITA et al, 2011</p>                                                                             |
| <p><i>Lafoensia pacari</i></p>                                              | <p><b>Ellagitanninos</b> - efeitos apoptogênicos<br/> <b>Ácido elágico</b> - a regulação dos níveis de ciclina E (regulação positiva), A e B1 (regulação negativa), retendo as células na fase G1 / S do ciclo celular</p>                                          | <p>REICHERT et al, 2018</p>                                                                             |
| <p><i>Lychnophora trichocarpha</i></p>                                      | <p><b>Lactonas sesquiterpênicas</b> - inibição de enzimas envolvidas em processos biológicos essenciais como síntese de DNA e RNA, síntese de proteínas e purinas, glicólise, ciclo do ácido cítrico e a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.</p>         | <p>SAÚDE-GUIMARÃES et al, 2014</p>                                                                      |
| <p><i>Maytenus ilicifolia</i></p>                                           | <p><b>Pristimerina (triterpenóide)</b> - inibir a síntese de DNA e desencadear a apoptose</p>                                                                                                                                                                       | <p>COSTA et al, 2008</p>                                                                                |
| <p><i>Palicourea rigida</i></p>                                             | <p><b>Alcalóide indólico monoterpênico denominado vallesiachotamina</b> – promove a parada do ciclo celular G0 / G1, apoptose e necrose.</p>                                                                                                                        | <p>SOARES et al, 2012</p>                                                                               |
| <p><i>Psidium guineense</i></p>                                             | <p><b>Álcool sesquiterpênico</b> - induzir apoptose</p>                                                                                                                                                                                                             | <p>NASCIMENTO et al, 2018</p>                                                                           |
| <p><i>Pyrostegia venusta</i></p>                                            | <p><b>Alcanos</b> - indução da parada do ciclo celular e apoptose</p>                                                                                                                                                                                               | <p>FIGUEIREDO et al, 2014</p>                                                                           |

|                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                           |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b><i>Senna velutina</i></b>                                       | <b>Flavonóides (epigallocatequina, epicatequina, kaempferol heterosídeo, rutina) e derivados diméricos e triméricos de proantocianidina</b> - induziu a morte celular leucêmica ao ativar o cálcio intracelular e a caspase-3, diminuindo o potencial da membrana mitocondrial e interrompendo o ciclo celular nas fases S e G2.                                                                                                                                                                         | CAMPOS et al, 2016                        |
| <b><i>Solanum lycocarpum</i></b><br><b><i>Ixora brevifolia</i></b> | <b>Alcalóides</b> – alterações na morfologia celular e DNA – apoptose irreversível, regulação de caspases, regulação da expressão de receptores de morte (Exemplo: Receptor I do fator de necrose tumoral (TNFR-I))                                                                                                                                                                                                                                                                                      | MUNARI et al, 2014<br>MEDINA. et al, 2018 |
| <b><i>Stryphnodendron adstringens</i></b>                          | COMPOSTOS FENÓLICOS E POLIFENÓIS<br><b>Ácido gálico, galocatequina, epigallocatequina, proantocianidinas diméricas e triméricas</b> - atividade antioxidante por meio da eliminação direta de radicais livres, hemólise oxidativa e inibição da peroxidação lipídica em eritrócitos humanos, morte celular induzida por apoptose por meio do aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs), indução da disfunção do potencial da membrana mitocondrial e ativação da caspase-3 | BALDIVIA et al, 2018                      |

## REFERÊNCIAS

1. Ahmad R, Ahmad N, Naqvi AA, Shehzad A, Al-Ghamdi MS. Role of traditional Islamic and Arabic plants in cancer therapy. *J Tradit Complement Med*. 2016;7(2):195-204.
  2. Orang-Ojong BB, Munyangaju JE, Wei MS, Lin M, Wei FG, Foukunang C, Zhu Y. Impact of natural resources and research on cancer treatment and prevention: A perspective from Cameroon. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(4):610-620.
  3. Zhang YS, Duchamp M, Oklu R, Ellisen LW, Langer R, Khademhosseini A. Bioprinting the Cancer Microenvironment. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016;2(10):1710-1721.
  4. Torquato HFV, Goettert MI, Justo GZ, Paredes-Gamero EJ. Anti-Cancer Phytometabolites Targeting Cancer Stem Cells. *Curr Genomics*. 2017;18(2):156-174.
  5. Yu Z, Zhang T, Zhou F, Xiao X, Ding X, He H. et al. Anticancer Activity of Saponins from *Allium chinense* against the B16 Melanoma and 4T1 Breast Carcinoma Cell. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015.
  6. Mangal M, Sagar P, Singh H, Raghava GP, Agarwal SM. NPACT: Naturally Occurring Plant-based Anti-cancer Compound-Activity-Target database. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D1124-9.
  7. Ji S, Orlikova B, Diederich M. Non-edible plants as an attractive source of compounds with chemopreventive potential. *J Cancer Prev*. 2014;19(1):1-6.
  8. de Araujo AR, Quelemes PV, Perfeito ML, et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14:25.
-

9. Ministério do Meio Ambiente. O Bioma Cerrado. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em: 27 de maio de 2021.
  10. Correia AF, Silveira D, Fonseca-Bazzo YM, Magalhães PO, Fagg CW, da Silva EC, et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:203.
  11. Júnior JTC, de Moraes SM, Gomez CV, Molas CC, Rolon M, Boligon AA, et al. Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast “Cerrado”. *Saudi J Biol Sci*. 2016;23(3):434-440.
  12. Albernaz LC, Paula JED, Romero GAS, Silva MDRR, Grellier P, Mambu L, et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. *J Ethnopharmacol*. 2010;131(1):116-21.
  13. Costa LSD, Andreazza NL, Correa WL, Cunha IBDS, Ruiz ALTG, Carvalho JED, et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and chemical composition of extracts from the leaves and stem of *Chresta sphaerocephala*. *Rev. bras. farmacogn*. 2015;25(4):369-374.
  14. de Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2009;123(3):439-45.
  15. dos Santos Júnior HM, Oliveira DF, de Carvalho DA, Pinto JM, Campos VA, Mourão AR, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *J Nat Med*. 2010;64(2):231-8.
  16. Mohammadi-Motlagh HR, Shokohinia Y, Mojarreb M, Rasouli H, Mostafaie A. 2-Methylpyridine-1-ium-1-sulfonate from *Allium hirtifolium*: An anti-angiogenic
-

- compound which inhibits growth of MCF-7 and MDA-MB-231 cells through cell cycle arrest and apoptosis induction. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:117-129.
17. Araújo TADS, Sobrinho TJDSP, Aguiar JDS, Silva ACOD, Brito FU, Silva GD. Et al. Phytochemical, antioxidant and cytotoxic analysis of Brazilian cerrado plants: Preliminary evidence of their antitumor activity. *J. Med. Plants Res.* 2015;9(9): 310-319.
18. Formagio ASN, Vieira MC, Volobuff CRF, Silva MS, Matos AI, Cardoso CAL, et al. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(4) p.308-315.
19. Prado LG, Arruda HS, Araujo NMP, Braga LEDO, Banzato TP, Pereira GA, et al. Antioxidant, antiproliferative and healing properties of araticum (*Annon crassiflora* Mart.) peel and seed. *Food Res. Int.* 2020:133.
20. Caneschi CM, Muniyappa MK, Duarte LP, Silva GD, Dos Santos OD, Spillane C, Filho SA. Effect of constituents from samaras of *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) on human cancer cells. *J Intercult Ethnopharmacol.* 2015;4(1):6-11.
21. Marchetti GM, Silva KA, Santos AN, et al. The anticancer activity of dichloromethane crude extract obtained from *Calea pinnatifida*. *J Exp Pharmacol.* 2012;4:157-162.
22. Magalhães HI, Ferreira PM, Moura ES, Torres MR, Alves AP, Pessoa OD, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Pessoa C. In vitro and in vivo antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. *An Acad Bras Cienc.* 2010;82(2):407-16.
-

23. Alves CCF, Oliveira JD, Estevam EBB, Xavier MN, Nicolella HD, Furtado RA, et al. Atividade antiproliferativa dos óleos essenciais de três plantas do Cerrado brasileiro: *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), *Protium ovatum* (Burseraceae) e *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae). 2020;80(2): 290-294.
  24. Oliveira-Alves SC, Pereira RS, Pereira AB, Ferreira A, Mecha E, Silva AB, et al. Identification of functional compounds in baru (*Dipteryx alata* Vog.) nuts: Nutritional value, volatile and phenolic composition, antioxidant activity and antiproliferative effect. *Food Res. Int.* 2020;131.
  25. Izumi C, Laure HJ, Barbosa NG, Thomé CH, Ferreira GA, Sousa JPB, Lopes NP, Rosa JC. Sequesterpene Lactones Isolated from a Brazilian Cerrado Plant (*Eremanthus* spp.) as Anti-Proliferative Compounds, Characterized by Functional and Proteomic Analysis, are Candidates for New Therapeutics in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13):4713.
  26. Elias ST, Macedo CC, Simeoni LA, Silveira D, Magalhães PO, Lofrano-Porto A, Coletta RD, Neves FA, Guerra EN. Cytotoxic effect of *Erythroxylum daphnites* extract is associated with G1 cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Cell Cycle.* 2016;15(7):948-56.
  27. Elias ST, Borges GA, Amorim DA, Rêgo DF, Simeoni LA, Silveira D, et al. Radiation induced a supra-additive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. *Clin Oral Investig.* 2015;19(3):637-46.
  28. Loverde-oliveira SM, Freitas MN, Araújo PKB, Costa IBC. Fragmento de Cerrado urbano da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Rondonópolis, Mato Grosso. *Revista Biodiversidade.* 2010;9(1).
-

29. Macedo TBC, Elias ST, Torres HM, Yamamoto-Silva FP, Silveira D, Magalhães PO, et al. Cytotoxic Effect of Erythroxylum suberosum Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines. Braz. Dent. J. 2016;27(1): 108-112.
  30. Medina RP, de Moura VM, da Silva CC, de Oliveira CMA, Kato L, Pomini AM, et al. Anti-inflammatory and antiproliferative activities of *Ixora brevifolia* Benth. (Rubiaceae). Nat Prod Res. 2018;32(11):1357-1360.
  31. Lemes RS, Costa GCS, Silva DCS, Becceneri AB, Bicalho KU, Miranda MLD, et al. Óleos Essenciais dos Frutos e Folhas de *Kielmeyera coriacea*: Atividade Antitumoral e Estudo Químico. Rev. Virtual Quim. 2017;9(3):1245-1257.
  32. de Mesquita ML, Araújo RM, Bezerra DP, Filho RB, de Paula JE, Silveira ER, et al. Cytotoxicity of  $\delta$ -tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against cancer cell lines. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2011;19(1):623-630.
  33. Figueiredo CR, Matsuo AL, Massaoka MH, Girola N, Azevedo RA, Rabaça AN, et al. Antitumor Activity of *Kielmeyera Coriacea* Leaf Constituents in Experimental Melanoma, Tested in Vitro and in Vivo in Syngeneic Mice. Advanced Pharmaceutical Bulletin. Adv Pharm Bull. 2014;4(1):429-436.
  34. Reichert CL, Silva DB, Carollo CA, Weffort-Santos AM, Santos CAM. Metabolic profiling and correlation analysis for the determination of killer compounds of proliferating and clonogenic HRT-18 colon cancer cells from *Lafoensia pacari*. J Ethnopharmacol. 2018;224:541-552.
  35. Cordeiro YdeG, Rochetti AL, Souza VC, da Silva ER, Scatolini AM, Genovese MI, et al. Antineoplastic Effect of Procyanidin-rich Extract of *Lafoensia Pacari* in Lung Carcinoma Cells. Braz. arch. biol. technol. 2019;62(7).
-

36. da Silva Marcondes DB, Reichert CL, de Andrade LF, de Moraes Santos CA, Weffort-Santos AM. Cytotoxicity and apoptogenic effects of *Lafoensia pacari*. J Ethnopharmacol. 2014;157:243-50.
  37. Funari CS, Passalacqua TG, Rinaldo D, Napolitano A, Festa M, Capasso A, Piacente S, Pizza C, Young MC, Durigan G, Silva DH. Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanol extracts. Phytochemistry. 2011;72(16):2052-61.
  38. Saúde-Guimarães DA, Raslan DS, Oliveira AB. In Vitro Antitumor Activity of Sesquiterpene Lactones from *Lychnophora trichocarpha*. Rev. bras. plantas med. 2014;16(2):275-282.
  39. Costa PM, Ferreira PM, Bolzani Vda S, Furlan M, de Freitas Formenton Macedo Dos Santos VA, Corsino J, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Pessoa C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. Toxicol In Vitro. 2008;22(4):854-63.
  40. Silva MJD, Carvalho AJS, Rocha CQ, Vilegas W, Silva MA, Gouvêa CMCP. Ethanolic extract of *Mimosa caesalpiniiifolia* leaves: Chemical characterization and cytotoxic effect on human breast cancer MCF-7 cell line. S. Afr. J. Bot. 2014;93:64-69.
  41. Serpeloni JM, Specian AF, Ribeiro DL, Tuttis K, Vilegas W, Martínez-López W, Dokkedal AL, Saldanha LL, Cólus IM, Varanda EA. Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess. in normal and tumor gastric cells. J Ethnopharmacol. 2015; 24;176:345-55
-

42. Dos Santos C, Galaverna RS, Angolini CFF, Nunes VVA, de Almeida LFR, Ruiz ALTG, de Carvalho JE, Duarte RMT, Duarte MCT, Eberlin MN. Antioxidative, Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Phenolic Compounds from Three Myrcia Species. *Molecules*. 2018;23(5):986.
  43. Soares PRO, de Oliveira PL, de Oliveira CMA et al. In vitro antiproliferative effects of the indole alkaloid vallesiachotamine on human melanoma cells. *Arch. Pharm. Res.* 2012;35:565–571.
  44. Elias ST, Salles PM, de Paula JE, Simeoni LA, Silveira D, Guerra EN, Motoyama AB. Cytotoxic effect of Pouteria torta leaf extracts on human oral and breast carcinomas cell lines. *J Cancer Res Ther.* 2013;9(4):601-6.
  45. Sistema da Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR). Disponível em: < <https://specieslist.homologacao.sibbr.gov.br/>>. Acesso em 02 de Jun. de 2021.
  46. do Nascimento KF, Moreira FMF, Alencar Santos J, Kassuya CAL, Croda JHR, Cardoso CAL, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of Psidium guineense Sw. and spathulenol. *J Ethnopharmacol.* 2018;210:351-358.
  47. Figueiredo CR, Matsuo AL, Pereira FV, Rabaça AN, Farias CF, Girola N, et al. Pyrostegia venusta heptane extract containing saturated aliphatic hydrocarbons induces apoptosis on B16F10-Nex2 melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. *Pharmacogn Mag.* 2014;10(Suppl 2):S363-76.
  48. De Oliveira CR, Menezes ACS, de Moraes MO, Vieira LDM, Pereira AG, Lima RS, et al. Avaliação citotóxica em três linhagens de células tumorais das frações obtidas da casca do caule de Salacia crassifolia (MART. ex. Schult.) G. Dom. (Celastraceae). *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2012;41(2):133-142.
-

49. Espindola LS, Dusi RG, Demarque DP, Braz-Filho R, Yan P, Bokesch HR, et al. Cytotoxic Triterpenes from *Salacia crassifolia* and Metabolite Profiling of Celastraceae Species. *Molecules*. 2018;23(6):1494.
  50. Campos JF, de Castro DTH, Damião MJ, Torquato HFV, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, et al. The Chemical Profile of *Senna velutina* Leaves and Their Antioxidant and Cytotoxic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016.
  51. Munari CC, de Oliveira PF, Campos JC, Martins Sde P, Da Costa JC, Bastos JK, et al. Antiproliferative activity of *Solanum lycocarpum* alkaloidic extract and their constituents, solamargine and solasonine, in tumor cell lines. *J Nat Med*. 2014;68(1):236-41.
  52. Romero AL, Fontana A, da Silva CC, de Souza MC, de Carvalho JE, Faria EO, et al. Antiproliferative activity of *Sloanea garckeana* K. Schum. *Quím. Nova*. 2008; 31(6).
  53. Baldivia DDS, Leite DF, Castro DTH, Campos JF, dos Santos UP, Paredes-Gamero EJ, et al. Evaluation of In Vitro Antioxidant and Anticancer Properties of the Aqueous Extract from the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens*. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):2432.
  54. Rodrigues PSDM, Bertolin AO, Fucase TM, Galluzzi FM, Silva EC; Marumo Maria HB. Assessment of the cytotoxic activity of ethanol extracts from the bark and leaves of *Terminalia fagifolia* Mart. on normal and tumor cells. *J. Health Biol. Sci*. 2017;5(1):16-23.
  55. de Araujo AR, Quelemes PV, Perfeito ML, de Lima LI, Sá MC, Nunes PH, et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14:25.
-

56. Nascimento YM, Abreu LS, Lima RL, Silva ADS, Costa VCO, Melo JIM, et al. Zornioside, a dihydrochalcone C-glycoside, and other compounds from *Zornia brasiliensis*. *Rev. bras. farmacogn.* 2018;28(2).
  57. Seito LN, Ruiz AL, Vendramini-Costa D, Tinti SV, de Carvalho JE, Bastos JK, et al. Antiproliferative activity of three methoxylated flavonoids isolated from *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) leaves. *Phytother Res.* 2011;25(10):1447-50.
  58. Karabegovic IT, Stojicevic SS, Velickovic DT, Todorovic ZB, Nikolic NC, Lazic ML. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Ind Crops Prod.* 2014;54:142-148.
  59. Liu JM, Haroun-Bouhedja F, Boisson-Vidal C. Analysis of the in vitro inhibition of mammary adenocarcinoma cell adhesion by sulphated polysaccharides. *Anticancer Res.* 2000;20(5A):3265-71.
  60. Toropainen E, Ranta V-P, Talvitie A, Suhonen P, Urtti A. Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 200;142(12):2942-8.
-

## 3.2 ARTICLE 2

The article presented in this thesis was written according to the Journal of Ethnopharmacology instructions and guidelines for article submission.

Efeito antitumoral de vanilina e divanilina em células de osteossarcoma murino

Antitumor effect of vanillin and divanillin on murine osteosarcoma cells

Gabriela Silva Neubern de Oliveira<sup>a</sup>, Camila Giatti Furlaneto<sup>a</sup>, Cintia Kazuko Tokuhara<sup>a</sup>, Talita Mendes Oliveira Ventura<sup>a</sup>, Adriano de Souza Pessôa<sup>a</sup>, Vanessa Svizzera Fakhoury<sup>a</sup>, Ana Ligia Pagnan<sup>a</sup>, Kelly Karina Inacio<sup>a</sup>, Mariana Liessa Rovis Sanches<sup>a</sup>, Marília Afonso Rabelo Buzalaf<sup>a</sup>, Valdecir Farias Ximenes<sup>b</sup>, Rodrigo Cardoso de Oliveira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil.

\*Autor correspondente: Rodrigo Cardoso de Oliveira - rodrigocardoso@usp.br, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. R. Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, ZIPCODE:17012-901, Bauru, SP, Brazil. Phone: 55 14 32358247.

### **Contribuições dos autores:**

Design de estudo: Oliveira RC, Ximenes VF; Condução do estudo: Oliveira GSN, Furlaneto CG, Tokuhara CK, Ventura TMO, Pessoa ADS, Fakhoury VS, Pagnan AL, Inacio KK, Liessa MRSL; Coleta e análise de dados: Oliveira GSN, Tokuhara CK, Ventura TMO; Interpretação dos dados: Oliveira GSN, Oliveira RC, Buzalaf MAR, Ximenes VF; Rascunho do manuscrito: Oliveira GSN; Revisão do conteúdo do manuscrito: Buzalaf MAR, Oliveira RC, Ximenes VF. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

---

**Endereços de e-mail:** gabriela\_neubern@usp.br (Oliveira GSN), camila\_furlaneto@msn.com (Furlaneto CG), cintia.tokuhara@usp.br (Tokuhara CK), talitaventura@usp.br (Ventura TMO), adrianospessoa@usp.br (Pessoa ADS), vansfak@gmail.com (Fakhoury VS), ana.ligia.pa@gmail.com (Pagnan AL), kellyinacio@usp.br (Inacio KK), marianasanches@usp.br (Sanches MLRS), mbuzalaf@fob.usp.br (Buzalaf MAR), vfximenes@fc.unesp.br (Ximenes VF), rodrigocardoso@usp.br (Oliveira RC).

## **Resumo**

**Relevância etnofarmacológica:** A vanilina, um aldeído fenólico natural obtido da orquídea *Vanilla planifolia*, é um composto conhecido mundialmente que possui várias propriedades medicinais, inclusive contra o câncer. Foi relatado que seu dímero, chamado divanilina, tem efeitos mais fortes do que a vanilina contra as células tumorais. O uso de compostos naturais no tratamento do câncer tem se mostrado uma alternativa promissora e com excelentes resultados.

**Objetivo do estudo:** O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades antitumorais dos compostos vanilina e divanilina em células ósseas tumorais murinas.

**Materiais e métodos:** Foram preparadas para os testes concentrações de 300, 500 e 600µg/mL de vanilina e 150, 250 e 300µg/mL de divanilina. A ação dos compostos na viabilidade celular da linhagem celular normal, MC3T3-E1, e da linhagem celular tumoral, UMR-106, foi avaliada por ensaios de MTT e violeta de cristal. A ação dos compostos na formação de colônias, migração e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células tumorais também foram analisadas, além da análise proteômica.

**Resultados:** Ambos os compostos demonstraram exercer efeitos sobre a viabilidade celular das linhagens de células normais e tumorais. Para UMR-106, todas as concentrações de ambos os compostos mostraram reduzir a viabilidade celular em

---

menos de 50%. Os resultados também revelam que ambos os compostos inibiram significativamente a capacidade de formar colônias. O composto vanilina foi capaz de inibir o processo de migração e a divanilina diminuiu a produção de EROs, ambos significativamente. Quanto à análise proteômica, ambos os compostos mostraram atuar na expressão de proteínas importantes envolvidas na progressão tumoral.

**Conclusão:** Nossos resultados sugerem que os compostos vanilina e divanilina têm propriedades contra células tumorais ósseas murinas. O uso destes pode ser uma alternativa promissora para o tratamento adjuvante do câncer ósseo.

**Palavras-chave:** Osteossarcoma, vanilina, divanilina, compostos naturais

## 1. Introdução

O osteossarcoma (OS) é o câncer ósseo mais comum e afeta principalmente crianças e adolescentes. Apesar do tratamento, que inclui quimioterapia neoadjuvante, adjuvante e cirurgia, 30 a 40% dos pacientes morrem dentro de 5 anos do diagnóstico, desde que não tenham doença metastática (Wang et al., 2020; Liang et al., 2013). A metástase, que ocorre com facilidade por ser uma doença agressiva, é principalmente pulmonar e reduz muito a taxa de sobrevida, o que torna o osteossarcoma uma doença grave para os jovens, além de trazer fardos pesados para a família. A resistência ou insensibilidade à quimioterapia e a recorrência da doença são outros problemas preocupantes que afetam um número considerável de pacientes. Portanto, é urgente o desenvolvimento de terapias e a continuidade dos estudos que colaboram para o avanço do tratamento da OS (Song et al., 2020; Yin et al., 2020).

Nesse sentido, o uso de plantas medicinais tem se tornado uma alternativa promissora; essas têm se mostrado ser uma rica fonte de agentes bioquímicos eficazes contra diversos tipos de câncer. A maioria dos medicamentos usados contra a doença, como vimblastina, paclitaxel, camptotecina, irinotecano e topotecano têm plantas em sua composição ou algum derivado de seus fitoquímicos (Akaberi et al., 2015; Tesfaye et al., 2020). Obter sinergismo, reduzir as doses utilizadas, obter tratamentos menos citotóxicos, minimizar a resistência desenvolvida

---

pelo organismo aos medicamentos e incluir vários alvos moleculares ao mesmo tempo é o principal objetivo do uso de plantas para o tratamento da doença (Carabajal et al., 2021) . Um agente natural bastante conhecido e promissor para tratamentos na área da saúde é a vanilina.

A vanilina, também conhecida como 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, é um componente do extrato da fava de baunilha mundialmente utilizado como um componente aromático e de sabor. A vanilina tem demonstrado importante efeito antitumoral, além de ser conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antiapoptóticas e neuroprotetoras (Sirangelo et al., 2020; Li et al., 2021). Essas propriedades se devem aos múltiplos efeitos demonstrados em diversos estudos. Com relação ao câncer, foi relatado que o composto foi capaz de reduzir a expressão de CDK-6 (quinase 6 dependente de ciclina), uma proteína que é superexpressa no desenvolvimento do câncer, e de induzir apoptose em células de tumor de mama e pulmão (Yousuf et al., 2021). Foi capaz de induzir a apoptose de células cancerígenas de cólon (HT-29) por meio da ativação da via ASK1 - p38 MAPK, promovendo dano mitocondrial e espécies reativas de oxigênio (Li et al., 2021). A vanilina também demonstrou ser capaz de inibir a invasão e migração de células tumorais e a atividade da MMP-9 secretada por essas células. Considerando que o composto é considerado seguro, mostra-se um excelente candidato no desenvolvimento de medicamentos contra a doença (Lirdprapamongkol et al., 2005).

Um achado relativamente importante foi que a divanilina, um homodímero da vanilina, tem maior potencial antimetastático do que o agente aromatizante vanilina. O estudo conduzido por Jantaree e colaboradores (2017) mostrou que a divanilina exibiu maior potência do que a vanilina na inibição da invasão de células de carcinoma hepatocelular. As formas monomérica e dimérica têm como objetivo regular o processo de invasão, inibindo a fosforilação de FAK e Akt. Estudos relacionados à ancoragem molecular sugeriram que os dímeros deveriam se ligar mais fortemente do que o monômero ao bolso Y397 do domínio FAK FERM. O poder antimetastático da divanilina mostrou-se maior do que o da vanilina (Jantaree et al., 2017).

Considerando o exposto acima, estudos anteriores que comprovam os efeitos da vanilina e divanilina e o fato de não haver relatos na literatura sobre os efeitos dos compostos em células de osteossarcoma murino, o objetivo deste estudo foi

---

fornecer novos conhecimentos sobre o potencial anticâncer de ambos os compostos em células ósseas tumorais.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Síntese dos compostos vanilina e divanilina*

O composto vanilina foi obtido comercialmente na Sigma-Aldrich (Código V1104). O composto divanilina foi sintetizado no Laboratório de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), em Bauru, e fornecido pelo Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes. A síntese da divanilina foi realizada pela via sintética descrita na literatura, baseada na dimerização oxidativa da vanilina utilizando persulfato de sódio como oxidante e íons  $\text{Fe}^{+2}$  como catalisadores (Abraham et al., 2010). A pureza da divanilina foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e caracterizada por espectrometria de massa (Venturini, 2016). A divanilina apresenta pureza >95%.

### *2.2. Preparação de meio condicionado com vanilina e divanilina para ensaios biológicos in vitro*

De acordo com a norma ISO 10993-539, o uso de diferentes concentrações de compostos químicos comercializados ou sintetizados é recomendado para testes *in vitro*. Devido a essa recomendação, foram utilizadas concentrações de 300, 500 e 600µg / mL de vanilina e 150, 250 e 300µg / mL de divanilina. Os compostos foram inicialmente diluídos em hidróxido de sódio (NaOH) 0,5M e posteriormente em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, os meios condicionados foram filtrados em um filtro com porosidade de 0,22µm e as concentrações utilizadas para os compostos foram preparadas (adicionando meio de cultura contendo 10% de SFB). Também foi utilizado o grupo controle negativo, no qual as células foram mantidas em água filtrada deionizada, sem adição de compostos. O grupo controle negativo é utilizado para controle de morte celular.

Primeiro, os ensaios de viabilidade celular (MTT e Violeta Cristal) foram realizados; a partir desses ensaios, as concentrações de uso (300, 500 e 600µg / mL de vanilina e 150, 250 e 300µg / mL de divanilina) foram definidas para os demais ensaios (migração, EROs, formação de colônia e proteoma). Essas concentrações foram definidas porque apresentaram, para a linhagem UMR-106, diferença

---

significativa em relação aos grupos controle e ausência de danos aos osteoblastos murinos normais.

### *2.3. Cultura de células*

Foram utilizados pré-osteoblastos murinos normais diferenciados da linhagem MC3T3-E1 e uma linhagem de osteossarcoma murino, UMR-106, ambas adquiridas na American Type Culture Collection (ATCC - Rockville, Maryland, EUA). A linhagem MC3T3-E1 foi cultivada em meio de cultura  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification) e a UMR-106 em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), acrescidos de 10% de SFB e 1% de Penicilina / Estreptomicina. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> (Oliveira et al., 2017; Piacenti-Silva et al., 2016).

### *2.4. Ensaio MTT*

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich) após 24, 48 e 72h de exposição das células MC3T3-E1 e UMR -106 aos compostos vanilina e divanilina. O teste baseia-se na quantificação da conversão do MTT, solúvel em água, em formazano insolúvel. O formazan azul-púrpura foi solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido) e sua concentração foi determinada por densidade óptica em um espectrofotômetro de filtro de 562 nm (Mossman, 1983) (Synergy™ Mx Monochromator-Based Multi-mode Microplate Reader, Biotek Instruments Inc, Winooski, Vermont, EUA).

### *2.5. Teste colorimétrico violeta cristal*

As células UMR-106 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $5 \times 10^3$  células / poço. Após 24h de adesão, o meio de cultura foi retirado e as células tratadas ou não (grupo controle) com vanilina ou divanilina. Após 72h, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas duas vezes com PBS, coradas com 50  $\mu$ L de solução de violeta cristal a 0,5% e mantidas em agitador por 20 minutos em temperatura ambiente. A solução de violeta cristal foi então removida e a placa foi lavada quatro vezes com água. Após o período de secagem (cerca de 2h), 200 $\mu$ L de metanol foram adicionados a cada poço e a placa foi mantida sob agitação por 20 minutos em temperatura ambiente. A absorvância foi medida em um

---

espectrofotômetro a 570 nm por um leitor multimodo Synergy H1 (BioTek Instruments, Winooski, VT) (Feoktistova et al., 2016).

## 2.6. Ensaio de formação de colônias

Para determinar o efeito dos compostos vanilina e divanilina na formação de colônias, células UMR-106 foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade de  $2 \times 10^3$  células/poço e, após 24h de adesão, foram tratadas ou não (grupo controle) com vanilina ou divanilina durante 7 dias, sendo que o meio de cultura condicionado com os compostos foi substituído após 3 dias. Após 7 dias, as colônias foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com metanol 100% por 10 minutos e coradas com 0,2% de violeta de cristal por 5 minutos em temperatura ambiente (Zhao et al., 2018). Em seguida, o corante foi removido com PBS (por 3x), os poços foram fotografados e o número de colônias foi contado por meio do software Image J (Research Services Branch, National Institute of Health Image - NHI, Bethesda, Maryland, EUA).

## 2.7. Ensaio de cicatrização de feridas

As células UMR-106 foram semeadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 12 poços e permaneceram em estufa por 72 horas para adquirir confluência total. Em seguida, os poços foram tratados com  $5 \mu\text{g} / \text{mL}$  de mitomicina C (antiproliferativo) por 15 minutos. O pré-tratamento com mitomicina C garante que as células estão migrando e não proliferando. Os poços foram lavados com PBS 1X e foi feita uma lesão na monocamada de células com uma ponteira de  $200 \mu\text{L}$ , formando uma fenda vertical. Os poços foram lavados 3x com PBS 1X e adicionou-se meio de cultura suplementado com 10% de SFB (controle) ou condicionado com vanilina ou divanilina. Após 24, 48 e 72h de exposição aos compostos, as placas foram fotografadas em microscópio óptico invertido Olympus U-TV0.5XC-3 (Olympus, Tóquio, Japão). A distância de migração celular foi calculada calculando a área em diferentes períodos. Os resultados foram analisados com o software Image J (Research Services Branch, National Institute of Health Image - NHI, Bethesda, Maryland, EUA) (Carvalho et al., 2013).

## 2.8. Medição de espécies reativas de oxigênio (EROs)

---

As células UMR-106 foram cultivadas em placas de 12 poços a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células / poço; após o período de adesão (24h) foram expostas ou não (grupo controle) aos compostos vanilina e divanilina por 72h. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas com 10 µg/mL de DCFH-DA (Sigma-Aldrich) dissolvido em PBS 1X por 30 minutos a 37°C (protegido da luz). Em seguida, o meio foi removido, foram adicionados 500µl de PBS 1x e a intensidade da fluorescência medida em espectrofotômetro com excitação 485nm e emissão 535nm (Synergy™ Mx). Os resultados foram expressos em UFR (Unidade de Fluorescência Relativa).

## 2.9. *Análise Proteômica*

### 2.9.1. *Extração de proteína*

Após 72h de tratamento, nos grupos tratados ou não com vanilina (300 µg/mL) e divanilina (150 µg/mL), as amostras foram coletadas em solução de extração contendo Ureia 6M, Thiureia 2M, DTT 10 mM em Ambic 50mM, permanecendo em gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram sonicadas e centrifugadas por 10 min a 15.000rpm a 4°C, seguido da coleta do sobrenadante. Para extração das proteínas, as amostras permaneceram por 10 minutos em vórtex à 4°C, seguido de ultrassom por 5 minutos e centrifugação a 20,817xg a 4°C. O sobrenadante foi coletado e repetiu-se esse procedimento por mais 2x. A seguir, foi realizada a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, EUA) e uma parte e meia de 50mM de Ambic foi adicionado nas amostras, seguido de RapiGest SF a 0.2 % (Waters), vórtex e incubação por 60 minutos à 37°C. A seguir, as amostras foram reduzidas com adição de 5mM DTT, seguido de agitação no vórtex e incubação em banho seco (37°C) por 40 min., seguidas de spin por 2 minutos e alquiladas com 10mM de iodoacetamida por 30 min em temperatura ambiente, protegido da luz. A digestão protéica foi realizada após a adição de tripsina à 2% por 14h a 37°C, seguido de bloqueio. Foi adicionado ácido trifluoracético a 5%, a 37°C por 90 min e centrifugação à 20,87xg à 6°C por 30 minutos, com o objetivo de hidrolisar o RapiGest. O sobrenadante foi transferido para um outro microtubo (Waters Total Recovery vial- Waters). Para a purificação e dessalinização dos peptídeos, as amostras foram submetidas a coluna C18 (Peptide Cleanup C18 Spin Column) conforme instruções do fabricante. A seguir, as amostras foram evaporadas em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, DE) e

---

congeladas à -20°C. Posteriormente, foram ressuspensas em Acetonitrila a 3% e 0,1% de ácido fórmico acrescido de 1 µL do padrão de digestão MassPREP (álcool desidrogenase-ADH) na concentração 1 pmol/µL - Waters. As amostras foram transferidas para total recovery vial (Waters, Manchester, UK) e submetidas a análise.

#### 2.9.2. Espectrometria de massas - Aquisição nano LC-ESI-MS/MS

Para as análises dos peptídeos foi utilizado o espectrômetro de massas Xevo G2 (Waters) acoplado ao sistema nanoACQUITY (Waters), disponível na Faculdade de Odontologia de Bauru. As amostras (n=3), obtidas a partir do pool da triplicata experimental, foram analisadas. Inicialmente foi realizada a cromatografia líquida em nano-escala (nanoLC) utilizando o sistema nanoACQUITY (Waters Corporation) equipado com uma pré-coluna Symmetry C18 5 µm, 5 mm 180-µm e uma coluna analítica de fase reversa nanoEase BEH130 C18 1,7 µm, 100 µm, 100 mm. As amostras foram misturadas a uma solução aquosa de ácido fórmico (AF) 0,1% e em seguida transferidas para uma pré-coluna a um fluxo de 15 µL/min, durante 1 minuto. Foi utilizada como fase móvel A água com AF 0,1%, e a fase móvel B foi composta de AF 0,1% em acetonitrila (ACN). Os peptídeos foram separados com gradiente de 3-40% de B durante 90 minutos a um fluxo de 600 nL/minuto, seguido por uma lavagem de 10 minutos com 90% de B. A coluna foi então reequilibrada para as condições iniciais durante 20 minutos. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C. Para o lockmass foi utilizado 100 fmol de Human [Glu1]-Fibrinopeptide (GFP) B (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), que foi introduzido simultaneamente à amostra um fluxo constante de 150 nL/min. Todos os espectros foram obtidos no modo íon positivo. Para as análises foram adotados os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 2.0 kV e voltagem do cone de 35 V. O modo de aquisição utilizado foi o MSE, o qual permite uma informação de massa exata tanto dos íons intactos quanto dos fragmentos que são obtidos. A aquisição dos dados foi feita com auxílio do software *Protein Lynx Global Server* (PLGS) versão 3.0 para processar e pesquisar os dados LC-MSE contínuos. As proteínas foram identificadas utilizando o algoritmo de contagem de íons do software, sendo realizada pesquisa na base de dados do UniProtKB (<http://www.uniprot.org>).

#### 2.9.3. Quantificação livre de marcadores (“label-free”)

---

A análise quantitativa livre de marcadores foi realizada utilizando o software *Protein Lynx Global Service* (PLGS, v 3.0, Waters, Co, Manchester, UK). Todas as proteínas identificadas com um score com confiança maior que 95% foram incluídas na análise quantitativa. Os peptídeos idênticos de cada triplicata por amostra foram agrupados com base na precisão de massa ( $< 10$  ppm) e numa tolerância de tempo de retenção  $< 0,25$  minutos, usando o software de agrupamento incluso no PLGS v. 2.3. Foi feita uma normalização usando a função de autonormalização do PLGS. A diferença de expressão entre os grupos foi analisada pelo teste t e expressas como  $p < 0,05$  para as proteínas subreguladas e  $1 - p > 0,95$  para as proteínas superreguladas, respectivamente. Apenas proteínas identificadas em 2 das 3 corridas foram selecionadas para análises subsequentes. As seguintes comparações foram realizadas: divanilina vs controle, vanilina vs controle e divanilina vs vanilina.

#### 2.9.4. Análise de bioinformática

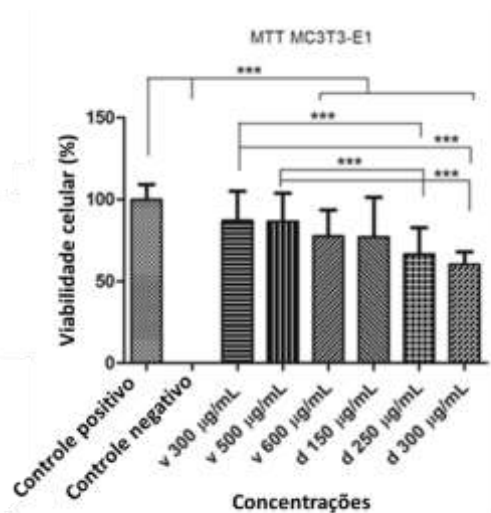
A ontologia genética foi avaliada de acordo com os pluggins ClueGo® do software Cytoscape® 3.8.2. Foi feita a distribuição funcional das proteínas identificadas com expressão diferencial nas diferentes comparações. As categorias de proteínas foram baseadas na anotação Gene Ontology (GO) do Processo Biológico. Os termos de significância (Kappa = 0,04) e distribuição foram de acordo com a porcentagem do número de genes associados. O número de acesso das proteínas foi fornecido pela UNIPROT.

---

### 3. Resultados

#### 3.1. MTT

A



B

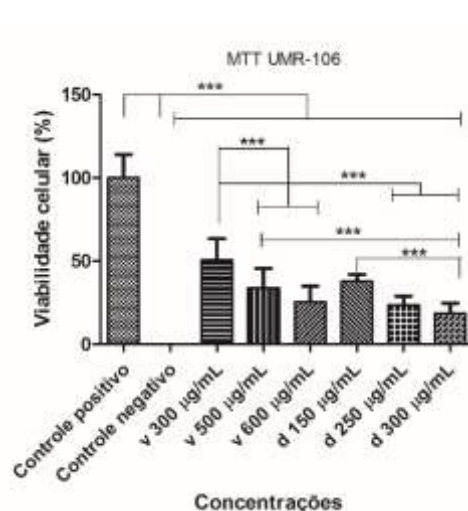
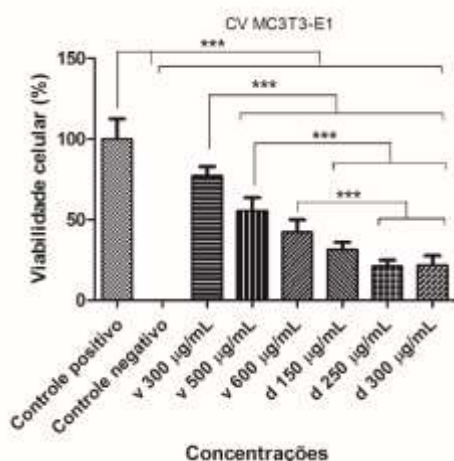


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de vanilina (v) e divanilina (d) na viabilidade celular pelo ensaio de MTT após 72h de incubação. (A) MC3T3-E1 (B) UMR-106. No controle positivo nenhum tratamento foi adicionado e no controle negativo foi utilizada água destilada. \*\*\*  $P < 0,001$  representa diferença estatística quando comparado ao controle positivo e aos grupos tratados entre si. O ensaio foi realizado em triplicata biológica ( $n = 3$ ).

#### 3.2. Teste colorimétrico cristal violeta

A



B

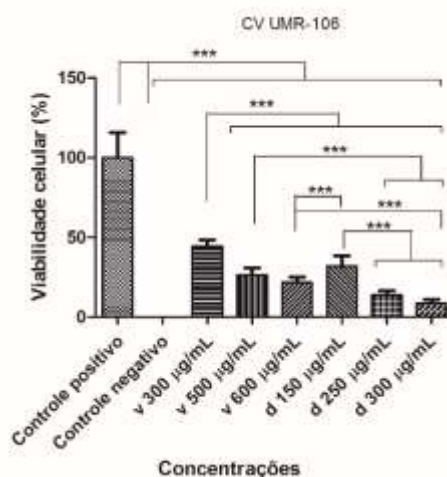


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de vanilina (v) e divanilina (d) na viabilidade celular por teste colorimétrico de cristal violeta após 72h de incubação. (A) MC3T3-E1 (B) UMR-106. No controle positivo nenhum tratamento foi adicionado e no controle negativo foi utilizada água destilada. \*\*\*  $P < 0,001$  representa diferenças estatísticas quando comparado ao controle positivo.

O efeito dos compostos vanilina e divanilina na viabilidade celular da linhagem normal (MC3T3-E1) e tumoral (UMR-106) foi avaliado através dos ensaios MTT e Violeta Cristal. As duas linhagens celulares foram expostas a concentrações de 300, 500 e 600  $\mu\text{g} / \text{ml}$  do composto vanilina e 150, 250 e 300  $\mu\text{g} / \text{ml}$  do composto divanilina. No MTT, para a MC3T3-E1, houve diminuição significativa da viabilidade na maior concentração de vanilina (600  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) e em todas as concentrações de divanilina (150, 250 e 300  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) (Figura 2 A); para UMR-106, a diminuição ocorreu na exposição a todas as concentrações de ambos os compostos (Figura 2B).

No cristal violeta, houve uma diminuição significativa na viabilidade de MC3T-E1 (Figura 3 A) e UMR-106 (Figura 3 B) expostas a todas as concentrações de vanilina (300, 500 e 600  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) e divanilina (150, 250 e 300  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ). As diferenças foram consideradas significativas quando os grupos expostos aos compostos foram comparados ao grupo controle positivo, em ambas as figuras. Observa-se que a diminuição da viabilidade ocorreu de forma dose-dependente para ambos os tipos de células, tanto no MTT quanto no VC.

No geral, as concentrações de divanilina mostraram uma redução significativa na viabilidade em comparação com a vanilina em ambos os ensaios (MTT e CV) e para as duas linhas celulares, MC3T3-E1 e UMR-106.

---

## 3.3. Ensaio de formação de colônias

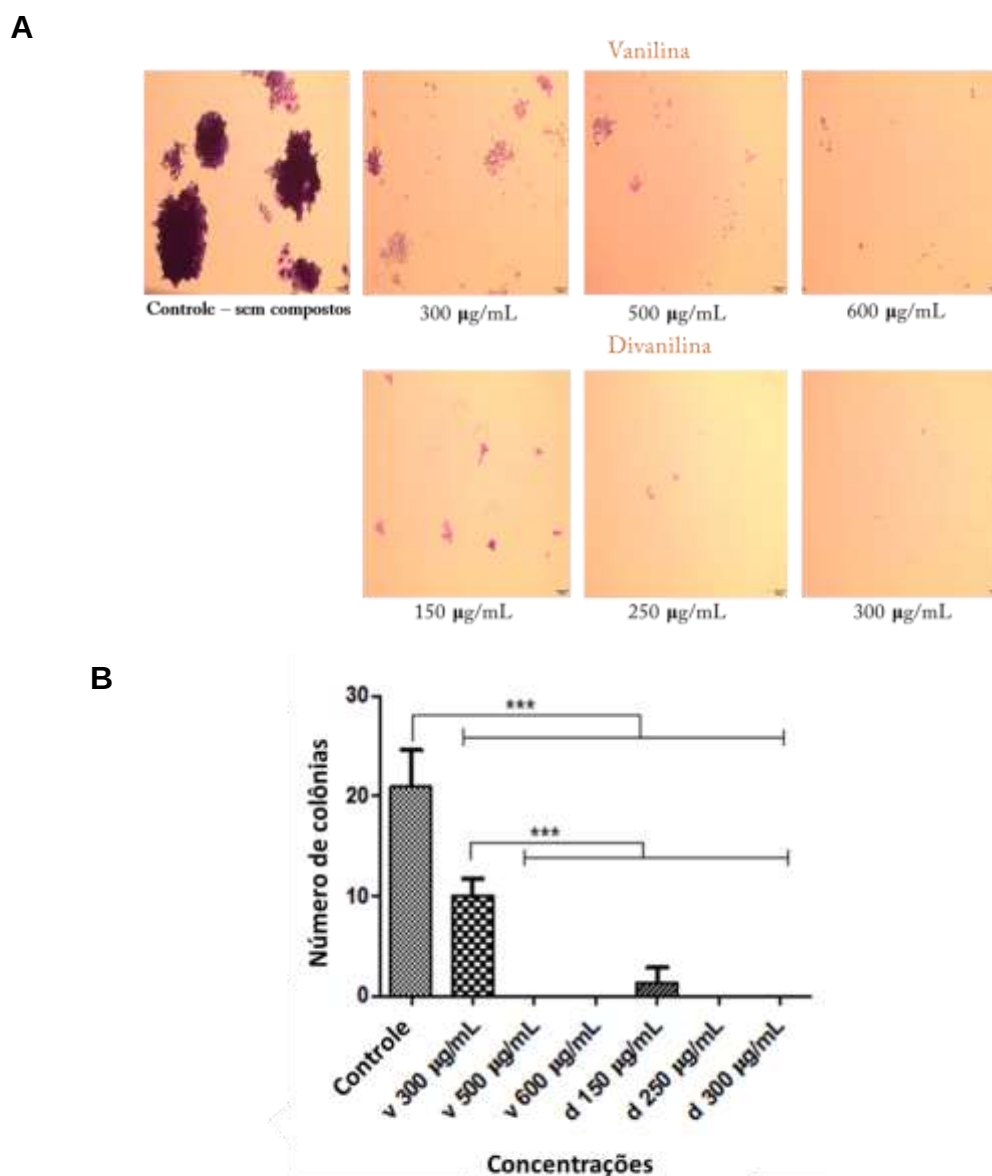


Figura 4. Imagens microscópicas e quantificação da formação de colônias de UMR-106 coradas com cristal violeta em células não tratadas (controle) e tratadas com vanilina (300 - 600 µg / mL) e divanilina (150 - 300 µg / mL) por 7 dias. Barras de escala de 200 µm. Dados apresentados como média ± desvio padrão (\*\*\*)  $P < 0,001$ .

A fim de analisar os efeitos dos compostos vanilina e divanilina na formação de colônias de células UMR-106, foi realizado o ensaio de formação de colônias. Resultados qualitativos e quantitativos são apresentados (Figura 4). A Figura 4A (qualitativa) mostra que houve uma diminuição no número de colônias após 7 dias de tratamento celular com vanilina ou divanilina. O gráfico (Figura 4B), que

representa o resultado quantitativo do ensaio, mostra que a diminuição no número de colônias ocorreu de forma significativa para todas as concentrações (300, 500 e 600µg / mL - vanilina / 150, 250, 300µg / mL - divanilina) de ambos os compostos, quando a comparação é feita com o controle positivo. É possível verificar que a diminuição ocorre de forma dose-dependente. A menor concentração de vanilina (300µg / mL) apresentou diferença significativa em relação às demais concentrações de ambos os compostos.

### 3.4. EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

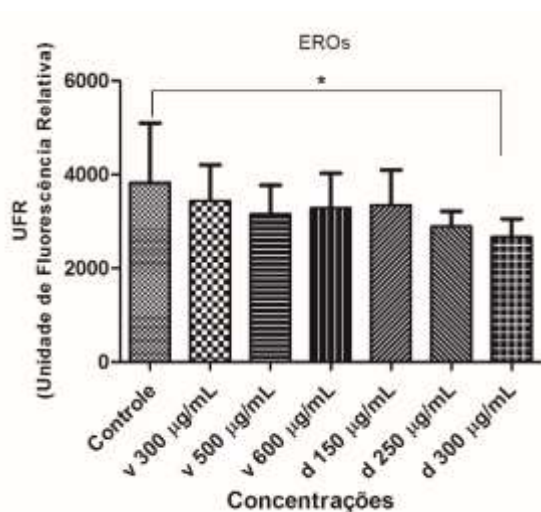
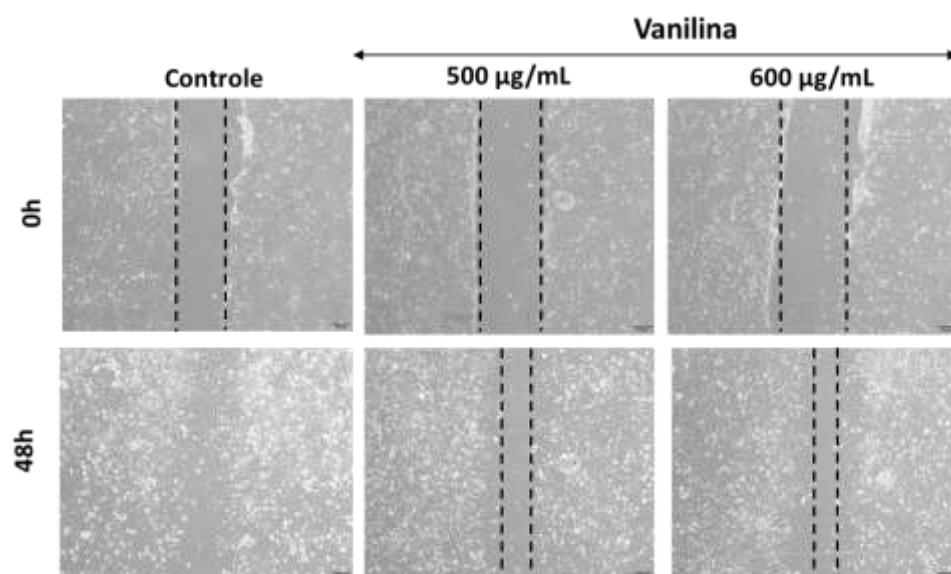


Figura 5. Efeitos da vanilina (300 - 600 µg / mL) e divanilina (150 - 300 µg / mL) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em osteoblastos tumorais (UMR-106) após 72h de tratamento. Valores expressos em UFR (Unidade de Fluorescência Relativa)  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,05$  representa diferença estatística quando comparado ao controle.

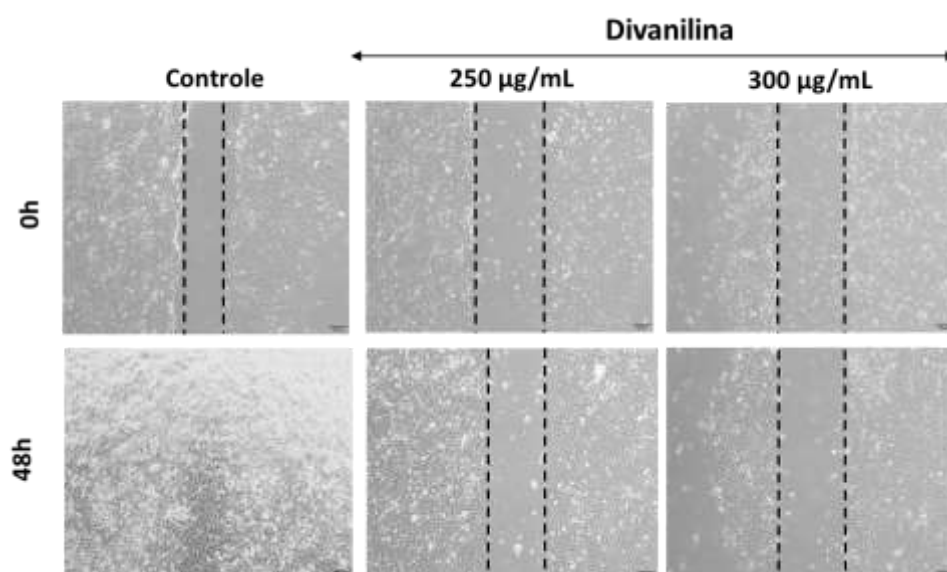
O teste referente à produção de espécies reativas de oxigênio mostrou que houve uma diminuição significativa na produção de EROs no grupo tratado com divanilina na concentração de 300 µg / mL, quando comparado ao grupo controle. Na comparação entre os grupos vanilina e divanilina, não foram observadas diferenças significativas.

## 3.5. Ensaio de migração celular

A



B



C

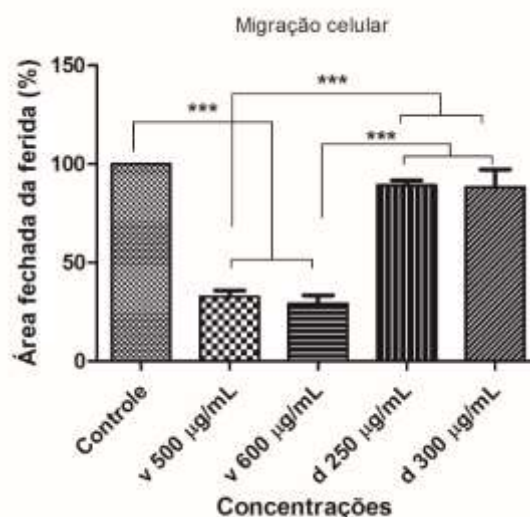


Figura 6. Imagens representativas do ensaio de migração celular em células UMR-106 não tratadas (controle) e tratadas com 500 e 600 µg / mL de vanilina (A) e 250 e 300 µg / mL de divanilina (B) após 0 e 48 horas de tratamento. Análise qualitativa (A e B) e quantitativa (C). Barras de escala de 200 µm.

O ensaio de migração é um método bem baseado, simples e econômico para estudar a migração de células em áreas de feridas (Liang et al., 2007). Considerando o controle positivo, que teve 100% de fechamento da fenda, o composto divanilina não impediu a migração celular, enquanto o composto vanilina mostrou ser capaz de inibir o processo de migração. Após 24 horas de exposição aos compostos vanilina e divanilina, as imagens obtidas das fendas foram praticamente iguais às obtidas após a adição dos tratamentos (dados não mostrados).

### 3.6. Análise Proteômica

#### 3.6.1. Diagrama de Venn

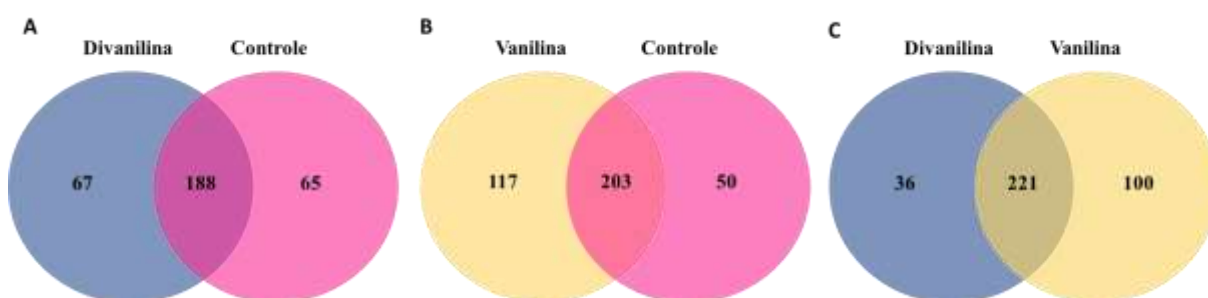


Figura 7. Diagrama de Venn. Mostra o número de proteínas identificadas em células de osteossarcoma murino, UMR-106. Proteínas totais, únicas para cada grupo e proteínas comuns identificadas na análise proteômica. A - Células tratadas com divanilina x grupo controle. B - Células tratadas com vanilina x grupo controle. C - Células tratadas com divanilina x tratadas com vanilina.

A quantidade média total de proteínas identificadas nos grupos Divanilina x Controle, Vanilina x Controle e Divanilina x Vanilina foi 330, 374 e 354, respectivamente (Fig.7).

Na comparação Divanilina x Controle, o número total de proteínas únicas identificadas foi 67 e 65, respectivamente, com 188 proteínas comuns a ambos os grupos (Fig. 7A). Entre as proteínas diferencialmente expressas neste grupo, temos a 6-fosfogluconolactonase, a subunidade alfa\_mitocondrial da flavoproteína de transferência de elétrons e a Lamin-B1 (superexpressa) (Tabela 1).

Na comparação Vanilina x Controle, o número total de proteínas únicas identificadas foi de 117 e 50, respectivamente, com 203 proteínas comuns a ambos os grupos (Fig. 6B). Entre as proteínas expressas diferencialmente neste grupo, temos Lamin-B1 (superexpressa) e membro da família A da fosfoproteína 32 nuclear rica em leucina ácida, homólogo de VAT-1 da proteína da membrana da vesícula sináptica, proteína ribossômica S2 40S, proteína relacionada à actina 2 (subexpressa) (Tabela dois).

Na comparação Divanilina x Vanilina, o número total de proteínas únicas identificadas foi de 36 e 100, respectivamente, com 221 proteínas comuns a ambos os grupos (Fig. 7C). Entre as proteínas diferencialmente expressas neste grupo, temos Isocitrato desidrogenase [NADP] \_mitocondrial e várias isoformas de histona (Histona H2A tipo 1-C, Histona H2A tipo 1-E, Histona H2A tipo 3, Histona H2A tipo 4, Histona H2A tipo 1, Histona H2A tipo 1-F, Histona H2A tipo 2-A, Histona H2A.J)

(superexpressa) e proteína 5 de ligação de ácido graxo e anexina A1 (subexpressa) (Tabela 3).

### 3.6.2. Resultados Cluego

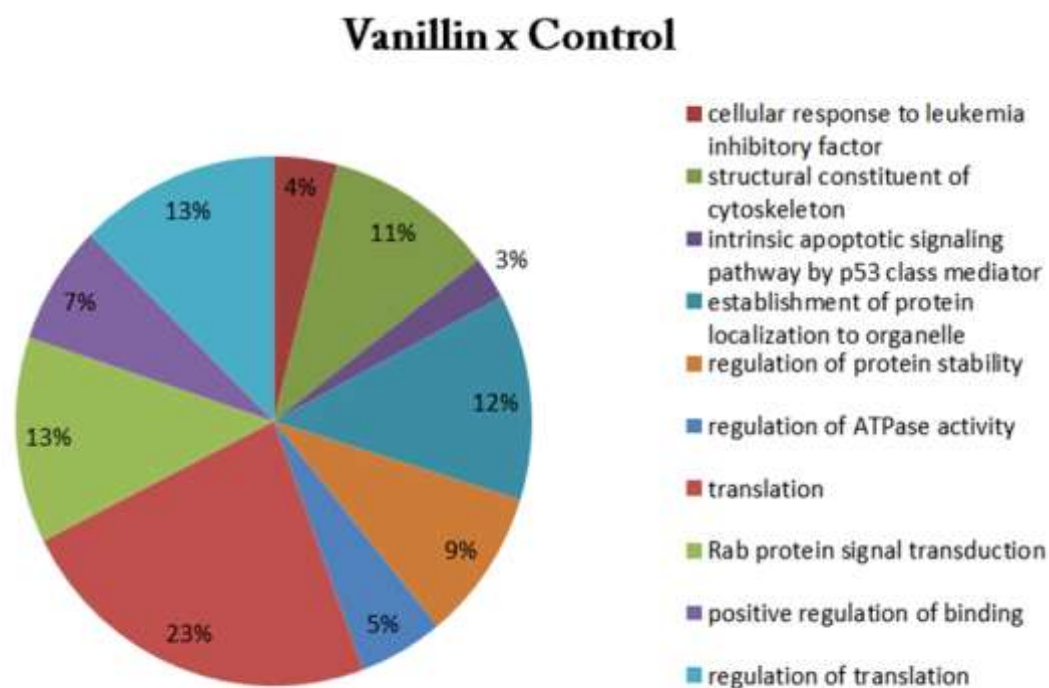


Figura 8. Distribuição funcional das proteínas identificadas com diferença na expressão em células ósseas tumorais UMR-106 expostas a Vanilina vs Controle. Categorias de proteínas baseadas na anotação GO Biological Process. Termos significativos ( $Kappa = 0,04$ ) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes. O gene da ontologia foi avaliado de acordo com os plug-ins ClueGo® do software CYTOSCAPE® 3.8.2 (Bindea et al., 2009, Bindea et al., 2013).

A Figura 8 mostra a classificação funcional de acordo com o processo biológico com o termo mais significativo, para a comparação entre o grupo tratado com vanilina vs controle. As categorias com os maiores percentuais de genes foram tradução (23%), transdução de sinal da proteína Rab (13%), regulação da tradução (13%) e constituinte estrutural do citoesqueleto (11%).

## Divanillin x Control

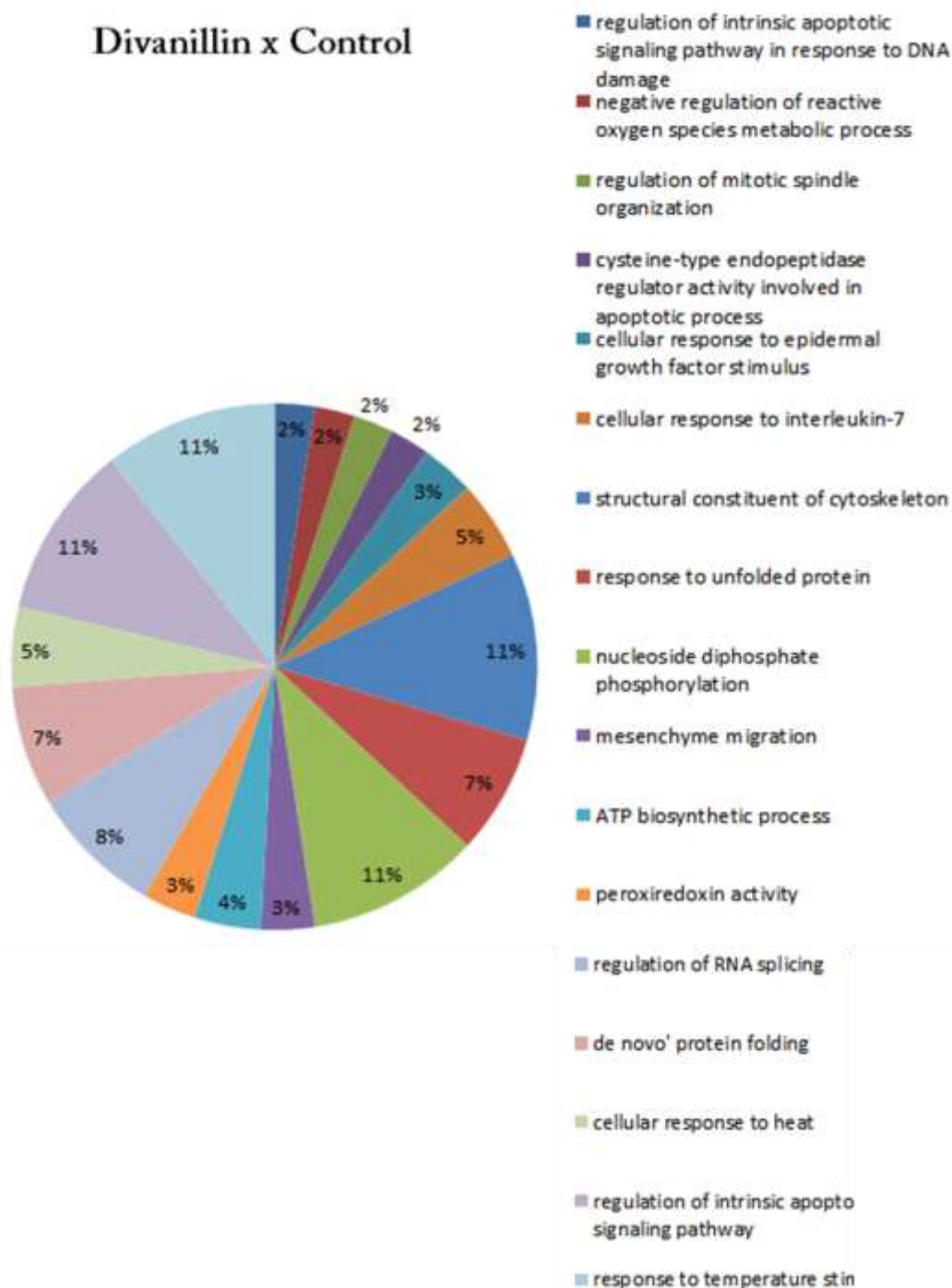


Figura 9. Distribuição funcional das proteínas identificadas com diferença na expressão em células ósseas tumorais UMR-106 expostas a Divanilina vs Controle. Categorias de proteínas baseadas na anotação GO Biological Process. Termos significativos ( $Kappa = 0,04$ ) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes. O gene da ontologia foi avaliado de acordo com os plug-ins ClueGo® do software CYTOSCAPE® 3.8.2 (Bindea et al., 2009, Bindea et al., 2013).

A Figura 9 mostra a classificação funcional de acordo com o processo biológico com o termo mais significativo, para a comparação entre o grupo tratado com Divanilina vs Controle. As categorias com as maiores porcentagens de genes foram constituintes estruturais do citoesqueleto (11%), fosforilação de difosfato de nucleosídeo (11%), regulação da via de sinalização apoptótica intrínseca (11%) e resposta ao estímulo de temperatura (11%).

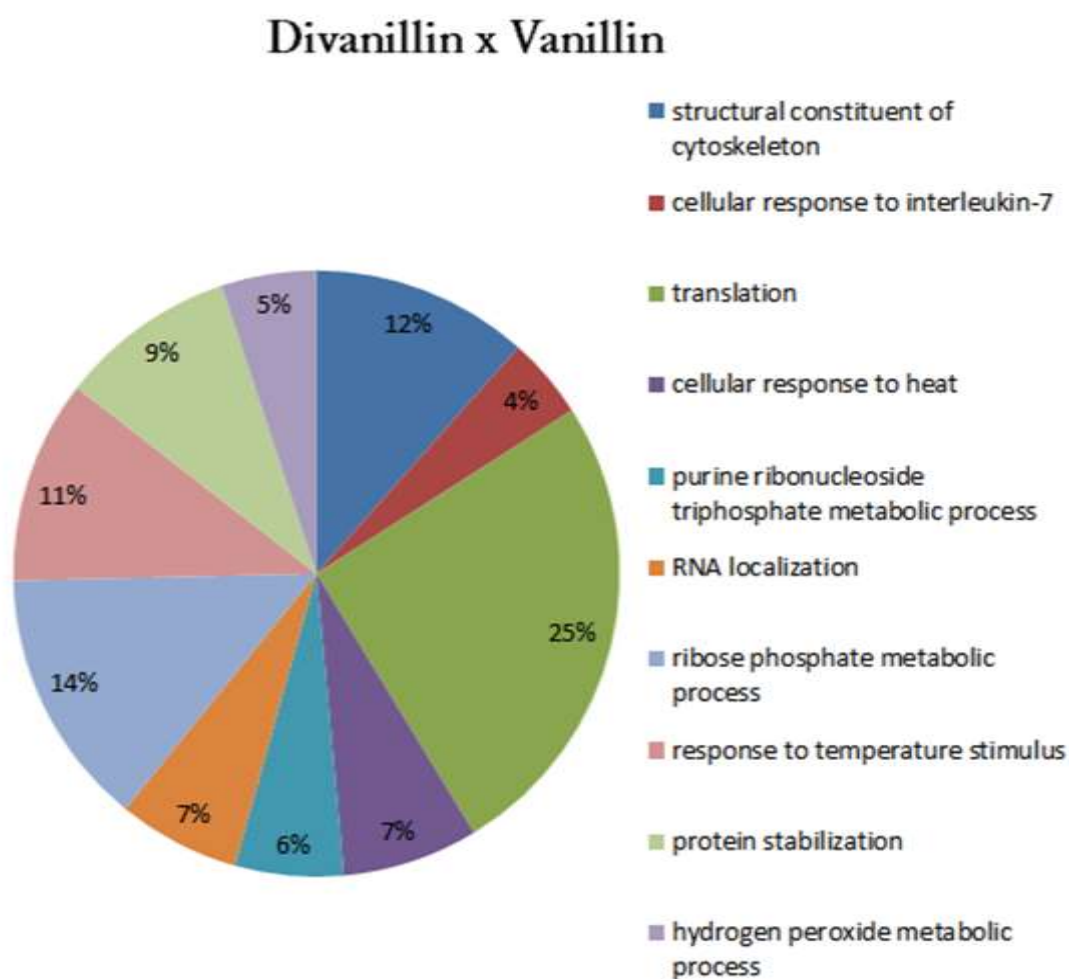


Figura 10. Distribuição funcional das proteínas identificadas com diferença na expressão em células ósseas tumorais UMR-106 expostas a Divanilina vs Vanilina. Categorias de proteínas baseadas na anotação GO Biological Process. Termos significativos ( $Kappa = 0,04$ ) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes. O gene da ontologia foi avaliado de acordo com os plug-ins ClueGo® do software CYTOSCAPE® 3.8.2 (Bindea et al., 2009, Bindea et al., 2013).

A Figura 10 mostra a classificação funcional de acordo com o processo biológico com o termo mais significativo, para a comparação entre o grupo tratado com Divanilina vs Vanilina. As categorias com os maiores percentuais de genes foram tradução (25%), processo metabólico de ribose fosfato (14%) e constituinte estrutural do citoesqueleto (12%).

#### 4. Discussão e conclusão

O osteossarcoma é uma doença grave que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e está associada a altas taxas de mortalidade. Por isso, é essencial encontrar novos tratamentos mais eficazes. A vanilina e a divanilina demonstraram, em vários estudos, propriedades com efeitos consideráveis contra células tumorais de vários tipos e contra condições como, por exemplo, a inflamação; portanto, no presente estudo, considerou-se estudar os efeitos de ambos os compostos em células tumorais de osteossarcoma murino a fim de contribuir para os conhecimentos que envolvem possíveis tratamentos para a doença (Wang et al., 2020; Jantaree et al., 2017).

Considerando o ensaio de viabilidade celular (MTT), o tratamento com vanilina e divanilina mostrou que ambos os compostos diminuem a viabilidade das duas linhagens estudadas, MC3T3-E1 e UMR-106, de forma dose-dependente. Os efeitos sobre a viabilidade foram mais proeminentes em 72h, por isso os demais ensaios seguiram o mesmo período. Nossos resultados corroboram com os de Elsherbiny e colaboradores (2016), que mostraram que a viabilidade celular da linhagem tumoral de mama MCF-7 diminuiu após o tratamento com vanilina; os resultados do estudo também mostram que a vanilina exerceu efeito antitumoral ao inibir o crescimento tumoral *in vivo* e a proliferação *in vitro*, induzir a apoptose, inibir o processo de migração e atuar como antioxidante. É sugerido que a via apoptótica foi ativada pelo aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, como as caspases.

Ainda sobre o ensaio de MTT, nossos resultados mostram que os compostos vanilina e divanilina foram mais eficazes na redução da viabilidade das células tumorais (UMR-106). Diversos estudos na literatura destacam a atividade anticâncer e antitumoral de compostos fenólicos, como ácido hidroxicinâmico, ácido hidroxibenzóico, ácido ferúlico, caféico, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido síngico

---

e vanilina. Sugere-se que esses efeitos se devam principalmente à lipofilicidade e às propriedades pró-oxidantes (Rai et al., 2018). Os compostos lipofílicos são absorvidos com mais eficiência à medida que penetram nos núcleos lipídicos das membranas, o que é um fator crucial no que diz respeito às propriedades farmacocinéticas. Ácidos sintetizados a partir de vanilina e aldeído protocatecuico, que também é um aldeído fenólico, apresentaram alta citotoxicidade contra linhagens de células tumorais de mama (MCF-7) e pele (A-375) (Petrovic et al., 2020).

Nossos resultados demonstram que os compostos vanilina e divanilina foram capazes de inibir de forma dose dependente a formação de colônias UMR-106 após 7 dias de tratamento. Sugere-se que compostos com poder de ação na formação de colônias podem ter resultados significativos contra o processo de metástase; durante o último, desde que existam condições ideais, como nutrientes suficientes e uma rede de vasos, as células migram para outros órgãos, formam colônias e invadem os tecidos normais. Conforme demonstrado (Figura 4 A e B), ambos os compostos podem ter alguma atividade terapêutica nesse sentido, tendo em vista que o osteossarcoma apresenta principalmente metástases pulmonares (Sun et al, 2021). Li e colaboradores (2021) demonstraram em um estudo que a vanilina foi capaz de inibir a viabilidade e a formação de colônias de células cancerígenas colorretais de forma dose-dependente, dados que estão de acordo com o presente estudo. Outro processo importante relacionado à metástase é a migração, que também foi estudada neste trabalho. A propriedade anti-migração foi confirmada pelo teste de cicatrização de feridas em células expostas à vanilina, nas concentrações de 500 e 600 µg / mL.

O ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio mostra que a maior concentração de divanilina diminuiu significativamente a produção de espécies reativas, ou seja, o composto atuou como antioxidante. Quantidades ótimas de EROs são geradas pela função celular normal, principalmente pelas vias mitocondriais ou por NADPH oxidases; a homeostase dessa quantidade é mantida por agentes antioxidantes expressos pelas células. Uma estratégia atual adotada para o tratamento do câncer é através do aumento da produção de EROs pelas células tumorais; entretanto, quantidades de EROs extremamente elevadas produzidas por quimioterápicos são perigosas para as células, pois podem levar à parada do ciclo celular, apoptose, senescência e danos irreparáveis ao DNA. Os

---

antioxidantes aparecem como uma alternativa terapêutica que pode ser incorporada em quimioterápicos comumente usados (Lirdprapamongkol et al., 2009; Liou et al., 2020).

A presente pesquisa também avaliou alterações proteômicas em células ósseas tumorais UMR-106 após exposição aos compostos vanilina e divanilina. A análise proteômica é uma ferramenta importante para a investigação de proteínas envolvidas em mecanismos específicos e que podem ser direcionadas no tratamento medicamentoso do osteossarcoma (Wang et al., 2021). Como resultado deste ensaio, proteínas expressas diferencialmente foram identificadas nos grupos divanilina vs controle, vanilina vs controle e divanilina vs vanilina. No grupo vanilina vs controle, especificamente, foram encontradas proteínas relacionadas a importantes processos biológicos da célula tumoral, como “structural constituent of cytoskeleton, intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator, translation, regulation of protein stability and ATPase activity e celular response to leukemia inhibitory factor”. No grupo vanilina vs controle, a proteína Lamin-B1 foi regulada positivamente mais de 2 vezes; Laminas são proteínas localizadas próximas à membrana nuclear interna e desempenham papéis importantes, como manutenção da forma e mecânica nuclear. As laminas do tipo B são codificadas por LMNB1, são consideradas fundamentais para a sobrevivência celular e as alterações na expressão das Lamins A e B estão associadas à progressão tumoral (Deng et al., 2020).

Urciuoli e colaboradores (2020), em um estudo sobre a diferença de expressão das laminas em células de osteossarcoma, afirmam que a superexpressão das laminas A e C é considerada um preditor de “bom prognóstico” em pacientes com OS. A lamina tipo B, encontrada no presente estudo, está sempre superexpressa nas células de osteossarcoma quando comparadas aos osteoblastos normais. O aumento da expressão de Lamin-B1 também pode ser observado no grupo divanilina vs controle. Por outro lado, as proteínas Calmodulin 1, 2 e 3 foram reguladas negativamente; as calmodulinas, que são mediadores do  $\text{Ca}^{2+}$ , tem sido identificadas como superexpressas em vários tipos de câncer (Brzozowski et al., 2019). Assim como a calmodulina, a proteína “Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K” encontra-se subexpressa; essas proteínas são superexpressas em diversos tipos de câncer e agentes que diminuem sua expressão são

---

interessantes no campo de estudos relacionados ao tratamento da doença (Gao et al., 2013).

Os resultados da comparação entre os grupos Divanilina vs Controle e o grupo Divanilina x Vanilina também revelaram mudanças significativas nos níveis de expressão de várias proteínas envolvidas no OS. Foram encontradas proteínas relacionadas a processos biológicos envolvidos no câncer, como constituinte estrutural do citoesqueleto, fosforilação de difosfato de nucleosídeo, regulação da via de sinalização apoptótica intrínseca, resposta ao estímulo de temperatura (Div vs Controle), resposta celular à interleucina-7, constituinte estrutural do citoesqueleto e processo metabólico do peróxido de hidrogênio, que está relacionado à produção de EROs (Div. vs. Van.). Uma proteína importante que está presente em nossos resultados é a Transgelin-2, que está subexpressa. Esta é uma pequena proteína que se liga à actina e é proposto que atue como um fator oncogênico, capaz de contribuir para a tumorigênese em uma ampla gama de doenças malignas humanas (Kim et al., 2021). Outras proteínas importantes encontradas subexpressas são as da família *heat shock protein*, que é uma classe de chaperones dependentes de ATP. A proteína de choque térmico 70, por exemplo, é expressa em altos níveis nas células cancerosas e atenua a eficácia terapêutica dos agentes anticâncer, resultando em um pior prognóstico. Os estudos têm se concentrado nessas proteínas para o desenvolvimento de novos tratamentos (Mori et al., 2017).

Diante dos resultados promissores dos compostos de vanilina e divanilina em células tumorais ósseas murinas, sugere-se que as propriedades de ambos os compostos devam ser amplamente avaliadas na busca de novos tratamentos para o câncer. Acreditamos que os compostos possam ser usados, no futuro, como adjuvantes em um possível novo tratamento para a doença. Vale ressaltar que são necessários mais ensaios a esse respeito (Bezerra et al., 2016). Produtos naturais bioativos têm se mostrado uma ótima alternativa para o desenvolvimento de medicamentos modernos, principalmente quando relacionados ao câncer. Nossos resultados trazem novos conhecimentos para estudos envolvendo aplicações terapêuticas da vanilina e seu dímero divanilina em células tumorais.

### **Conflito de interesses**

Nenhum declarado.

---

## ANEXOS

**Table 1.** Proteins with significantly altered expression in the osteosarcoma cells UMR-106 treated with Divanillin or not treated (Control).

| <sup>o</sup> Access number | Protein name                                                  | PLGS Score | <sup>+</sup> Ratio<br>Divanillin:Contr<br>ol | P     |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------|------------|----------------------------------------------|-------|
| P85971                     | 6-phosphogluconolactonase                                     | 347        | 3,10                                         | <0.01 |
| P13803                     | Electron transfer flavoprotein subunit<br>alpha_mitochondrial | 183        | 2,23                                         | <0.01 |
| P70615                     | Lamin-B1                                                      | 79         | 2,03                                         | <0.01 |
| P09527                     | Ras-related protein Rab-7a                                    | 314        | 1,63                                         | <0.01 |
| P04906                     | Glutathione S-transferase P                                   | 312        | 1,40                                         | <0.01 |
| P11442                     | Clathrin heavy chain 1                                        | 97         | 1,21                                         | 0.02  |
| P35281                     | Ras-related protein Rab-10                                    | 182        | 1,16                                         | 0.04  |
| P35286                     | Ras-related protein Rab-13                                    | 134        | 1,15                                         | 0.03  |
| P35289                     | Ras-related protein Rab-15                                    | 183        | 1,15                                         | 0.03  |
| Q6NYB7                     | Ras-related protein Rab-1A                                    | 324        | 1,15                                         | 0.04  |
| P10536                     | Ras-related protein Rab-1B                                    | 182        | 1,14                                         | 0.04  |
| P35280                     | Ras-related protein Rab-8A                                    | 182        | 1,13                                         | 0.03  |
| P31000                     | Vimentin                                                      | 191        | 1,12                                         | 0.01  |
| P07632                     | Superoxide dismutase [Cu-Zn]                                  | 1635       | 1,11                                         | 0.01  |
| Q07936                     | Annexin A2                                                    | 364        | 1,09                                         | 0.02  |
| O88989                     | Malate dehydrogenase_ cytoplasmic                             | 602        | 1,05                                         | 0.04  |
| P63259                     | Actin_ cytoplasmic 2                                          | 15199      | 0,99                                         | 0.03  |
| P60711                     | Actin_ cytoplasmic 1                                          | 15199      | 0,99                                         | 0.02  |
| P62738                     | Actin_ aortic smooth muscle                                   | 8830       | 0,98                                         | <0.01 |
| P68035                     | Actin_ alpha cardiac muscle 1                                 | 8846       | 0,97                                         | <0.01 |
| P68136                     | Actin_ alpha skeletal muscle                                  | 8846       | 0,97                                         | <0.01 |
| P63269                     | Actin_ gamma-enteric smooth muscle                            | 8830       | 0,97                                         | <0.01 |
| Q9Z0V5                     | Peroxiredoxin-4                                               | 1114       | 0,94                                         | 0.04  |
| P63102                     | 14-3-3 protein zeta/delta                                     | 1473       | 0,94                                         | 0.02  |
| P11598                     | Protein disulfide-isomerase A3                                | 335        | 0,94                                         | 0.01  |
| P02262                     | Histone H2A type 1                                            | 18717      | 0,94                                         | <0.01 |
| P0C169                     | Histone H2A type 1-C                                          | 18717      | 0,94                                         | <0.01 |
| P0C170                     | Histone H2A type 1-E                                          | 18717      | 0,94                                         | <0.01 |
| Q64598                     | Histone H2A type 1-F                                          | 18717      | 0,94                                         | <0.01 |
| P0CC09                     | Histone H2A type 2-A                                          | 18717      | 0,94                                         | <0.01 |
| Q4FZT6                     | Histone H2A type 3                                            | 18717      | 0,94                                         | <0.01 |
| Q00728                     | Histone H2A type 4                                            | 18717      | 0,94                                         | <0.01 |
| A9UMV8                     | Histone H2A.J                                                 | 18717      | 0,94                                         | <0.01 |
| Q00715                     | Histone H2B type 1                                            | 13056      | 0,94                                         | <0.01 |
| Q63716                     | Peroxiredoxin-1                                               | 2889       | 0,94                                         | <0.01 |
| Q00729                     | Histone H2B type 1-A                                          | 2074       | 0,93                                         | <0.01 |
| P68370                     | Tubulin alpha-1A chain                                        | 7316       | 0,93                                         | <0.01 |
| Q68FR8                     | Tubulin alpha-3 chain                                         | 3667       | 0,93                                         | <0.01 |
| Q9ER34                     | Aconitate hydratase_ mitochondrial                            | 337        | 0,92                                         | 0.03  |
| Q9Z1P2                     | Alpha-actinin-1                                               | 118        | 0,92                                         | <0.01 |
| P0C0S7                     | Histone H2A.Z                                                 | 2396       | 0,92                                         | <0.01 |
| Q6AYZ1                     | Tubulin alpha-1C chain                                        | 6839       | 0,92                                         | <0.01 |
| Q5XIF6                     | Tubulin alpha-4A chain                                        | 2516       | 0,92                                         | <0.01 |
| Q6P9T8                     | Tubulin beta-4B chain                                         | 6495       | 0,92                                         | <0.01 |
| Q6LED0                     | Histone H3.1                                                  | 1326       | 0,91                                         | <0.01 |
| P48500                     | Triosephosphate isomerase                                     | 2793       | 0,91                                         | <0.01 |
| Q6P9V9                     | Tubulin alpha-1B chain                                        | 7726       | 0,91                                         | <0.01 |
| P50137                     | Transketolase                                                 | 363        | 0,90                                         | <0.01 |
| Q6AY56                     | Tubulin alpha-8 chain                                         | 1499       | 0,90                                         | <0.01 |

|        |                                             |       |      |       |
|--------|---------------------------------------------|-------|------|-------|
| P45592 | Cofilin-1                                   | 1104  | 0,90 | 0.01  |
| P84245 | Histone H3.3                                | 1326  | 0,90 | <0.01 |
| P62963 | Profilin-1                                  | 1762  | 0,90 | <0.01 |
| Q7TPB1 | T-complex protein 1 subunit delta           | 692   | 0,90 | <0.01 |
| Q4QRB4 | Tubulin beta-3 chain                        | 6401  | 0,90 | <0.01 |
| O35814 | Stress-induced-phosphoprotein 1             | 110   | 0,89 | 0.03  |
| P31044 | Phosphatidylethanolamine-binding protein 1  | 2193  | 0,89 | <0.01 |
| Q5U300 | Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 | 125   | 0,89 | <0.01 |
| P62193 | 26S proteasome regulatory subunit 4         | 138   | 0,88 | 0.04  |
| P07323 | Gamma-enolase                               | 727   | 0,88 | 0.04  |
| P62909 | 40S ribosomal protein S3                    | 974   | 0,88 | <0.01 |
| P00507 | Aspartate aminotransferase_ mitochondrial   | 203   | 0,88 | <0.01 |
| Q5XHZ0 | Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial    | 2273  | 0,88 | <0.01 |
| P04785 | Protein disulfide-isomerase                 | 340   | 0,88 | <0.01 |
| P69897 | Tubulin beta-5 chain                        | 7823  | 0,88 | <0.01 |
| P62982 | Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a        | 4895  | 0,88 | <0.01 |
| P62986 | Ubiquitin-60S ribosomal protein L40         | 4895  | 0,88 | <0.01 |
| Q68FR6 | Elongation factor 1-gamma                   | 208   | 0,87 | 0.02  |
| P11762 | Galectin-1                                  | 414   | 0,87 | <0.01 |
| P62804 | Histone H4                                  | 17092 | 0,87 | <0.01 |
| Q63429 | Polyubiquitin-C                             | 4895  | 0,87 | <0.01 |
| P62198 | 26S proteasome regulatory subunit 8         | 187   | 0,86 | <0.01 |
| P38983 | 40S ribosomal protein SA                    | 625   | 0,86 | <0.01 |
| P0CG51 | Polyubiquitin-B                             | 4895  | 0,86 | <0.01 |
| Q5M7U6 | Actin-related protein 2                     | 173   | 0,85 | 0.04  |
| P50503 | Hsc70-interacting protein                   | 119   | 0,85 | 0.04  |
| Q794E4 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F   | 288   | 0,85 | 0.02  |
| P26772 | 10 kDa heat shock protein_ mitochondrial    | 3914  | 0,85 | <0.01 |
| P0DP30 | Calmodulin-2                                | 1877  | 0,85 | <0.01 |
| P14659 | Heat shock-related 70 kDa protein 2         | 1385  | 0,85 | <0.01 |
| P04636 | Malate dehydrogenase_ mitochondrial         | 2890  | 0,85 | <0.01 |
| Q3KRE8 | Tubulin beta-2B chain                       | 5316  | 0,85 | <0.01 |
| O35244 | Peroxiredoxin-6                             | 364   | 0,84 | 0.01  |
| P10719 | ATP synthase subunit beta_ mitochondrial    | 1084  | 0,84 | <0.01 |
| Q5XIH7 | Prohibitin-2                                | 883   | 0,84 | <0.01 |
| Q63081 | Protein disulfide-isomerase A6              | 1019  | 0,84 | <0.01 |
| P85108 | Tubulin beta-2A chain                       | 5313  | 0,84 | <0.01 |
| P10760 | Adenosylhomocysteinase                      | 124   | 0,84 | <0.01 |
| P0DP31 | Calmodulin-3                                | 1877  | 0,84 | <0.01 |
| P63245 | Receptor of activated protein C kinase 1    | 646   | 0,84 | <0.01 |
| P62083 | 40S ribosomal protein S7                    | 1156  | 0,83 | <0.01 |
| P0DP29 | Calmodulin-1                                | 1877  | 0,83 | <0.01 |
| P82995 | Heat shock protein HSP 90-alpha             | 3608  | 0,83 | <0.01 |
| P34058 | Heat shock protein HSP 90-beta              | 5087  | 0,83 | <0.01 |
| P25113 | Phosphoglycerate mutase 1                   | 756   | 0,83 | <0.01 |
| P24051 | 40S ribosomal protein S27-like              | 523   | 0,82 | 0.03  |
| P04644 | 40S ribosomal protein S17                   | 1131  | 0,82 | <0.01 |
| P62914 | 60S ribosomal protein L11                   | 916   | 0,82 | <0.01 |
| P06761 | Endoplasmic reticulum chaperone BiP         | 1184  | 0,82 | <0.01 |
| P61980 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K   | 1209  | 0,82 | <0.01 |
| Q6IMY8 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U   | 217   | 0,82 | <0.01 |
| P12928 | Pyruvate kinase PKLR                        | 570   | 0,82 | <0.01 |
| P05765 | 40S ribosomal protein S21                   | 553   | 0,81 | 0.01  |
| P15999 | ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial   | 652   | 0,81 | <0.01 |
| P15429 | Beta-enolase                                | 955   | 0,81 | <0.01 |
| P62828 | GTP-binding nuclear protein Ran             | 2418  | 0,81 | <0.01 |
| Q5XI73 | Rho GDP-dissociation inhibitor 1            | 1313  | 0,81 | <0.01 |
| O08629 | Transcription intermediary factor 1-beta    | 151   | 0,81 | <0.01 |
| P18418 | Calreticulin                                | 898   | 0,80 | <0.01 |
| P04797 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase    | 7475  | 0,80 | <0.01 |

|        |                                                               |       |      |       |
|--------|---------------------------------------------------------------|-------|------|-------|
| Q8K586 | GTP-binding nuclear protein Ran_ testis-specific isoform      | 2418  | 0,80 | <0.01 |
| P0DMW0 | Heat shock 70 kDa protein 1A                                  | 632   | 0,80 | <0.01 |
| P0DMW1 | Heat shock 70 kDa protein 1B                                  | 627   | 0,80 | <0.01 |
| P11980 | Pyruvate kinase PKM                                           | 3184  | 0,80 | <0.01 |
| P55063 | Heat shock 70 kDa protein 1-like                              | 615   | 0,79 | <0.01 |
| Q71TY3 | 40S ribosomal protein S27                                     | 523   | 0,79 | 0.02  |
| P35213 | 14-3-3 protein beta/alpha                                     | 1075  | 0,79 | <0.01 |
| P68255 | 14-3-3 protein theta                                          | 1020  | 0,79 | <0.01 |
| P07150 | Annexin A1                                                    | 142   | 0,79 | <0.01 |
| P63018 | Heat shock cognate 71 kDa protein                             | 4777  | 0,79 | <0.01 |
| P10111 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A                         | 11004 | 0,78 | <0.01 |
| Q9Z2L0 | Voltage-dependent anion-selective channel protein 1           | 371   | 0,77 | <0.01 |
| Q6P7B0 | Tryptophan--tRNA ligase_ cytoplasmic                          | 105   | 0,76 | 0.01  |
| P19944 | 60S acidic ribosomal protein P1                               | 7568  | 0,76 | <0.01 |
| P05197 | Elongation factor 2                                           | 1848  | 0,76 | <0.01 |
| Q6URK4 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3                    | 483   | 0,76 | <0.01 |
| Q5XFX0 | Transgelin-2                                                  | 592   | 0,76 | <0.01 |
| Q08163 | Adenylyl cyclase-associated protein 1                         | 216   | 0,76 | 0.03  |
| P63039 | 60 kDa heat shock protein_ mitochondrial                      | 822   | 0,76 | <0.01 |
| Q5XI72 | Eukaryotic translation initiation factor 4H                   | 561   | 0,76 | <0.01 |
| P37805 | Transgelin-3                                                  | 121   | 0,75 | 0.02  |
| P19945 | 60S acidic ribosomal protein P0                               | 727   | 0,75 | <0.01 |
| P62630 | Elongation factor 1-alpha 1                                   | 8473  | 0,75 | <0.01 |
| P62632 | Elongation factor 1-alpha 2                                   | 1997  | 0,75 | <0.01 |
| A7VJC2 | Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1                | 463   | 0,75 | <0.01 |
| P48721 | Stress-70 protein_ mitochondrial                              | 397   | 0,75 | <0.01 |
| P62859 | 40S ribosomal protein S28                                     | 658   | 0,74 | <0.01 |
| P61983 | 14-3-3 protein gamma                                          | 1122  | 0,73 | <0.01 |
| Q66HD0 | Endoplasmic                                                   | 357   | 0,73 | <0.01 |
| Q5RKI1 | Eukaryotic initiation factor 4A-II                            | 540   | 0,73 | <0.01 |
| P68511 | 14-3-3 protein eta                                            | 814   | 0,73 | <0.01 |
| Q3B8Q2 | Eukaryotic initiation factor 4A-III                           | 131   | 0,73 | <0.01 |
| P13383 | Nucleolin                                                     | 731   | 0,73 | <0.01 |
| Q05982 | Nucleoside diphosphate kinase A                               | 1243  | 0,73 | <0.01 |
| Q9EPH8 | Polyadenylate-binding protein 1                               | 126   | 0,73 | <0.01 |
| P62260 | 14-3-3 protein epsilon                                        | 733   | 0,72 | <0.01 |
| P04764 | Alpha-enolase                                                 | 2106  | 0,72 | <0.01 |
| P62845 | 40S ribosomal protein S15                                     | 736   | 0,71 | <0.01 |
| P36972 | Adenine phosphoribosyltransferase                             | 558   | 0,71 | <0.01 |
| P04642 | L-lactate dehydrogenase A chain                               | 2786  | 0,71 | <0.01 |
| P63029 | Translationally-controlled tumor protein                      | 426   | 0,71 | <0.01 |
| P42123 | L-lactate dehydrogenase B chain                               | 204   | 0,70 | <0.01 |
| P19804 | Nucleoside diphosphate kinase B                               | 1852  | 0,70 | <0.01 |
| P05065 | Fructose-bisphosphate aldolase A                              | 640   | 0,69 | <0.01 |
| P02401 | 60S acidic ribosomal protein P2                               | 1997  | 0,68 | <0.01 |
| P13084 | Nucleophosmin                                                 | 3936  | 0,68 | <0.01 |
| Q9ESV6 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific     | 678   | 0,66 | <0.01 |
| P11884 | Aldehyde dehydrogenase_ mitochondrial                         | 209   | 0,66 | <0.01 |
| O08651 | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase                            | 568   | 0,64 | <0.01 |
| Q6AYK6 | Calcyclin-binding protein                                     | 277   | 0,62 | <0.01 |
| Q9Z0V6 | Thioredoxin-dependent peroxide reductase_ mitochondrial       | 564   | 0,62 | <0.01 |
| P16617 | Phosphoglycerate kinase 1                                     | 366   | 0,61 | <0.01 |
| P22509 | rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin                       | 285   | 0,60 | <0.01 |
| P49911 | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A | 86    | 0,57 | <0.01 |

|        |                                                            |      |             |       |
|--------|------------------------------------------------------------|------|-------------|-------|
| P29457 | Serpin H1                                                  | 1239 | 0,53        | <0.01 |
| Q4FZT9 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2             | 76   | Divanillin* | -     |
| P35738 | 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta_ mitochondrial | 114  | Divanillin* | -     |
| P13471 | 40S ribosomal protein S14                                  | 104  | Divanillin* | -     |
| P62271 | 40S ribosomal protein S18                                  | 148  | Divanillin* | -     |
| P62243 | 40S ribosomal protein S8                                   | 138  | Divanillin* | -     |
| P61314 | 60S ribosomal protein L15                                  | 104  | Divanillin* | -     |
| P61354 | 60S ribosomal protein L27                                  | 151  | Divanillin* | -     |
| Q6SKG1 | Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3_ mitochondrial            | 72   | Divanillin* | -     |
| P24090 | Alpha-2-HS-glycoprotein                                    | 311  | Divanillin* | -     |
| P14141 | Carbonic anhydrase 3                                       | 90   | Divanillin* | -     |
| P02466 | Collagen alpha-2(I) chain                                  | 58   | Divanillin* | -     |
| P10888 | Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1_ mitochondrial    | 99   | Divanillin* | -     |
| Q68FR9 | Elongation factor 1-delta                                  | 126  | Divanillin* | -     |
| P85834 | Elongation factor Tu_ mitochondrial                        | 54   | Divanillin* | -     |
| B2GUZ5 | F-actin-capping protein subunit alpha-1                    | 124  | Divanillin* | -     |
| P55053 | Fatty acid-binding protein 5                               | 149  | Divanillin* | -     |
| Q9WV14 | Guanylate cyclase soluble subunit alpha-2                  | 59   | Divanillin* | -     |
| P02091 | Hemoglobin subunit beta-1                                  | 984  | Divanillin* | -     |
| P11517 | Hemoglobin subunit beta-2                                  | 984  | Divanillin* | -     |
| P63159 | High mobility group protein B1                             | 327  | Divanillin* | -     |
| P52925 | High mobility group protein B2                             | 286  | Divanillin* | -     |
| O35767 | Homeobox protein Nkx-2.5                                   | 88   | Divanillin* | -     |
| P27605 | Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase             | 107  | Divanillin* | -     |
| Q68FX0 | Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta_ mitochondrial | 75   | Divanillin* | -     |
| Q2PQA9 | Kinesin-1 heavy chain                                      | 58   | Divanillin* | -     |
| Q924S5 | Lon protease homolog_ mitochondrial                        | 59   | Divanillin* | -     |
| Q64119 | Myosin light polypeptide 6                                 | 429  | Divanillin* | -     |
| Q62812 | Myosin-9                                                   | 137  | Divanillin* | -     |
| Q9ES54 | Nuclear protein localization protein 4 homolog             | 92   | Divanillin* | -     |
| Q5RK16 | Probable RNA-binding protein EIF1AD                        | 96   | Divanillin* | -     |
| P04961 | Proliferating cell nuclear antigen                         | 202  | Divanillin* | -     |
| P34064 | Proteasome subunit alpha type-5                            | 151  | Divanillin* | -     |
| Q498D5 | Regulator of microtubule dynamics protein 2                | 104  | Divanillin* | -     |
| Q9WVC0 | Septin-7                                                   | 65   | Divanillin* | -     |
| Q8K3K4 | Serpin B10                                                 | 74   | Divanillin* | -     |
| Q3KR53 | Vasculin-like protein 1                                    | 76   | Divanillin* | -     |
| Q6PCU2 | V-type proton ATPase subunit E 1                           | 90   | Divanillin* | -     |
| Q63569 | 26S proteasome regulatory subunit 6A                       | 182  | Control*    | -     |
| Q63570 | 26S proteasome regulatory subunit 6B                       | 95   | Control*    | -     |
| O35048 | 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7                 | 112  | Control*    | -     |
| P62278 | 40S ribosomal protein S13                                  | 186  | Control*    | -     |
| P62246 | 40S ribosomal protein S15a                                 | 599  | Control*    | -     |
| P62250 | 40S ribosomal protein S16                                  | 437  | Control*    | -     |
| P27952 | 40S ribosomal protein S2                                   | 537  | Control*    | -     |
| P60868 | 40S ribosomal protein S20                                  | 328  | Control*    | -     |
| P49242 | 40S ribosomal protein S3a                                  | 145  | Control*    | -     |
| P62703 | 40S ribosomal protein S4_ X isoform                        | 192  | Control*    | -     |
| P23358 | 60S ribosomal protein L12                                  | 832  | Control*    | -     |
| P41123 | 60S ribosomal protein L13                                  | 207  | Control*    | -     |
| P12001 | 60S ribosomal protein L18                                  | 165  | Control*    | -     |
| P47198 | 60S ribosomal protein L22                                  | 195  | Control*    | -     |
| P21531 | 60S ribosomal protein L3                                   | 206  | Control*    | -     |

|        |                                                                   |      |          |   |
|--------|-------------------------------------------------------------------|------|----------|---|
| P62890 | 60S ribosomal protein L30                                         | 1368 | Control* | - |
| P50878 | 60S ribosomal protein L4                                          | 147  | Control* | - |
| P09895 | 60S ribosomal protein L5                                          | 201  | Control* | - |
| Q99NB7 | Acetyl-coenzyme A thioesterase                                    | 87   | Control* | - |
| Q9EST6 | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein<br>32 family member B  | 164  | Control* | - |
| Q05962 | ADP/ATP translocase 1                                             | 168  | Control* | - |
| Q09073 | ADP/ATP translocase 2                                             | 324  | Control* | - |
| P51635 | Aldo-keto reductase family 1 member A1                            | 70   | Control* | - |
| P48037 | Annexin A6                                                        | 118  | Control* | - |
| P53676 | AP-3 complex subunit mu-1                                         | 67   | Control* | - |
| P07824 | Arginase-1                                                        | 88   | Control* | - |
| P40329 | Arginine--tRNA ligase_ cytoplasmic                                | 82   | Control* | - |
| P49088 | Asparagine synthetase [glutamine-<br>hydrolyzing]                 | 125  | Control* | - |
| Q5U216 | ATP-dependent RNA helicase DDX39A                                 | 91   | Control* | - |
| P27653 | C-1-tetrahydrofolate synthase_ cytoplasmic                        | 130  | Control* | - |
| Q5U206 | Calmodulin-like protein 3                                         | 97   | Control* | - |
| Q9Z2F5 | C-terminal-binding protein 1                                      | 82   | Control* | - |
| P35426 | Cyclin-dependent kinase 4                                         | 76   | Control* | - |
| P20816 | Cytochrome P450 4A2                                               | 100  | Control* | - |
| Q6P6R2 | Dihydrolipoyl dehydrogenase_ mitochondrial                        | 77   | Control* | - |
| P43138 | DNA-(apurinic or apyrimidinic site)<br>endonuclease               | 127  | Control* | - |
| Q08877 | Dynamin-3                                                         | 77   | Control* | - |
| B5DF91 | ELAV-like protein 1                                               | 128  | Control* | - |
| P52555 | Endoplasmic reticulum resident protein 29                         | 106  | Control* | - |
| P81795 | Eukaryotic translation initiation factor 2<br>subunit 3_ X-linked | 174  | Control* | - |
| C9WPN6 | Eukaryotic translation initiation factor 2<br>subunit 3_ Y-linked | 170  | Control* | - |
| Q3T1J1 | Eukaryotic translation initiation factor 5A-1                     | 799  | Control* | - |
| Q5M9G9 | FAST kinase domain-containing protein 4                           | 67   | Control* | - |
| P12785 | Fatty acid synthase                                               | 72   | Control* | - |
| Q8K3V5 | Fibronectin type III domain-containing<br>protein 5               | 102  | Control* | - |
| P09117 | Fructose-bisphosphate aldolase C                                  | 169  | Control* | - |
| Q9EPI2 | GDNF family receptor alpha-4                                      | 98   | Control* | - |
| Q68FP1 | Gelsolin                                                          | 66   | Control* | - |
| Q63942 | GTP-binding protein Rab-3D                                        | 120  | Control* | - |
| P04897 | Guanine nucleotide-binding protein G(i)<br>subunit alpha-2        | 99   | Control* | - |
| Q63210 | Guanine nucleotide-binding protein subunit<br>alpha-12            | 96   | Control* | - |
| Q66HA8 | Heat shock protein 105 kDa                                        | 84   | Control* | - |
| P04256 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1                        | 273  | Control* | - |
| Q9JJ54 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0                        | 236  | Control* | - |
| Q7TP47 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q                         | 218  | Control* | - |
| P62959 | Histidine triad nucleotide-binding protein 1                      | 1121 | Control* | - |
| Q80W90 | LIM/homeobox protein Lhx9                                         | 99   | Control* | - |
| Q6AY04 | m-AAA protease-interacting protein 1_<br>mitochondrial            | 115  | Control* | - |
| P30904 | Macrophage migration inhibitory factor                            | 359  | Control* | - |
| Q5M7W5 | Microtubule-associated protein 4                                  | 84   | Control* | - |
| Q66HD3 | Nuclear autoantigenic sperm protein                               | 108  | Control* | - |
| P61972 | Nuclear transport factor 2                                        | 139  | Control* | - |
| Q9Z2G8 | Nucleosome assembly protein 1-like 1                              | 256  | Control* | - |
| A0JPJ7 | Obg-like ATPase 1                                                 | 106  | Control* | - |
| P67779 | Prohibitin                                                        | 354  | Control* | - |
| Q6AYD3 | Proliferation-associated protein 2G4                              | 185  | Control* | - |

|        |                                                 |     |          |   |
|--------|-------------------------------------------------|-----|----------|---|
| P10960 | Prosaposin                                      | 139 | Control* | - |
| P83868 | Prostaglandin E synthase 3                      | 81  | Control* | - |
| P34067 | Proteasome subunit beta type-4                  | 93  | Control* | - |
| Q63945 | Protein SET                                     | 186 | Control* | - |
| P50399 | Rab GDP dissociation inhibitor beta             | 106 | Control* | - |
| P35284 | Ras-related protein Rab-12                      | 120 | Control* | - |
| P61107 | Ras-related protein Rab-14                      | 120 | Control* | - |
| P51156 | Ras-related protein Rab-26                      | 120 | Control* | - |
| P63012 | Ras-related protein Rab-3A                      | 120 | Control* | - |
| Q63941 | Ras-related protein Rab-3B                      | 120 | Control* | - |
| P62824 | Ras-related protein Rab-3C                      | 120 | Control* | - |
| Q53B90 | Ras-related protein Rab-43                      | 146 | Control* | - |
| P05714 | Ras-related protein Rab-4A                      | 181 | Control* | - |
| P51146 | Ras-related protein Rab-4B                      | 120 | Control* | - |
| Q9WVB1 | Ras-related protein Rab-6A                      | 136 | Control* | - |
| Q91Y81 | Septin-2                                        | 141 | Control* | - |
| Q6P799 | Serine--tRNA ligase_ cytoplasmic                | 75  | Control* | - |
| Q99PW3 | Sialidase-1                                     | 75  | Control* | - |
| Q3MIE4 | Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog | 106 | Control* | - |
| Q4V7F0 | Tetratricopeptide repeat protein 23             | 101 | Control* | - |
| P11232 | Thioredoxin                                     | 861 | Control* | - |
| Q920J4 | Thioredoxin-like protein 1                      | 158 | Control* | - |
| Q63524 | Transmembrane emp24 domain-containing protein 2 | 112 | Control* | - |
| P04692 | Tropomyosin alpha-1 chain                       | 385 | Control* | - |
| Q63610 | Tropomyosin alpha-3 chain                       | 355 | Control* | - |
| P09495 | Tropomyosin alpha-4 chain                       | 311 | Control* | - |
| P58775 | Tropomyosin beta chain                          | 391 | Control* | - |
| P62501 | TSC22 domain family protein 1                   | 144 | Control* | - |
| Q4KM49 | Tyrosine--tRNA ligase_ cytoplasmic              | 154 | Control* | - |
| Q9EQX9 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N               | 478 | Control* | - |
| Q4KMA2 | UV excision repair protein RAD23 homolog        | 125 | Control* | - |

B

Differential expression among the groups was expressed as  $p < 0.05$ . Proteins highlighted in bold are increased or decreased more than 2-fold.

\*Identification is based on protein ID from UniProt protein database. reviewed only (<http://www.uniprot.org/>).

+Proteins with expression significantly altered are organized according to the ratio.

Table 2. Proteins with significantly altered expression in the osteosarcoma cells UMR-106 treated with Vanillin or no treated (Control).

| <sup>a</sup> Access number | Protein name                                                   | PLGS Score | <sup>†</sup> Ratio<br>Vanillin:Control | P               |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------|------------|----------------------------------------|-----------------|
| <b>P70615</b>              | <b>Lamin-B1</b>                                                | <b>79</b>  | <b>2.23</b>                            | <b>&lt;0.01</b> |
| Q711G3                     | Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog                 | 156        | 1.90                                   | <0.01           |
| P27653                     | C-1-tetrahydrofolate synthase_ cytoplasmic                     | 130        | 1.62                                   | <0.01           |
| Q68FP1                     | Gelsolin                                                       | 66         | 1.58                                   | <0.01           |
| P09527                     | Ras-related protein Rab-7a                                     | 314        | 1.52                                   | <0.01           |
| P52555                     | Endoplasmic reticulum resident protein 29                      | 106        | 1.49                                   | <0.01           |
| B5DF91                     | ELAV-like protein 1                                            | 128        | 1.48                                   | 0.01            |
| P12785                     | Fatty acid synthase                                            | 72         | 1.45                                   | <0.01           |
| P81795                     | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3_ X-linked | 174        | 1.42                                   | <0.01           |
| P04644                     | 40S ribosomal protein S17                                      | 1131       | 1.38                                   | <0.01           |
| C9WPN6                     | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3_ Y-linked | 170        | 1.38                                   | <0.01           |
| Q5XIH7                     | Prohibitin-2                                                   | 883        | 1.38                                   | <0.01           |
| Q9ESN0                     | Protein Niban 1                                                | 79         | 1.38                                   | <0.01           |
| P49242                     | 40S ribosomal protein S3a                                      | 145        | 1.36                                   | <0.01           |
| P49088                     | Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]                  | 125        | 1.36                                   | 0.02            |
| P45592                     | Cofilin-1                                                      | 1104       | 1.35                                   | <0.01           |
| P84245                     | Histone H3.3                                                   | 1326       | 1.35                                   | <0.01           |
| P62890                     | 60S ribosomal protein L30                                      | 1368       | 1.34                                   | <0.01           |
| P13803                     | Electron transfer flavoprotein subunit alpha_ mitochondrial    | 183        | 1.34                                   | <0.01           |
| Q68FQ0                     | T-complex protein 1 subunit epsilon                            | 274        | 1.34                                   | <0.01           |
| Q6LED0                     | Histone H3.1                                                   | 1326       | 1.32                                   | <0.01           |
| P28480                     | T-complex protein 1 subunit alpha                              | 94         | 1.32                                   | <0.01           |
| Q7TPB1                     | T-complex protein 1 subunit delta                              | 692        | 1.32                                   | <0.01           |
| P10760                     | Adenosylhomocysteinase                                         | 124        | 1.32                                   | 0.01            |
| Q68FR6                     | Elongation factor 1-gamma                                      | 208        | 1.31                                   | <0.01           |
| Q00981                     | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1               | 118        | 1.31                                   | <0.01           |
| Q63569                     | 26S proteasome regulatory subunit 6A                           | 182        | 1.31                                   | 0.01            |
| Q6P7B0                     | Tryptophan--tRNA ligase_ cytoplasmic                           | 105        | 1.30                                   | <0.01           |
| Q6NYB7                     | Ras-related protein Rab-1A                                     | 324        | 1.28                                   | <0.01           |
| P68370                     | Tubulin alpha-1A chain                                         | 7316       | 1.28                                   | <0.01           |
| Q68FR8                     | Tubulin alpha-3 chain                                          | 3667       | 1.28                                   | <0.01           |
| P50878                     | 60S ribosomal protein L4                                       | 147        | 1.28                                   | 0.02            |
| P63039                     | 60 kDa heat shock protein_ mitochondrial                       | 822        | 1.27                                   | <0.01           |
| P04906                     | Glutathione S-transferase P                                    | 312        | 1.27                                   | <0.01           |
| Q05982                     | Nucleoside diphosphate kinase A                                | 1243       | 1.27                                   | <0.01           |
| Q5XIM9                     | T-complex protein 1 subunit beta                               | 93         | 1.27                                   | <0.01           |
| Q6P9V9                     | Tubulin alpha-1B chain                                         | 7726       | 1.27                                   | <0.01           |
| Q6AYZ1                     | Tubulin alpha-1C chain                                         | 6839       | 1.27                                   | <0.01           |
| Q5XIF6                     | Tubulin alpha-4A chain                                         | 2516       | 1.27                                   | <0.01           |
| P16638                     | ATP-citrate synthase                                           | 74         | 1.26                                   | 0.03            |
| P62845                     | 40S ribosomal protein S15                                      | 736        | 1.25                                   | <0.01           |
| P15178                     | Aspartate--tRNA ligase_ cytoplasmic                            | 369        | 1.25                                   | <0.01           |
| P19804                     | Nucleoside diphosphate kinase B                                | 1852       | 1.25                                   | <0.01           |
| P11598                     | Protein disulfide-isomerase A3                                 | 335        | 1.25                                   | <0.01           |
| Q6AY56                     | Tubulin alpha-8 chain                                          | 1499       | 1.25                                   | <0.01           |
| P31000                     | Vimentin                                                       | 191        | 1.25                                   | <0.01           |
| P61107                     | Ras-related protein Rab-14                                     | 120        | 1.25                                   | 0.02            |
| Q4KM49                     | Tyrosine--tRNA ligase_ cytoplasmic                             | 154        | 1.25                                   | 0.04            |
| P85971                     | 6-phosphogluconolactonase                                      | 347        | 1.23                                   | <0.01           |
| Q794E4                     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F                      | 288        | 1.23                                   | <0.01           |
| O88989                     | Malate dehydrogenase_ cytoplasmic                              | 602        | 1.23                                   | <0.01           |
| P67779                     | Prohibitin                                                     | 354        | 1.23                                   | <0.01           |
| P35286                     | Ras-related protein Rab-13                                     | 134        | 1.23                                   | <0.01           |
| Q71TY3                     | 40S ribosomal protein S27                                      | 523        | 1.23                                   | 0.02            |
| Q9Z1P2                     | Alpha-actinin-1                                                | 118        | 1.22                                   | <0.01           |

|        |                                                |       |      |       |
|--------|------------------------------------------------|-------|------|-------|
| P52296 | Importin subunit beta-1                        | 76    | 1.22 | <0.01 |
| P10536 | Ras-related protein Rab-1B                     | 182   | 1.22 | <0.01 |
| P35280 | Ras-related protein Rab-8A                     | 182   | 1.22 | <0.01 |
| P51156 | Ras-related protein Rab-26                     | 120   | 1.22 | 0.01  |
| P09895 | 60S ribosomal protein L5                       | 201   | 1.22 | 0.02  |
| P63012 | Ras-related protein Rab-3A                     | 120   | 1.22 | 0,03  |
| P24051 | 40S ribosomal protein S27-like                 | 523   | 1.21 | <0.01 |
| P10111 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A          | 11004 | 1.21 | <0.01 |
| P35281 | Ras-related protein Rab-10                     | 182   | 1.21 | <0.01 |
| P35289 | Ras-related protein Rab-15                     | 183   | 1.21 | <0.01 |
| Q5U316 | Ras-related protein Rab-35                     | 226   | 1.21 | <0.01 |
| Q53B90 | Ras-related protein Rab-43                     | 146   | 1.21 | <0.01 |
| Q9WVB1 | Ras-related protein Rab-6A                     | 136   | 1.21 | <0.01 |
| P70550 | Ras-related protein Rab-8B                     | 182   | 1.21 | <0.01 |
| P40329 | Arginine--tRNA ligase_ cytoplasmic             | 82    | 1.21 | 0.03  |
| P35284 | Ras-related protein Rab-12                     | 120   | 1.21 | 0.03  |
| P51146 | Ras-related protein Rab-4B                     | 120   | 1.21 | 0.03  |
| P00507 | Aspartate aminotransferase_ mitochondrial      | 203   | 1.20 | <0.01 |
| P0C169 | Histone H2A type 1-C                           | 18717 | 1.20 | <0.01 |
| Q64598 | Histone H2A type 1-F                           | 18717 | 1.20 | <0.01 |
| Q4QRB4 | Tubulin beta-3 chain                           | 6401  | 1.20 | <0.01 |
| Q63941 | Ras-related protein Rab-3B                     | 120   | 1.20 | 0.04  |
| P0CC09 | Histone H2A type 2-A                           | 18717 | 1.19 | <0.01 |
| A9UMV8 | Histone H2A.J                                  | 18717 | 1.19 | <0.01 |
| P0C0S7 | Histone H2A.Z                                  | 2396  | 1.19 | <0.01 |
| P24368 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B          | 394   | 1.19 | <0.01 |
| P05714 | Ras-related protein Rab-4A                     | 181   | 1.19 | <0.01 |
| P46462 | Transitional endoplasmic reticulum ATPase      | 795   | 1.19 | <0.01 |
| P62824 | Ras-related protein Rab-3C                     | 120   | 1.19 | 0.02  |
| P68255 | 14-3-3 protein theta                           | 1020  | 1.17 | <0.01 |
| Q9QXQ0 | Alpha-actinin-4                                | 178   | 1.17 | <0.01 |
| P02262 | Histone H2A type 1                             | 18717 | 1.17 | <0.01 |
| Q5X173 | Rho GDP-dissociation inhibitor 1               | 1313  | 1.17 | <0.01 |
| P69897 | Tubulin beta-5 chain                           | 7823  | 1.17 | <0.01 |
| P19945 | 60S acidic ribosomal protein P0                | 727   | 1.16 | <0.01 |
| Q4V7C7 | Actin-related protein 3                        | 393   | 1.16 | <0.01 |
| Q00728 | Histone H2A type 4                             | 18717 | 1.16 | <0.01 |
| P07632 | Superoxide dismutase [Cu-Zn]                   | 1635  | 1.16 | <0.01 |
| Q6P9T8 | Tubulin beta-4B chain                          | 6495  | 1.16 | <0.01 |
| P62959 | Histidine triad nucleotide-binding protein 1   | 1121  | 1.16 | 0.02  |
| P56574 | Isocitrate dehydrogenase [NADP]_ mitochondrial | 123   | 1.16 | 0.04  |
| P62914 | 60S ribosomal protein L11                      | 916   | 1.15 | <0.01 |
| P62630 | Elongation factor 1-alpha 1                    | 8473  | 1.15 | <0.01 |
| P62804 | Histone H4                                     | 17092 | 1.15 | <0.01 |
| Q00438 | Polypyrimidine tract-binding protein 1         | 257   | 1.15 | <0.01 |
| P26772 | 10 kDa heat shock protein_ mitochondrial       | 3914  | 1.14 | <0.01 |
| P63102 | 14-3-3 protein zeta/delta                      | 1473  | 1.14 | <0.01 |
| P62632 | Elongation factor 1-alpha 2                    | 1997  | 1.14 | <0.01 |
| O88767 | Parkinson disease protein 7 homolog            | 633   | 1.14 | <0.01 |
| Q9Z0V5 | Peroxiredoxin-4                                | 1114  | 1.14 | <0.01 |
| P0C170 | Histone H2A type 1-E                           | 18717 | 1.13 | <0.01 |
| P85108 | Tubulin beta-2A chain                          | 5313  | 1.13 | <0.01 |
| Q3KRE8 | Tubulin beta-2B chain                          | 5316  | 1.13 | <0.01 |
| P11442 | Clathrin heavy chain 1                         | 97    | 1.13 | 0.01  |
| Q07936 | Annexin A2                                     | 364   | 1.12 | <0.01 |
| P10719 | ATP synthase subunit beta_ mitochondrial       | 1084  | 1.12 | <0.01 |
| P14659 | Heat shock-related 70 kDa protein 2            | 1385  | 1.12 | <0.01 |
| Q4FZT6 | Histone H2A type 3                             | 18717 | 1.12 | <0.01 |
| Q6P502 | T-complex protein 1 subunit gamma              | 218   | 1.12 | <0.01 |
| P68035 | Actin_ alpha cardiac muscle 1                  | 8846  | 1.11 | <0.01 |
| P68136 | Actin_ alpha skeletal muscle                   | 8846  | 1.11 | <0.01 |

|               |                                                                      |            |             |                 |
|---------------|----------------------------------------------------------------------|------------|-------------|-----------------|
| P62738        | Actin_ aortic smooth muscle                                          | 8830       | 1.11        | <0.01           |
| P63269        | Actin_ gamma-enteric smooth muscle                                   | 8830       | 1.11        | <0.01           |
| P34058        | Heat shock protein HSP 90-beta                                       | 5087       | 1.11        | <0.01           |
| Q6IMY8        | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U                            | 217        | 1.11        | <0.01           |
| Q00715        | Histone H2B type 1                                                   | 13056      | 1.11        | <0.01           |
| P04785        | Protein disulfide-isomerase                                          | 340        | 1.11        | <0.01           |
| Q8VHV7        | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H                            | 97         | 1.11        | 0.02            |
| P35213        | 14-3-3 protein beta/alpha                                            | 1075       | 1.09        | <0.01           |
| P60711        | Actin_ cytoplasmic 1                                                 | 15199      | 1.09        | <0.01           |
| P63259        | Actin_ cytoplasmic 2                                                 | 15199      | 1.09        | <0.01           |
| P11030        | Acyl-CoA-binding protein                                             | 1031       | 1.09        | <0.01           |
| Q5XHZ0        | Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial                             | 2273       | 1.09        | <0.01           |
| P82995        | Heat shock protein HSP 90-alpha                                      | 3608       | 1.09        | <0.01           |
| Q00729        | Histone H2B type 1-A                                                 | 2074       | 1.09        | <0.01           |
| P38983        | 40S ribosomal protein SA                                             | 625        | 1.09        | 0.02            |
| P0DMW1        | Heat shock 70 kDa protein 1B                                         | 627        | 1.08        | 0.01            |
| Q9ER34        | Aconitate hydratase_ mitochondrial                                   | 337        | 1.08        | 0.03            |
| P06761        | Endoplasmic reticulum chaperone BiP                                  | 1184       | 1.07        | <0.01           |
| P0DMW0        | Heat shock 70 kDa protein 1A                                         | 632        | 1.07        | 0.02            |
| P13383        | Nucleolin                                                            | 731        | 1.07        | 0.02            |
| Q3B8Q2        | Eukaryotic initiation factor 4A-III                                  | 131        | 1.07        | 0.03            |
| P05197        | Elongation factor 2                                                  | 1848       | 1.06        | <0.01           |
| P63018        | Heat shock cognate 71 kDa protein                                    | 4777       | 1.06        | <0.01           |
| Q5RK11        | Eukaryotic initiation factor 4A-II                                   | 540        | 1.06        | 0.01            |
| P13084        | Nucleophosmin                                                        | 3936       | 0.96        | 0.02            |
| Q66HD0        | Endoplasmic                                                          | 357        | 0.93        | 0.01            |
| P0DP31        | Calmodulin-3                                                         | 1877       | 0.92        | 0.01            |
| P0DP30        | Calmodulin-2                                                         | 1877       | 0.91        | 0.01            |
| P0DP29        | Calmodulin-1                                                         | 1877       | 0.91        | <0.01           |
| Q9Z0V6        | Thioredoxin-dependent peroxide reductase_ mitochondrial              | 564        | 0.89        | 0.01            |
| P16617        | Phosphoglycerate kinase 1                                            | 366        | 0.88        | 0.01            |
| P48500        | Triosephosphate isomerase                                            | 2793       | 0.87        | <0.01           |
| Q5XFX0        | Transgelin-2                                                         | 592        | 0.86        | <0.01           |
| P07323        | Gamma-enolase                                                        | 727        | 0.85        | <0.01           |
| O08629        | Transcription intermediary factor 1-beta                             | 151        | 0.85        | <0.01           |
| P04642        | L-lactate dehydrogenase A chain                                      | 2786       | 0.84        | <0.01           |
| P29457        | Serpin H1                                                            | 1239       | 0.84        | <0.01           |
| P62083        | 40S ribosomal protein S7                                             | 1156       | 0.84        | <0.01           |
| P61980        | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K                            | 1209       | 0.79        | <0.01           |
| P18418        | Calreticulin                                                         | 898        | 0.79        | <0.01           |
| Q8K586        | GTP-binding nuclear protein Ran_ testis-specific isoform             | 2418       | 0.78        | <0.01           |
| P62828        | GTP-binding nuclear protein Ran                                      | 2418       | 0.77        | <0.01           |
| Q63716        | Peroxiredoxin-1                                                      | 2889       | 0.77        | <0.01           |
| Q63429        | Polyubiquitin-C                                                      | 4895       | 0.75        | <0.01           |
| P0CG51        | Polyubiquitin-B                                                      | 4895       | 0.74        | <0.01           |
| P62982        | Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a                                 | 4895       | 0.74        | <0.01           |
| P62986        | Ubiquitin-60S ribosomal protein L40                                  | 4895       | 0.74        | <0.01           |
| Q09073        | ADP/ATP translocase 2                                                | 324        | 0.70        | 0.01            |
| Q6URK4        | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3                           | 483        | 0.69        | <0.01           |
| Q6AYK6        | Calcyclin-binding protein                                            | 277        | 0.68        | <0.01           |
| P09495        | Tropomyosin alpha-4 chain                                            | 311        | 0.68        | <0.01           |
| Q9ESV6        | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific            | 678        | 0.67        | <0.01           |
| P62859        | 40S ribosomal protein S28                                            | 658        | 0.65        | <0.01           |
| P04692        | Tropomyosin alpha-1 chain                                            | 385        | 0.65        | <0.01           |
| P58775        | Tropomyosin beta chain                                               | 391        | 0.65        | <0.01           |
| P31044        | Phosphatidylethanolamine-binding protein 1                           | 2193       | 0.59        | <0.01           |
| P50399        | Rab GDP dissociation inhibitor beta                                  | 106        | 0.55        | <0.01           |
| <b>P49911</b> | <b>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A</b> | <b>86</b>  | <b>0.49</b> | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>Q3MIE4</b> | <b>Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog</b>               | <b>106</b> | <b>0.49</b> | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>P27952</b> | <b>40S ribosomal protein S2</b>                                      | <b>537</b> | <b>0.38</b> | <b>&lt;0.01</b> |

| <b>Q5M7U6</b> | <b>Actin-related protein 2</b>                                           | <b>173</b> | <b>0.37</b> | <b>&lt;0.01</b> |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|-----------------|
| P63324        | 40S ribosomal protein S12                                                | 131        | Vanillin*   | -               |
| P62271        | 40S ribosomal protein S18                                                | 198        | Vanillin*   | -               |
| P62853        | 40S ribosomal protein S25                                                | 340        | Vanillin*   | -               |
| P62243        | 40S ribosomal protein S8                                                 | 320        | Vanillin*   | -               |
| P35364        | 5-hydroxytryptamine receptor 5A                                          | 99         | Vanillin*   | -               |
| O88202        | 60 kDa lysophospholipase                                                 | 117        | Vanillin*   | -               |
| P62907        | 60S ribosomal protein L10a                                               | 106        | Vanillin*   | -               |
| P61314        | 60S ribosomal protein L15                                                | 405        | Vanillin*   | -               |
| P61354        | 60S ribosomal protein L27                                                | 144        | Vanillin*   | -               |
| Q7TN78        | Acyl-coenzyme A synthetase ACSM4_ mitochondrial                          | 134        | Vanillin*   | -               |
| Q8CG45        | Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2                                 | 85         | Vanillin*   | -               |
| P12711        | Alcohol dehydrogenase class-3                                            | 138        | Vanillin*   | -               |
| P13601        | Aldehyde dehydrogenase_ cytosolic 1                                      | 77         | Vanillin*   | -               |
| P08289        | Alkaline phosphatase_ tissue-nonspecific isozyme                         | 189        | Vanillin*   | -               |
| P13221        | Aspartate aminotransferase_ cytoplasmic                                  | 118        | Vanillin*   | -               |
| Q641Y8        | ATP-dependent RNA helicase DDX1                                          | 94         | Vanillin*   | -               |
| P12368        | cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit           | 88         | Vanillin*   | -               |
| P14141        | Carbonic anhydrase 3                                                     | 360        | Vanillin*   | -               |
| B2RZ86        | Coiled-coil domain-containing protein 89                                 | 81         | Vanillin*   | -               |
| B1WC61        | Complex I assembly factor ACAD9_ mitochondrial                           | 79         | Vanillin*   | -               |
| P10888        | Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1_ mitochondrial                  | 121        | Vanillin*   | -               |
| Q68FS4        | Cytosol aminopeptidase                                                   | 86         | Vanillin*   | -               |
| P07153        | Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 | 241        | Vanillin*   | -               |
| Q4V8C3        | Echinoderm microtubule-associated protein-like 1                         | 82         | Vanillin*   | -               |
| B0BNK9        | EF-hand calcium-binding domain-containing protein 4A                     | 84         | Vanillin*   | -               |
| Q68FR9        | Elongation factor 1-delta                                                | 312        | Vanillin*   | -               |
| Q99PF5        | Far upstream element-binding protein 2                                   | 100        | Vanillin*   | -               |
| P55053        | Fatty acid-binding protein 5                                             | 334        | Vanillin*   | -               |
| Q5I0G4        | Glycine--tRNA ligase                                                     | 134        | Vanillin*   | -               |
| P02091        | Hemoglobin subunit beta-1                                                | 2565       | Vanillin*   | -               |
| P11517        | Hemoglobin subunit beta-2                                                | 2565       | Vanillin*   | -               |
| F1LQ48        | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L                                | 146        | Vanillin*   | -               |
| Q62826        | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M                                | 154        | Vanillin*   | -               |
| P63159        | High mobility group protein B1                                           | 89         | Vanillin*   | -               |
| P52925        | High mobility group protein B2                                           | 140        | Vanillin*   | -               |
| Q63617        | Hypoxia up-regulated protein 1                                           | 74         | Vanillin*   | -               |
| E9PU28        | Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2                                 | 138        | Vanillin*   | -               |
| P20607        | Interleukin-6                                                            | 191        | Vanillin*   | -               |
| Q562C6        | Leucine zipper transcription factor-like protein 1                       | 87         | Vanillin*   | -               |
| B0BNK7        | Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 3 | 105        | Vanillin*   | -               |
| Q5RJR8        | Leucine-rich repeat-containing protein 59                                | 144        | Vanillin*   | -               |
| Q5XIM7        | Lysine--tRNA ligase                                                      | 110        | Vanillin*   | -               |
| P51583        | Multifunctional protein ADE2                                             | 93         | Vanillin*   | -               |
| Q64119        | Myosin light polypeptide 6                                               | 312        | Vanillin*   | -               |
| P18666        | Myosin regulatory light chain 12B                                        | 95         | Vanillin*   | -               |
| P13832        | Myosin regulatory light chain RLC-A                                      | 95         | Vanillin*   | -               |
| Q66H59        | N-acetylneuraminase lyase                                                | 178        | Vanillin*   | -               |
| P05982        | NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1                                        | 230        | Vanillin*   | -               |
| A7E3N7        | NADPH oxidase activator 1                                                | 81         | Vanillin*   | -               |
| Q62722        | NGFI-A-binding protein 1                                                 | 129        | Vanillin*   | -               |
| Q03351        | NT-3 growth factor receptor                                              | 74         | Vanillin*   | -               |
| Q5U2Z3        | Nucleosome assembly protein 1-like 4                                     | 120        | Vanillin*   | -               |
| Q9QVC8        | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4                                | 143        | Vanillin*   | -               |
| Q9R063        | Peroxiredoxin-5_ mitochondrial                                           | 368        | Vanillin*   | -               |
| Q2M2R8        | Peroxisomal targeting signal 1 receptor                                  | 75         | Vanillin*   | -               |
| P04176        | Phenylalanine-4-hydroxylase                                              | 82         | Vanillin*   | -               |
| Q63737        | Phosducin-like protein                                                   | 97         | Vanillin*   | -               |
| B0BN18        | Prefoldin subunit 2                                                      | 340        | Vanillin*   | -               |

|        |                                                               |      |           |   |
|--------|---------------------------------------------------------------|------|-----------|---|
| Q9JMJ4 | Pre-mRNA-processing factor 19                                 | 114  | Vanillin* | - |
| P07522 | Pro-epidermal growth factor                                   | 96   | Vanillin* | - |
| P04961 | Proliferating cell nuclear antigen                            | 101  | Vanillin* | - |
| P18420 | Proteasome subunit alpha type-1                               | 203  | Vanillin* | - |
| P34064 | Proteasome subunit alpha type-5                               | 94   | Vanillin* | - |
| P60901 | Proteasome subunit alpha type-6                               | 186  | Vanillin* | - |
| P48004 | Proteasome subunit alpha type-7                               | 176  | Vanillin* | - |
| P40307 | Proteasome subunit beta type-2                                | 159  | Vanillin* | - |
| Q6B345 | Protein S100-A11                                              | 1128 | Vanillin* | - |
| Q63481 | Ras-related protein Rab-7L1                                   | 146  | Vanillin* | - |
| P60123 | RuvB-like 1                                                   | 149  | Vanillin* | - |
| Q5PQK1 | Septin-10                                                     | 83   | Vanillin* | - |
| P06685 | Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1          | 75   | Vanillin* | - |
| Q63413 | Spliceosome RNA helicase Ddx39b                               | 126  | Vanillin* | - |
| O08625 | Synaptotagmin-10                                              | 76   | Vanillin* | - |
| P29101 | Synaptotagmin-2                                               | 95   | Vanillin* | - |
| Q925C0 | Synaptotagmin-9                                               | 75   | Vanillin* | - |
| P24155 | Thimet oligopeptidase                                         | 85   | Vanillin* | - |
| Q9EQS0 | Transaldolase                                                 | 78   | Vanillin* | - |
| P62916 | Transcription initiation factor IIB                           | 141  | Vanillin* | - |
| Q64428 | Trifunctional enzyme subunit alpha_ mitochondrial             | 89   | Vanillin* | - |
| Q68FV8 | Ubiquitin domain-containing protein 1                         | 206  | Vanillin* | - |
| P13053 | Vitamin D3 receptor                                           | 92   | Vanillin* | - |
| Q5RK10 | WD repeat-containing protein 1                                | 74   | Vanillin* | - |
| O35048 | 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7                    | 112  | Control*  | - |
| P62278 | 40S ribosomal protein S13                                     | 186  | Control*  | - |
| P60868 | 40S ribosomal protein S20                                     | 328  | Control*  | - |
| P05765 | 40S ribosomal protein S21                                     | 553  | Control*  | - |
| P62703 | 40S ribosomal protein S4_ X isoform                           | 192  | Control*  | - |
| P41123 | 60S ribosomal protein L13                                     | 207  | Control*  | - |
| P12001 | 60S ribosomal protein L18                                     | 165  | Control*  | - |
| P47198 | 60S ribosomal protein L22                                     | 195  | Control*  | - |
| P21531 | 60S ribosomal protein L3                                      | 206  | Control*  | - |
| Q99NB7 | Acetyl-coenzyme A thioesterase                                | 87   | Control*  | - |
| Q9EST6 | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B | 164  | Control*  | - |
| P53676 | AP-3 complex subunit mu-1                                     | 67   | Control*  | - |
| P07824 | Arginase-1                                                    | 88   | Control*  | - |
| Q5U206 | Calmodulin-like protein 3                                     | 97   | Control*  | - |
| Q9Z2F5 | C-terminal-binding protein 1                                  | 82   | Control*  | - |
| P35426 | Cyclin-dependent kinase 4                                     | 76   | Control*  | - |
| P62898 | Cytochrome c_ somatic                                         | 165  | Control*  | - |
| P20816 | Cytochrome P450 4A2                                           | 100  | Control*  | - |
| Q6P6R2 | Dihydrolipoyl dehydrogenase_ mitochondrial                    | 77   | Control*  | - |
| P43138 | DNA-(apurinic or apyrimidinic site) endonuclease              | 127  | Control*  | - |
| Q08877 | Dynamin-3                                                     | 77   | Control*  | - |
| Q5M9G9 | FAST kinase domain-containing protein 4                       | 67   | Control*  | - |
| Q8K3V5 | Fibronectin type III domain-containing protein 5              | 102  | Control*  | - |
| Q9EPI2 | GDNF family receptor alpha-4                                  | 98   | Control*  | - |
| P04897 | Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2       | 99   | Control*  | - |
| Q63210 | Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12           | 96   | Control*  | - |
| P04256 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1                    | 273  | Control*  | - |
| Q80W90 | LIM/homeobox protein Lhx9                                     | 99   | Control*  | - |
| Q6AY04 | m-AAA protease-interacting protein 1_ mitochondrial           | 115  | Control*  | - |
| Q5M7W5 | Microtubule-associated protein 4                              | 84   | Control*  | - |
| A0JPJ7 | Obg-like ATPase 1                                             | 106  | Control*  | - |
| P83868 | Prostaglandin E synthase 3                                    | 81   | Control*  | - |
| P18421 | Proteasome subunit beta type-1                                | 194  | Control*  | - |
| Q63945 | Protein SET                                                   | 186  | Control*  | - |
| P22509 | rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin                       | 285  | Control*  | - |
| Q6P799 | Serine--tRNA ligase_ cytoplasmic                              | 75   | Control*  | - |
| Q99PW3 | Sialidase-1                                                   | 75   | Control*  | - |

|        |                                                 |     |          |   |
|--------|-------------------------------------------------|-----|----------|---|
| Q4V7F0 | Tetratricopeptide repeat protein 23             | 101 | Control* | - |
| Q920J4 | Thioredoxin-like protein 1                      | 158 | Control* | - |
| P37805 | Transgelin-3                                    | 121 | Control* | - |
| Q63524 | Transmembrane emp24 domain-containing protein 2 | 112 | Control* | - |
| P62501 | TSC22 domain family protein 1                   | 144 | Control* | - |
| Q9EQX9 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N               | 478 | Control* | - |
| Q4KMA2 | UV excision repair protein RAD23 homolog B      | 125 | Control* | - |
| Q4KM74 | Vesicle-trafficking protein SEC22b              | 126 | Control* | - |

Differential expression among the groups was expressed as  $p < 0.05$ . Proteins highlighted in bold are increased or decreased more than 2-fold.

\*Identification is based on protein ID from UniProt protein database. reviewed only (<http://www.uniprot.org/>).

+Proteins with expression significantly altered are organized according to the ratio.

Table 3. Proteins with significantly altered expression in the osteosarcoma cells UMR-106 treated with Vanillin or Divanillin.

| <sup>o</sup> Access number | Protein name                                                  | PLGS Score   | <sup>+</sup> Ratio<br>Divanillin: Vanillin | P               |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------|-----------------|
| <b>P56574</b>              | <b>Isocitrate dehydrogenase [NADP]_ mitochondrial</b>         | <b>211</b>   | <b>2.25</b>                                | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>P0C169</b>              | <b>Histone H2A type 1-C</b>                                   | <b>29423</b> | <b>2.12</b>                                | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>P0C170</b>              | <b>Histone H2A type 1-E</b>                                   | <b>29423</b> | <b>2.12</b>                                | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>Q4FZT6</b>              | <b>Histone H2A type 3</b>                                     | <b>29423</b> | <b>2.12</b>                                | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>Q00728</b>              | <b>Histone H2A type 4</b>                                     | <b>29423</b> | <b>2.12</b>                                | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>P02262</b>              | <b>Histone H2A type 1</b>                                     | <b>29423</b> | <b>2.10</b>                                | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>Q64598</b>              | <b>Histone H2A type 1-F</b>                                   | <b>29423</b> | <b>2.10</b>                                | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>P0CC09</b>              | <b>Histone H2A type 2-A</b>                                   | <b>29423</b> | <b>2.10</b>                                | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>A9UMV8</b>              | <b>Histone H2A.J</b>                                          | <b>29423</b> | <b>2.10</b>                                | <b>&lt;0.01</b> |
| P31044                     | Phosphatidylethanolamine-binding protein 1                    | 1138         | 1.48                                       | <0.01           |
| P62859                     | 40S ribosomal protein S28                                     | 676          | 1.32                                       | 0.03            |
| P49911                     | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A | 181          | 1.21                                       | 0.01            |
| Q63429                     | Polyubiquitin-C                                               | 3445         | 1.20                                       | <0.01           |
| P62986                     | Ubiquitin-60S ribosomal protein L40                           | 3445         | 1.20                                       | <0.01           |
| P0CG51                     | Polyubiquitin-B                                               | 3445         | 1.19                                       | <0.01           |
| P62982                     | Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a                          | 3454         | 1.19                                       | <0.01           |
| Q6URK4                     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3                    | 345          | 1.17                                       | <0.01           |
| Q63716                     | Peroxiredoxin-1                                               | 2621         | 1.15                                       | <0.01           |
| P04906                     | Glutathione S-transferase P                                   | 392          | 1.09                                       | 0.03            |
| P50137                     | Transketolase                                                 | 372          | 0.92                                       | 0.01            |
| P11030                     | Acyl-CoA-binding protein                                      | 1568         | 0.92                                       | <0.01           |
| O88989                     | Malate dehydrogenase_ cytoplasmic                             | 598          | 0.92                                       | <0.01           |
| P60711                     | Actin_ cytoplasmic 1                                          | 15198        | 0.91                                       | <0.01           |
| P63259                     | Actin_ cytoplasmic 2                                          | 15193        | 0.91                                       | <0.01           |
| P31000                     | Vimentin                                                      | 158          | 0.90                                       | 0.01            |
| P62738                     | Actin_ aortic smooth muscle                                   | 8139         | 0.90                                       | <0.01           |
| Q8K586                     | GTP-binding nuclear protein Ran_ testis-specific isoform      | 2959         | 0.90                                       | <0.01           |
| P15429                     | Beta-enolase                                                  | 1208         | 0.90                                       | 0.01            |
| P68035                     | Actin_ alpha cardiac muscle 1                                 | 8139         | 0.90                                       | <0.01           |
| P68136                     | Actin_ alpha skeletal muscle                                  | 8139         | 0.90                                       | <0.01           |
| P63269                     | Actin_ gamma-enteric smooth muscle                            | 8139         | 0.90                                       | <0.01           |
| P11762                     | Galectin-1                                                    | 942          | 0.89                                       | <0.01           |
| P62828                     | GTP-binding nuclear protein Ran                               | 3052         | 0.89                                       | <0.01           |
| Q5XFX0                     | Transgelin-2                                                  | 428          | 0.89                                       | <0.01           |
| P16617                     | Phosphoglycerate kinase 1                                     | 310          | 0.88                                       | 0.02            |
| P62083                     | 40S ribosomal protein S7                                      | 1348         | 0.88                                       | <0.01           |
| P63102                     | 14-3-3 protein zeta/delta                                     | 1131         | 0.87                                       | <0.01           |

|        |                                                  |       |      |       |
|--------|--------------------------------------------------|-------|------|-------|
| Q9QXQ0 | Alpha-actinin-4                                  | 230   | 0.87 | <0.01 |
| O35567 | Bifunctional purine biosynthesis protein ATIC    | 174   | 0.87 | <0.01 |
| Q00729 | Histone H2B type 1-A                             | 1935  | 0.87 | <0.01 |
| P04636 | Malate dehydrogenase_ mitochondrial              | 2443  | 0.87 | <0.01 |
| P24368 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B            | 590   | 0.87 | <0.01 |
| P62909 | 40S ribosomal protein S3                         | 336   | 0.86 | <0.01 |
| Q00715 | Histone H2B type 1                               | 16748 | 0.86 | <0.01 |
| P04642 | L-lactate dehydrogenase A chain                  | 1134  | 0.86 | <0.01 |
| P11980 | Pyruvate kinase PKM                              | 3245  | 0.85 | <0.01 |
| Q5U300 | Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1      | 177   | 0.85 | <0.01 |
| Q00438 | Polypyrimidine tract-binding protein 1           | 159   | 0.84 | 0.01  |
| P15999 | ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial        | 735   | 0.84 | <0.01 |
| Q63081 | Protein disulfide-isomerase A6                   | 849   | 0.84 | <0.01 |
| P70615 | Lamin-B1                                         | 152   | 0.84 | 0.01  |
| P15178 | Aspartate--tRNA ligase_ cytoplasmic              | 230   | 0.84 | <0.01 |
| O88767 | Parkinson disease protein 7 homolog              | 744   | 0.84 | <0.01 |
| Q9Z0V5 | Peroxiredoxin-4                                  | 533   | 0.84 | <0.01 |
| Q6P502 | T-complex protein 1 subunit gamma                | 323   | 0.84 | <0.01 |
| P46462 | Transitional endoplasmic reticulum ATPase        | 362   | 0.84 | <0.01 |
| Q5M7U6 | Actin-related protein 2                          | 181   | 0.83 | 0.02  |
| Q4V7C7 | Actin-related protein 3                          | 344   | 0.83 | 0.01  |
| P16638 | ATP-citrate synthase                             | 116   | 0.83 | 0.01  |
| Q9Z1P2 | Alpha-actinin-1                                  | 206   | 0.83 | <0.01 |
| Q66HD0 | Endoplasmic                                      | 400   | 0.83 | <0.01 |
| P11442 | Clathrin heavy chain 1                           | 125   | 0.82 | <0.01 |
| P62804 | Histone H4                                       | 22925 | 0.82 | <0.01 |
| O35814 | Stress-induced-phosphoprotein 1                  | 236   | 0.82 | <0.01 |
| Q00981 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 | 561   | 0.82 | <0.01 |
| P50503 | Hsc70-interacting protein                        | 103   | 0.81 | 0.03  |
| P62193 | 26S proteasome regulatory subunit 4              | 112   | 0.80 | <0.01 |
| Q9ER34 | Aconitate hydratase_ mitochondrial               | 203   | 0.80 | <0.01 |
| Q8VHV7 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H        | 84    | 0.80 | <0.01 |
| P62198 | 26S proteasome regulatory subunit 8              | 134   | 0.79 | <0.01 |
| P02401 | 60S acidic ribosomal protein P2                  | 2079  | 0.79 | <0.01 |
| P04797 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase         | 8593  | 0.79 | <0.01 |
| Q794E4 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F        | 114   | 0.79 | <0.01 |
| Q64119 | Myosin light polypeptide 6                       | 312   | 0.79 | <0.01 |
| O35244 | Peroxiredoxin-6                                  | 336   | 0.79 | <0.01 |
| P12928 | Pyruvate kinase PKLR                             | 693   | 0.79 | <0.01 |
| Q6PEC1 | Tubulin-specific chaperone A                     | 447   | 0.79 | 0.01  |
| P61314 | 60S ribosomal protein L15                        | 405   | 0.79 | <0.01 |
| Q5XHZ0 | Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial         | 1753  | 0.79 | <0.01 |
| P25113 | Phosphoglycerate mutase 1                        | 2118  | 0.79 | <0.01 |
| P11598 | Protein disulfide-isomerase A3                   | 170   | 0.79 | <0.01 |
| Q6P9T8 | Tubulin beta-4B chain                            | 7696  | 0.79 | <0.01 |
| P63159 | High mobility group protein B1                   | 89    | 0.78 | 0.04  |
| Q27W02 | Protein mago nashi homolog                       | 654   | 0.78 | 0.04  |
| P62243 | 40S ribosomal protein S8                         | 320   | 0.78 | <0.01 |
| P04785 | Protein disulfide-isomerase                      | 178   | 0.78 | <0.01 |
| P55063 | Heat shock 70 kDa protein 1-like                 | 449   | 0.77 | <0.01 |
| Q6IMY8 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U        | 307   | 0.77 | <0.01 |
| Q9ESN0 | Protein Niban 1                                  | 119   | 0.77 | <0.01 |
| P62260 | 14-3-3 protein epsilon                           | 331   | 0.76 | <0.01 |
| P50475 | Alanine--tRNA ligase_ cytoplasmic                | 220   | 0.76 | <0.01 |
| P10719 | ATP synthase subunit beta_ mitochondrial         | 1063  | 0.76 | <0.01 |
| P06761 | Endoplasmic reticulum chaperone BiP              | 1338  | 0.76 | <0.01 |
| P0DMW0 | Heat shock 70 kDa protein 1A                     | 436   | 0.76 | <0.01 |
| P0DMW1 | Heat shock 70 kDa protein 1B                     | 436   | 0.76 | <0.01 |
| P82995 | Heat shock protein HSP 90-alpha                  | 2716  | 0.76 | <0.01 |
| P34058 | Heat shock protein HSP 90-beta                   | 3837  | 0.76 | <0.01 |
| P0C0S7 | Histone H2A.Z                                    | 3445  | 0.76 | <0.01 |

|        |                                                     |       |      |       |
|--------|-----------------------------------------------------|-------|------|-------|
| P52925 | High mobility group protein B2                      | 140   | 0.76 | 0.02  |
| P26772 | 10 kDa heat shock protein_ mitochondrial            | 4059  | 0.76 | <0.01 |
| P68511 | 14-3-3 protein eta                                  | 328   | 0.76 | <0.01 |
| P19944 | 60S acidic ribosomal protein P1                     | 5983  | 0.76 | <0.01 |
| P63018 | Heat shock cognate 71 kDa protein                   | 3816  | 0.76 | <0.01 |
| P14659 | Heat shock-related 70 kDa protein 2                 | 1086  | 0.76 | <0.01 |
| Q9Z2L0 | Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 | 465   | 0.76 | <0.01 |
| P63029 | Translationally-controlled tumor protein            | 468   | 0.75 | 0.01  |
| P35213 | 14-3-3 protein beta/alpha                           | 444   | 0.75 | <0.01 |
| P61983 | 14-3-3 protein gamma                                | 407   | 0.75 | <0.01 |
| Q711G3 | Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog      | 314   | 0.75 | <0.01 |
| Q4QRB4 | Tubulin beta-3 chain                                | 7339  | 0.75 | <0.01 |
| P17077 | 60S ribosomal protein L9                            | 182   | 0.74 | 0.01  |
| P02091 | Hemoglobin subunit beta-1                           | 2565  | 0.74 | 0.01  |
| P11517 | Hemoglobin subunit beta-2                           | 2565  | 0.74 | 0.01  |
| P68255 | 14-3-3 protein theta                                | 635   | 0.74 | <0.01 |
| P00507 | Aspartate aminotransferase_ mitochondrial           | 243   | 0.74 | <0.01 |
| P34064 | Proteasome subunit alpha type-5                     | 94    | 0.74 | <0.01 |
| P85108 | Tubulin beta-2A chain                               | 6760  | 0.74 | <0.01 |
| Q3KRE8 | Tubulin beta-2B chain                               | 6760  | 0.74 | <0.01 |
| Q9EPH8 | Polyadenylate-binding protein 1                     | 141   | 0.73 | <0.01 |
| Q5XIM9 | T-complex protein 1 subunit beta                    | 355   | 0.73 | <0.01 |
| Q5XIF6 | Tubulin alpha-4A chain                              | 3801  | 0.73 | <0.01 |
| P69897 | Tubulin beta-5 chain                                | 9585  | 0.73 | <0.01 |
| P28480 | T-complex protein 1 subunit alpha                   | 175   | 0.73 | <0.01 |
| P68370 | Tubulin alpha-1A chain                              | 6924  | 0.73 | <0.01 |
| Q6P9V9 | Tubulin alpha-1B chain                              | 7690  | 0.73 | <0.01 |
| Q6AYZ1 | Tubulin alpha-1C chain                              | 5722  | 0.73 | <0.01 |
| P05197 | Elongation factor 2                                 | 1951  | 0.72 | <0.01 |
| P05065 | Fructose-bisphosphate aldolase A                    | 747   | 0.72 | <0.01 |
| P13383 | Nucleolin                                           | 576   | 0.72 | <0.01 |
| Q5XI73 | Rho GDP-dissociation inhibitor 1                    | 1761  | 0.72 | <0.01 |
| Q6P7B0 | Tryptophan--tRNA ligase_ cytoplasmic                | 111   | 0.72 | <0.01 |
| Q68FR8 | Tubulin alpha-3 chain                               | 3907  | 0.72 | <0.01 |
| P62271 | 40S ribosomal protein S18                           | 198   | 0.71 | <0.01 |
| P10760 | Adenosylhomocysteinase                              | 131   | 0.71 | <0.01 |
| P42123 | L-lactate dehydrogenase B chain                     | 368   | 0.71 | <0.01 |
| Q6AY56 | Tubulin alpha-8 chain                               | 2078  | 0.71 | <0.01 |
| P62914 | 60S ribosomal protein L11                           | 457   | 0.70 | <0.01 |
| Q7TPB1 | T-complex protein 1 subunit delta                   | 942   | 0.70 | <0.01 |
| P61354 | 60S ribosomal protein L27                           | 144   | 0.70 | 0.01  |
| P62630 | Elongation factor 1-alpha 1                         | 8453  | 0.70 | <0.04 |
| Q6LED0 | Histone H3.1                                        | 2220  | 0.70 | <0.01 |
| P84245 | Histone H3.3                                        | 2535  | 0.70 | <0.01 |
| P52296 | Importin subunit beta-1                             | 148   | 0.70 | <0.01 |
| Q68FQ0 | T-complex protein 1 subunit epsilon                 | 171   | 0.70 | <0.01 |
| Q5RKI1 | Eukaryotic initiation factor 4A-II                  | 1030  | 0.69 | <0.01 |
| P13084 | Nucleophosmin                                       | 5069  | 0.69 | <0.01 |
| P19945 | 60S acidic ribosomal protein P0                     | 526   | 0.68 | <0.01 |
| P04764 | Alpha-enolase                                       | 1942  | 0.68 | <0.01 |
| Q71TY3 | 40S ribosomal protein S27                           | 833   | 0.68 | <0.01 |
| Q3B8Q2 | Eukaryotic initiation factor 4A-III                 | 299   | 0.68 | <0.01 |
| P45592 | Cofilin-1                                           | 1607  | 0.67 | <0.01 |
| P48721 | Stress-70 protein_ mitochondrial                    | 273   | 0.67 | <0.01 |
| P62632 | Elongation factor 1-alpha 2                         | 1893  | 0.66 | <0.01 |
| P38983 | 40S ribosomal protein SA                            | 654   | 0.66 | <0.01 |
| P11884 | Aldehyde dehydrogenase_ mitochondrial               | 104   | 0.65 | <0.01 |
| P10111 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A               | 11350 | 0.64 | <0.01 |
| Q68FR6 | Elongation factor 1-gamma                           | 137   | 0.64 | <0.01 |
| P19804 | Nucleoside diphosphate kinase B                     | 4246  | 0.63 | <0.01 |
| P63039 | 60 kDa heat shock protein_ mitochondrial            | 1387  | 0.62 | <0.01 |

|               |                                                                             |            |             |                 |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|-----------------|
| Q6AXR4        | Beta-hexosaminidase subunit beta                                            | 87         | 0.62        | <0.01           |
| O08651        | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase                                          | 890        | 0.62        | <0.01           |
| Q68FR9        | Elongation factor 1-delta                                                   | 312        | 0.62        | <0.01           |
| Q05982        | Nucleoside diphosphate kinase A                                             | 3816       | 0.62        | <0.01           |
| Q08163        | Adenylyl cyclase-associated protein 1                                       | 211        | 0.61        | <0.01           |
| Q5XIH7        | Prohibitin-2                                                                | 812        | 0.61        | <0.01           |
| Q9Z0V6        | Thioredoxin-dependent peroxide reductase_<br>mitochondrial                  | 493        | 0.61        | <0.01           |
| P29457        | Serpin H1                                                                   | 1348       | 0.61        | <0.01           |
| P04644        | 40S ribosomal protein S17                                                   | 976        | 0.59        | <0.01           |
| P62845        | 40S ribosomal protein S15                                                   | 1512       | 0.58        | <0.01           |
| P14141        | Carbonic anhydrase 3                                                        | 360        | 0.54        | <0.01           |
| <b>P55053</b> | <b>Fatty acid-binding protein 5</b>                                         | <b>334</b> | <b>0.47</b> | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>P07150</b> | <b>Annexin A1</b>                                                           | <b>110</b> | <b>0.44</b> | <b>&lt;0.01</b> |
| Q63569        | 26S proteasome regulatory subunit 6A                                        | 259        | Vanillin*   | -               |
| Q63570        | 26S proteasome regulatory subunit 6B                                        | 121        | Vanillin*   | -               |
| P63324        | 40S ribosomal protein S12                                                   | 131        | Vanillin*   | -               |
| P62246        | 40S ribosomal protein S15a                                                  | 418        | Vanillin*   | -               |
| P62250        | 40S ribosomal protein S16                                                   | 555        | Vanillin*   | -               |
| P27952        | 40S ribosomal protein S2                                                    | 201        | Vanillin*   | -               |
| P62853        | 40S ribosomal protein S25                                                   | 340        | Vanillin*   | -               |
| P49242        | 40S ribosomal protein S3a                                                   | 260        | Vanillin*   | -               |
| P35364        | 5-hydroxytryptamine receptor 5A                                             | 99         | Vanillin*   | -               |
| O88202        | 60 kDa lysophospholipase                                                    | 117        | Vanillin*   | -               |
| P62907        | 60S ribosomal protein L10a                                                  | 106        | Vanillin*   | -               |
| P23358        | 60S ribosomal protein L12                                                   | 197        | Vanillin*   | -               |
| P62890        | 60S ribosomal protein L30                                                   | 1287       | Vanillin*   | -               |
| P09895        | 60S ribosomal protein L5                                                    | 339        | Vanillin*   | -               |
| Q7TN78        | Acyl-coenzyme A synthetase ACSM4_ mitochondrial                             | 134        | Vanillin*   | -               |
| Q05962        | ADP/ATP translocase 1                                                       | 89         | Vanillin*   | -               |
| Q09073        | ADP/ATP translocase 2                                                       | 175        | Vanillin*   | -               |
| Q8CG45        | Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2                                    | 85         | Vanillin*   | -               |
| P12711        | Alcohol dehydrogenase class-3                                               | 138        | Vanillin*   | -               |
| P13601        | Aldehyde dehydrogenase_ cytosolic 1                                         | 77         | Vanillin*   | -               |
| P51635        | Aldo-keto reductase family 1 member A1                                      | 79         | Vanillin*   | -               |
| P08289        | Alkaline phosphatase_ tissue-nonspecific isozyme                            | 189        | Vanillin*   | -               |
| P48037        | Annexin A6                                                                  | 102        | Vanillin*   | -               |
| P40329        | Arginine--tRNA ligase_ cytoplasmic                                          | 97         | Vanillin*   | -               |
| P49088        | Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]                               | 94         | Vanillin*   | -               |
| P13221        | Aspartate aminotransferase_ cytoplasmic                                     | 118        | Vanillin*   | -               |
| Q641Y8        | ATP-dependent RNA helicase DDX1                                             | 94         | Vanillin*   | -               |
| Q5U216        | ATP-dependent RNA helicase DDX39A                                           | 112        | Vanillin*   | -               |
| P27653        | C-1-tetrahydrofolate synthase_ cytoplasmic                                  | 81         | Vanillin*   | -               |
| P12368        | cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory<br>subunit           | 88         | Vanillin*   | -               |
| B2RZ86        | Coiled-coil domain-containing protein 89                                    | 81         | Vanillin*   | -               |
| B1WC61        | Complex I assembly factor ACAD9_ mitochondrial                              | 79         | Vanillin*   | -               |
| Q68FS4        | Cytosol aminopeptidase                                                      | 86         | Vanillin*   | -               |
| P07153        | Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein<br>glycosyltransferase subunit 1 | 241        | Vanillin*   | -               |
| Q4V8C3        | Echinoderm microtubule-associated protein-like 1                            | 82         | Vanillin*   | -               |
| B0BNK9        | EF-hand calcium-binding domain-containing protein 4A                        | 84         | Vanillin*   | -               |
| B5DF91        | ELAV-like protein 1                                                         | 95         | Vanillin*   | -               |
| P52555        | Endoplasmic reticulum resident protein 29                                   | 216        | Vanillin*   | -               |
| P81795        | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3_ X-<br>linked          | 197        | Vanillin*   | -               |
| C9WPN6        | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3_ Y-<br>linked          | 161        | Vanillin*   | -               |
| Q3T1J1        | Eukaryotic translation initiation factor 5A-1                               | 290        | Vanillin*   | -               |
| Q99PF5        | Far upstream element-binding protein 2                                      | 100        | Vanillin*   | -               |
| P12785        | Fatty acid synthase                                                         | 90         | Vanillin*   | -               |
| P09117        | Fructose-bisphosphate aldolase C                                            | 244        | Vanillin*   | -               |

|        |                                                                          |      |           |   |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|------|-----------|---|
| Q68FP1 | Gelsolin                                                                 | 85   | Vanillin* | - |
| Q5I0G4 | Glycine--tRNA ligase                                                     | 134  | Vanillin* | - |
| Q63942 | GTP-binding protein Rab-3D                                               | 330  | Vanillin* | - |
| Q66HA8 | Heat shock protein 105 kDa                                               | 193  | Vanillin* | - |
| Q9JJ54 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0                               | 392  | Vanillin* | - |
| F1LQ48 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L                                | 146  | Vanillin* | - |
| Q62826 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M                                | 154  | Vanillin* | - |
| Q7TP47 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q                                | 162  | Vanillin* | - |
| P62959 | Histidine triad nucleotide-binding protein 1                             | 1352 | Vanillin* | - |
| Q63617 | Hypoxia up-regulated protein 1                                           | 74   | Vanillin* | - |
| E9PU28 | Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2                                 | 138  | Vanillin* | - |
| P20607 | Interleukin-6                                                            | 191  | Vanillin* | - |
| Q562C6 | Leucine zipper transcription factor-like protein 1                       | 87   | Vanillin* | - |
| B0BNK7 | Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 3 | 105  | Vanillin* | - |
| Q5RJR8 | Leucine-rich repeat-containing protein 59                                | 144  | Vanillin* | - |
| Q5XIM7 | Lysine--tRNA ligase                                                      | 110  | Vanillin* | - |
| P30904 | Macrophage migration inhibitory factor                                   | 175  | Vanillin* | - |
| P51583 | Multifunctional protein ADE2                                             | 93   | Vanillin* | - |
| P18666 | Myosin regulatory light chain 12B                                        | 95   | Vanillin* | - |
| P13832 | Myosin regulatory light chain RLC-A                                      | 95   | Vanillin* | - |
| Q66H59 | N-acetylneuraminatase lyase                                              | 178  | Vanillin* | - |
| P05982 | NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1                                        | 230  | Vanillin* | - |
| A7E3N7 | NADPH oxidase activator 1                                                | 81   | Vanillin* | - |
| Q62722 | NGFI-A-binding protein 1                                                 | 129  | Vanillin* | - |
| Q03351 | NT-3 growth factor receptor                                              | 74   | Vanillin* | - |
| P61972 | Nuclear transport factor 2                                               | 361  | Vanillin* | - |
| Q9Z2G8 | Nucleosome assembly protein 1-like 1                                     | 283  | Vanillin* | - |
| Q5U2Z3 | Nucleosome assembly protein 1-like 4                                     | 120  | Vanillin* | - |
| Q9QVC8 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4                                | 143  | Vanillin* | - |
| Q9R063 | Peroxisomal targeting signal 1 mitochondrial                             | 368  | Vanillin* | - |
| Q2M2R8 | Peroxisomal targeting signal 1 receptor                                  | 75   | Vanillin* | - |
| P04176 | Phenylalanine-4-hydroxylase                                              | 82   | Vanillin* | - |
| Q63737 | Phosphatase-like protein                                                 | 97   | Vanillin* | - |
| B0BN18 | Prefoldin subunit 2                                                      | 340  | Vanillin* | - |
| Q9JMJ4 | Pre-mRNA-processing factor 19                                            | 114  | Vanillin* | - |
| P07522 | Pro-epidermal growth factor                                              | 96   | Vanillin* | - |
| P67779 | Prohibitin                                                               | 464  | Vanillin* | - |
| Q6AYD3 | Proliferation-associated protein 2G4                                     | 158  | Vanillin* | - |
| P10960 | Prosaposin                                                               | 99   | Vanillin* | - |
| P18420 | Proteasome subunit alpha type-1                                          | 203  | Vanillin* | - |
| P60901 | Proteasome subunit alpha type-6                                          | 186  | Vanillin* | - |
| P48004 | Proteasome subunit alpha type-7                                          | 176  | Vanillin* | - |
| P40307 | Proteasome subunit beta type-2                                           | 159  | Vanillin* | - |
| Q6B345 | Protein S100-A11                                                         | 1128 | Vanillin* | - |
| P50399 | Rab GDP dissociation inhibitor beta                                      | 171  | Vanillin* | - |
| P35284 | Ras-related protein Rab-12                                               | 280  | Vanillin* | - |
| P61107 | Ras-related protein Rab-14                                               | 280  | Vanillin* | - |
| P51156 | Ras-related protein Rab-26                                               | 280  | Vanillin* | - |
| P63012 | Ras-related protein Rab-3A                                               | 330  | Vanillin* | - |
| Q63941 | Ras-related protein Rab-3B                                               | 330  | Vanillin* | - |
| P62824 | Ras-related protein Rab-3C                                               | 404  | Vanillin* | - |
| Q53B90 | Ras-related protein Rab-43                                               | 280  | Vanillin* | - |
| P05714 | Ras-related protein Rab-4A                                               | 280  | Vanillin* | - |
| P51146 | Ras-related protein Rab-4B                                               | 280  | Vanillin* | - |
| Q9WVB1 | Ras-related protein Rab-6A                                               | 175  | Vanillin* | - |
| Q63481 | Ras-related protein Rab-7L1                                              | 146  | Vanillin* | - |
| P60123 | RuvB-like 1                                                              | 149  | Vanillin* | - |
| Q5PQK1 | Septin-10                                                                | 83   | Vanillin* | - |
| Q91Y81 | Septin-2                                                                 | 86   | Vanillin* | - |
| P06685 | Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1                     | 75   | Vanillin* | - |

|        |                                                            |     |             |   |
|--------|------------------------------------------------------------|-----|-------------|---|
| Q63413 | Spliceosome RNA helicase Ddx39b                            | 126 | Vanillin*   | - |
| Q3MIE4 | Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog            | 123 | Vanillin*   | - |
| O08625 | Synaptotagmin-10                                           | 76  | Vanillin*   | - |
| P29101 | Synaptotagmin-2                                            | 95  | Vanillin*   | - |
| Q925C0 | Synaptotagmin-9                                            | 75  | Vanillin*   | - |
| P24155 | Thimet oligopeptidase                                      | 85  | Vanillin*   | - |
| P11232 | Thioredoxin                                                | 319 | Vanillin*   | - |
| Q9EQS0 | Transaldolase                                              | 78  | Vanillin*   | - |
| P62916 | Transcription initiation factor IIB                        | 141 | Vanillin*   | - |
| Q64428 | Trifunctional enzyme subunit alpha_ mitochondrial          | 89  | Vanillin*   | - |
| P04692 | Tropomyosin alpha-1 chain                                  | 90  | Vanillin*   | - |
| Q63610 | Tropomyosin alpha-3 chain                                  | 187 | Vanillin*   | - |
| P09495 | Tropomyosin alpha-4 chain                                  | 76  | Vanillin*   | - |
| P58775 | Tropomyosin beta chain                                     | 76  | Vanillin*   | - |
| Q4KM49 | Tyrosine--tRNA ligase_ cytoplasmic                         | 112 | Vanillin*   | - |
| Q68FV8 | Ubiquitin domain-containing protein 1                      | 206 | Vanillin*   | - |
| P13053 | Vitamin D3 receptor                                        | 92  | Vanillin*   | - |
| Q5RKI0 | WD repeat-containing protein 1                             | 74  | Vanillin*   | - |
| Q4FZT9 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2             | 76  | Divanillin* | - |
| P35738 | 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta_ mitochondrial | 113 | Divanillin* | - |
| P13471 | 40S ribosomal protein S14                                  | 104 | Divanillin* | - |
| P05765 | 40S ribosomal protein S21                                  | 518 | Divanillin* | - |
| Q6SKG1 | Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3_ mitochondrial            | 72  | Divanillin* | - |
| P24090 | Alpha-2-HS-glycoprotein                                    | 311 | Divanillin* | - |
| P02466 | Collagen alpha-2(I) chain                                  | 58  | Divanillin* | - |
| P85834 | Elongation factor Tu_ mitochondrial                        | 54  | Divanillin* | - |
| B2GUZ5 | F-actin-capping protein subunit alpha-1                    | 124 | Divanillin* | - |
| Q9WV14 | Guanylate cyclase soluble subunit alpha-2                  | 59  | Divanillin* | - |
| O35767 | Homeobox protein Nkx-2.5                                   | 88  | Divanillin* | - |
| P27605 | Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase             | 107 | Divanillin* | - |
| Q68FX0 | Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta_ mitochondrial | 75  | Divanillin* | - |
| Q2PQA9 | Kinesin-1 heavy chain                                      | 58  | Divanillin* | - |
| Q924S5 | Lon protease homolog_ mitochondrial                        | 59  | Divanillin* | - |
| Q62812 | Myosin-9                                                   | 137 | Divanillin* | - |
| Q9ES54 | Nuclear protein localization protein 4 homolog             | 92  | Divanillin* | - |
| Q5RKI6 | Probable RNA-binding protein EIF1AD                        | 96  | Divanillin* | - |
| P18421 | Proteasome subunit beta type-1                             | 173 | Divanillin* | - |
| Q498D5 | Regulator of microtubule dynamics protein 2                | 104 | Divanillin* | - |
| P22509 | rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin                    | 154 | Divanillin* | - |
| Q9WVC0 | Septin-7                                                   | 65  | Divanillin* | - |
| Q8K3K4 | Serpin B10                                                 | 74  | Divanillin* | - |
| P37805 | Transgelin-3                                               | 75  | Divanillin* | - |
| Q3KR53 | Vasculin-like protein 1                                    | 76  | Divanillin* | - |
| Q4KM74 | Vesicle-trafficking protein SEC22b                         | 106 | Divanillin* | - |
| Q6PCU2 | V-type proton ATPase subunit E 1                           | 90  | Divanillin* | - |

Differential expression among the groups was expressed as  $p < 0.05$ . Proteins highlighted in bold are increased or decreased more than 2-fold.

\*Identification is based on protein ID from UniProt protein database. reviewed only (<http://www.uniprot.org/>).

+Proteins with expression significantly altered are organized according to the ratio.

**Referências**

1. Abraham, M.H., Smith, R.E., Luchtefeld, R., Boorem, A.J., Luo, R., Acree, W.E. Jr., 2010. Prediction of solubility of drugs and other compounds in organic solvents. *J Pharm Sci.* 99,1500-15. doi: 10.1002/jps.21922.
  2. Akaberi, M., Mehri, S., Iranshahi, M., 2015. Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species. *Fitoterapia.* 100,118–132. doi: 10.1016/j.fitote.2014.11.008.
  3. Bindea, G., Galon, J., Mlecnik, B. 2013. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics.* 29,661-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btt019.
  4. Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J. 2009. ClueGO: a Cytoscape plugin to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics.* 25,1091-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btp101.
  5. Brzozowski, J.S., Skelding, K.A., 2019. The Multi-Functional Calcium/Calmodulin Stimulated Protein Kinase (CaMK) Family: Emerging Targets for Anti-Cancer Therapeutic Intervention. *Pharmaceuticals (Basel).* 12,8. doi: 10.3390/ph12010008.
  6. Carabajal, M.P.A., Piloto-Ferrer, J., Nicollela, H. D., Squarisi, I.S., Guissone A.P.P., Esperandim, T. R., Tavares, D.C., Isla, M., Zampini, I.C., 2021. Antigenotoxic, antiproliferative and antimetastatic properties of a combination of native medicinal plants from Argentina. *J Ethnopharmacol.* 267, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113479>.
  7. Carvalho, A.A., da Costa, P.M., Souza, L.G.S., Lemos, T.L.G., Alves, A.P.N.N., Pessoa, C.P., Moraes Filho deMO. 2013. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. *Life Sci.* 93, 201-207. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/5533>.
  8. Deng, H., Yu, Z., Kang, J., Qin, J., Jiang, X., Jiao, Z. 2020. Research progress in Lamins in malignant tumors. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2020 45, 1490-1498. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2020.190499.
  9. Elsherbiny, N.M., Younis, N.N., Shaheen, M.A., Elseweidy, M.M. 2016. The synergistic effect between vanillin and doxorubicin in ehrlich ascites carcinoma solid tumor and MCF-7 human breast cancer cell line. *Pathol Res Pract.* 212,767-77. doi: 10.1016/j.prp.2016.06.004.
-

10. Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M., 2016. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 4.pdb.prot087379. doi: 10.1101/pdb.prot087379.
  11. Gao, R., Yu, Y., Inoue, A., Widodo, N., Kaul, S.C., Wadhwa, R. 2013. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) promotes tumor metastasis by induction of genes involved in extracellular matrix, cell movement, and angiogenesis. *J Biol Chem.* 288,15046-56. doi: 10.1074/jbc.M113.466136.
  12. Jantaree, P., Lirdprapamongkol, K., Kaewsri, W., Thongsornkleeb, C., Choowongkamon K., Atjanasuppat, K., Ruchirawat, S., Svasti, J., 2017. Homo-Dimers of Vanillin and Apocynin Decrease Metastatic Potential of Human Cancer Cells by Inhibiting the FAK/PI3K/Akt Signaling Pathway. *J Agric Food Chem.* 65, 2299-2306. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05697>.
  13. Kim, H.R., Park, J.S., Karabulut, H., Yasmin, F., Jun, C.D. 2021. Transgelin-2: A Double-Edged Sword in Immunity and Cancer Metastasis. *Front Cell Dev Biol.* 9,606149. doi: 10.3389/fcell.2021.606149.
  14. Li, G., Kong, B., Tong, Q., Li, Y., Chen, L., Zeng, J., Yu, H., Xie, X., Zhang, J., 2021. Vanillin downregulates NNMT and attenuates NNMT-related resistance to 5-fluorouracil via ROS-induced cell apoptosis in colorectal cancer cells. *Oncol Rep.* 45,110. doi: 10.3892/or.2021.8061.
  15. Liang, W., Gao, B., Fu, P., et al. 2013. The miRNAs in the pathogenesis of osteosarcoma. *Front Biosci.* 18, 788-94. doi: 10.2741/4142.
  16. Liou, G.Y., Storz, P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res,* 44, 479-496. doi:10.3109/10715761003667554
  17. Lirdprapamongkol, K., Kramb, J.P., Suthiphongchai, T., Surarit, R., Srisomsap, C., Dannhardt, G., Svasti, J., 2009. Vanillin suppresses metastatic potential of human cancer cells through PI3K inhibition and decreases angiogenesis in vivo. *J Agric Food Chem.* 57,3055–3063. doi: 10.1021/jf803366f.
  18. Millán, P.P. 2013. Visualization and analysis of biological networks. *Methods Mol Biol.* 1021,63-88. doi: 10.1007/978-1-62703-450-0\_4.
  19. Mori, Y., Terauchi, R., Shirai, T., Tsuchida, S., Mizoshiri, N., Arai, Y., Kishida, T., Fujiwara, H., Mazda, O., Kubo, T. 2017. Cell Stress Chaperones. 22,699-706. doi: 10.1007/s12192-017-0793-x.
  20. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16,55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
-

21. Oliveira, F.A., Matos, A.A., Matsuda, S.S., Buzalaf, M.A., Bagnato, V.S., Machado, M.A., Damante, C.A., Oliveira, R.C., Peres-Buzalaf, C. 2017. Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblasts. *J Photochem Photobiol B*. 169, 35-40. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.02.020.
22. Petrovic, M.M., Roschger, C., Chaudary, S., Zierer, A., Mladenović, M., Jakovljević, K., Markovic, V., Botta, B., Joksovic, M.D. 2020. Potent human dihydroorotate dehydrogenase inhibitory activity of new quinoline-4-carboxylic acids derived from phenolic aldehydes: Synthesis, cytotoxicity, lipophilicity and molecular docking studies. *Bioorg. Chem.* 105, 104373. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104373>
23. Piacenti-Silva, M., Matos, A. A., Paulin, J. V., Alavarce, R. A. d. S., de Oliveira, R. C., Graeff, C. F. 2016. Biocompatibility investigations of synthetic melanin and melanin analogue for application in bioelectronics. *Polymer International*. 65,1347-1354. doi 10.1002/pi.5192.
24. Rai, S., Kureel, A.K., Dutta, P.K., Mehrotra, G.K., 2018. Phenolic compounds based conjugates from dextran aldehyde and BSA: Preparation, characterization and evaluation of their anti-cancer efficacy for therapeutic applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 110, 425-436. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.049>.
25. Sirangelo, I., Sapio, L., Ragone, A., et al. 2020. Vanillin Prevents Doxorubicin-Induced Apoptosis and Oxidative Stress in Rat H9c2 Cardiomyocytes. *Nutrients*. 12,2317. doi:10.3390/nu12082317.
26. Song, D., Yang, K., Wang, W., Tian, R., Wang, H., Wang, K., 2020. MicroRNA-211-5p promotes apoptosis and inhibits the migration of osteosarcoma cells by targeting proline-rich protein PRR11. *Biochem Cell Biol.* 98, 258-266. doi: 10.1139/bcb-2018-0380.
27. Sun, S.; Kim, M.J.; Dibwe, D.F.; Omar, A.M.; Athikomkulchai, S.; Phrutivorapongkul, A.; Okada, T.; Tsuge, K.; Toyooka, N.; Awale, S. 2021. Anti-Austerity Activity of Thai Medicinal Plants: Chemical Constituents and Anti-Pancreatic Cancer Activities of *Kaempferia parviflora*. *Plants*.10, 229. <https://doi.org/10.3390/plants10020229>.
28. Tesfaye, S., Asres, K., Lulekal, E., Alebachew, Y., Tewelde, E., Kumarihamy, M., Muhammad, I., 2020. Ethiopian Medicinal Plants Traditionally Used for the Treatment of Cancer, Part 2: A Review on Cytotoxic, Antiproliferative, and Antitumor
-

Phytochemicals, and Future Perspective. *Molecules*. 25, 4032. doi:

10.3390/molecules25174032.

29. Urciuoli, E.; Petrini, S.; D'Oria, V.; Leopizzi, M.; Della Rocca, C.; Peruzzi, B. 2020. Nuclear Lamins and Emerin Are Differentially Expressed in Osteosarcoma Cells and Scale with Tumor Aggressiveness. *Cancers*. 12, 443.

<https://doi.org/10.3390/cancers12020443>.

30. Venturini, D. Síntese do Dímero da Vanilina, Desenvolvimento de Sonda Susceptível à Dicroísmo Circular Induzido e sua Aplicação para Caracterização de Sítios de Ligação em Albumina. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Bauru, Orientador Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes. Bauru, 2016.

31. Wang, J-Y., Wang, J-Q., Lu, S-B., 2020. miR-628-5p promotes growth and migration of osteosarcoma by targeting IFI44L. *Biochem Cell Biol*. 98, 99-105. doi: 10.1139/bcb-2019-0001.

32. Yin, M.C., Wang, H.S., Yang, X., Xu, C.Q., Wang, T., Yan, Y.J., Fan, Z.X., Ma, J.M., Ye, J., Mo, W., 2020. A Bibliometric Analysis and Visualization of Current Research Trends in Chinese Medicine for Osteosarcoma. *Chin J Integr Med*. doi: 10.1007/s11655-020-3429-4.

33. Yousuf, M., Shamsi, A., Queen, A., Shahbaaz, M., Khan, P., Hussain, A., Alajmi, M.F., Rizwanul Haque, Q.M., Imtaiyaz Hassan, M., 2021. Targeting cyclin-dependent kinase 6 by vanillin inhibits proliferation of breast and lung cancer cells: Combined computational and biochemical studies. *J Cell Biochem*. 122,897-910. doi: 10.1002/jcb.29921.

34. Zhao, Z., Jia, Q., Wu, M.S., Xie, X., Wang, Y., Song, G., Zou, C.Y., Tang, Q., Lu, J., Huang, G., Wang, J., Lin, D.C., Koeffler, H.P., Yin, J.Q., Shen, J. 2018.

Degalactotigonin, a Natural Compound from *Solanum nigrum* L., Inhibits Growth and Metastasis of Osteosarcoma through GSK3 $\beta$  Inactivation-Mediated Repression of the Hedgehog/Gli1 Pathway. *Clin Cancer Res*. 24,130-144. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0692

---



# 4 DISCUSSÃO

---



## 4 DISCUSSÃO

A Vanillina (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) é o principal componente da semente da orquídea *Vanilla planifolia*. Inicialmente a vanilina, que é mundialmente conhecida, foi utilizada como um agente aromatizante na indústria de alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos; posteriormente, pesquisas revelaram que o composto possui propriedades antimutagênicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes (KAUR et al., 2013; SIRANGELO et al., 2020). A divanilina, um homodímero da vanilina, é usado como um potenciador de sabor e sua obtenção pode ser por meio da cura de vagens de baunilha ou por oxidação da vanilina. Foi relatado que compostos diméricos, como a divanilina e a diapocinina, possuem maiores efeitos contra células tumorais do que as versões monoméricas (JANTAREE et al., 2017). Por este motivo, além da vanilina, o presente estudo teve como objetivo estudar os efeitos do dímero divanilina.

Os ensaios de MTT e CV mostram que os compostos vanilina e divanilina diminuíram a viabilidade celular da linhagem óssea tumoral UMR-106. Baseado nesses resultados, podemos supor que ambos os compostos sejam capazes de mediar a via de apoptose mitocondrial (MTT) e de agir sobre o DNA (CV) em células murinas de osteossarcoma. De fato, a análise proteômica demonstrou que existem processos biológicos relacionados à morte celular, como o “intrinsic apoptotic signaling” (no grupo vanilina versus controle) e “regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage” (no grupo divanilin versus controle). Sabe-se que vias apoptóticas intrínsecas (mitocôndria) e extrínsecas (receptor de morte) estão estreitamente envolvidas na regulação da tumorigênese. Assim, explorar as proteínas envolvidas nessas vias torna-se crucial para o estudo de tumores (MA et al., 2016).

No presente estudo constatamos que os compostos vanilina e divanilina inibem a migração celular e a formação de colônias. Ambos os processos estão intimamente envolvidos na metástase e progressão tumoral e podem ser considerados alvos terapêuticos para o tratamento do câncer. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Lirdprapamongkol e colaboradores

---

(2009) sobre o efeito da vanilina em células tumorais de pulmão, no qual a vanilina e a apocinina inibiram a migração celular. Sugere-se que os efeitos da vanilina se devem à inibição das PI3Ks (phosphoinositide 3-kinase), que são um grupo de enzimas 'lipid kinase' que desempenham um papel importante em vias de sinalização celular e são freqüentemente encontradas no câncer. A inibição da migração e formação de colônias nas células ósseas tumorais pode ser devido à capacidade dos compostos interferirem em componentes fundamentais envolvidos nesses eventos. A adesão e a migração celular requerem que a célula altere suas propriedades adesivas que incluem receptores de adesão na superfície celular, constituintes da matriz extracelular, proteínas de membrana e componentes do citoesqueleto. Os resultados do proteoma mostram que proteínas envolvidas nesses processos como: Alpha-actinin-1', Alpha-actinin-4, Annexin A2 (upregulated no grupo vanilina versus controle), Transgelin-2 (downregulated no grupo vanilina versus controle), Actin\_ cytoplasmic 1 e 2, Alpha-actinin-1, Tubulin alpha-1C chain (downregulated no grupo divanilina versus controle) mostram-se presentes com diferenças na expressão (YE et al., 2021; HU et al., 2020; KIM et al., 2021; JEONG, Y-J et al., 2020; LOPES et al., 2020)

A presente pesquisa estudou também o efeito dos compostos vanilina e divanilina na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células UMR-106. Constatamos que o efeito mais significativo se deu para a maior concentração de divanilina (300µg/mL), no qual houve uma diminuição da produção de EROs. EROs incluem radicais livres de oxigênio como o ânion superóxido ( $O_2 \bullet$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); em condições normais, a produção de EROs é equilibrada e este participa de atividades como proliferação, autofagia e apoptose; porém, quando as quantidades de EROs encontram-se desreguladas há a ativação de fatores de transcrição promotores de câncer. Nesse sentido, a produção excessiva de EROs é benéfica, pois danifica as células tumorais e este fato tornou-o um alvo interessante na busca por novos tratamentos (ZHANG et al., 2021). A vanilina e seu dímero divanilina são conhecidos por suas capacidades hora antioxidantes, hora pró-oxidantes e efeitos de aumento de EROs em células tumorais foram vistos em outros estudos, o que diverge de nossos resultados (BEZERRA et al., 2016; GOMES CASTOR et al., 2010). Os resultados da análise proteômica mostram que existem proteínas envolvidas em processos relacionados à

---

ação antioxidante como, por exemplo, a Superoxide dismutase [Cu-Zn], que se encontra superexpressa no grupo Vanilina versus Controle. No grupo Divanilina versus Controle foi encontrado o processo biológico “negative regulation of reactive oxygen species metabolic process” e “hydrogen peroxide metabolic process” (grupo Divanilina versus Vanilina), o que está de acordo com os resultados obtidos no ensaio de produção de EROs. A formação de radicais livres e estresse oxidativo induzida pela terapia antineoplásica faz parte do modo de ação dessas drogas; tendo em vista o potencial antioxidante da vanilina e divanilina, sugerimos que o uso destes como tratamento complementar adjuvante a outros antineoplásicos seja uma estratégia interessante a ser adotada pois o efeito antioxidante destes é benéfico para as células normais do organismo. A junção de antineoplásicos e antioxidantes potencializa o efeito das drogas, diminui a toxicidade induzida pelo quimioterápico e melhora na qualidade de vida do paciente (SANTOS; CRUZ, 2001; SIRANGELO et al., 2020).

O presente estudo revelou que, nos ensaios de viabilidade celular, formação de colônias e formação de EROs, os efeitos da divanilina foram mais pronunciados quando comparados com a vanilina, fato que condiz com o estudo realizado por Jantaree e colaboradores (2017). No estudo de Jantaree foi relatado que a divanilina exibiu uma maior potência do que a vanilina na inibição da invasão de células de câncer de fígado (HepG2) em concentrações menores do que as utilizadas pela vanilina. É sugerido que tanto o monômero quanto o dímero inibem as vias de sinalização FAK/PI3K/Akt, que são mediadores de efeitos anti-invasivos e antimigratórios celulares. O efeito mais pronunciado da divanilina pode ser devido ao fato de os dímeros ligam-se mais firmemente ao bolso Y397 do domínio FAK/FERM, fato revelado por estudos de ancoragem molecular (JANTAREE et al., 2017). Ressaltamos que mais estudos devem ser conduzidos para que os efeitos da divanilina sejam confirmados.

Diante dos resultados promissores dos compostos vanilina e divanilina em células ósseas tumorais murinas, sugere-se que as propriedades de ambos os compostos devam ser amplamente avaliadas na busca por novos tratamentos para o câncer. Produtos naturais bioativos tem se mostrado uma ótima alternativa para o desenvolvimento de medicações modernas, especialmente quando relacionados ao

---

câncer. Nossos resultados trazem novos conhecimentos para estudos que envolvam aplicações terapêuticas da vanilina e seu dímero divanilina em células tumorais.

## **5 CONCLUSÕES**

---



## 5 CONCLUSÕES

O presente estudo concluiu, por meio dos artigos 1 (“Activity of Brazilian Cerrado plants in tumor cell lines – A systematic review”) e artigo 2 (“Antitumor effect of vanillin and divanillin on murine osteosarcoma cells”) que:

1. O bioma brasileiro Cerrado possui uma ampla variedade de espécies com propriedades antitumorais significativas.
  2. Os compostos vanilina e divanilina diminuem a viabilidade celular das linhagens celulares normal (MC3T3-E1) e tumoral (UMR-106). Os efeitos nas células tumorais são mais acentuados;
  3. Ambos os compostos inibem a formação de colônias de UMR-106;
  4. O composto vanilina é capaz de inibir o processo migratório da linhagem UMR-106 de maneira significativa;
  5. O composto divanilina é capaz de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares da linhagem UMR-106. O composto agiu como antioxidante.
  6. Ambos os compostos possuem capacidade de interferir na expressão de proteínas envolvidas na progressão tumoral.
- 
-



# REFERÊNCIAS

---



## REFERÊNCIAS

AGBARYA, A. et al. Natural products as potential cancer therapy enhancers: A preclinical update. *SAGE Open Med.* sep. 2014.

ANGULO, P. et al. Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. *J Hematol Oncol.* v. 10, n.1, jan. 2017.

BEZERRA, D. P.; SOARES, A. K. N.; SOUSA, D.P.D. Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development. **Oxid Med Cell Longev**, 2016.

BHANDARI, J. et al. Study of phytochemical, anti-microbial, anti-oxidant, and anti-cancer properties of *Allium wallichii*. **BMC Complement Altern Med**, v. 17, n.1, feb. 2017.

BROADHEAD, M. L. et al. The Molecular Pathogenesis of Osteosarcoma: A Review. **Sarcoma**, v. 2011, 2011.

CARMONA-FONTAINE, C. et al. Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Feb. 2017.

CARRASCO-GOMEZ, R. et al. Vanillin-derived antiproliferative compounds influence Plk1 activity. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, n.21, p. 5063-9, nov. 2014.

CHEE, M. J. Y. C. et al. Bioengineering of the Plant Culture of *Capsicum frutescens* with Vanillin Synthase Gene for the Production of Vanillin. **Mol Biotechnol**, v. 59, n.1, p. 1-8, jan. 2017.

DENDULURI, S. K. et al. Molecular pathogenesis and therapeutic strategies of human osteosarcoma. **J Biomed Res.** v. 30, n.1, p. 5- 18, Aug. 2015.

DU, M. D. et al. Adriamycin resistance-associated prohibitin gene inhibits proliferation of human osteosarcoma MG63 cells by interacting with oncogenes and tumor suppressor genes. **Oncol Lett**, v. 12, n.3, p. 1994-2000, Sep.2016.

ELSHERBINYA, N. M. et al. The synergistic effect between vanillin and doxorubicin in ehrlich ascites carcinoma solid tumor and MCF-7 human breast cancer cell line. **Pathol Res Pract**, v. 212, n.9, p. 767-77, sep. 2016.

---

GOMES CASTOR, L. R.; LOCATELLI, K.A.; XIMENES, V.F. Pro-oxidant activity of apocynin radical. **Free Radic. Biol. Med**, v.48, n.12, p.1636-1643, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n.5, p. 646-674, Mar. 2011.

HO, K. et al. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. **Cancer Epidemiol**, v. 33, n.2, p. 155-60, aug. 2009.

HO, K. L. et al. Vanillin differentially affects azoxymethane-injected rat colon carcinogenesis and gene expression. **J Med Food**, v.15, n.12, p. 1096-1102, dec. 2012.

HU, D. et al. Altered Serum Annexin A2 Might Be a New Potential Diagnostic Biomarker in Human Colorectal Cancer. **Ann Clin Lab Sci**, v. 50, n. 6, p. 726-733, 2020.

JANTAREE, P. et al. Homo-Dimers of Vanillin and Apocynin Decrease Metastatic Potential of Human Cancer Cells by Inhibiting the FAK/PI3K/Akt Signaling Pathway. **J Agric Food Chem**, v.65, n.11, p. 2299-2306, 2017.

JEONG, Y-J et al. Ascofuranone suppresses invasion and F-actin cytoskeleton organization in cancer cells by inhibiting the mTOR complex 1 signaling pathway. **Cell Oncol (Dordr)**, v.43, n.5, p.793-805, 2020.

KAUR, B.; CHAKRABORTY, D. Biotechnological and Molecular Approaches for Vanillin Production: a Review. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 169, n. 4, p. 1353 – 1372, feb. 2013.

KHAN, R. et al. Advances of Salivary Proteomics in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Detection: An Update. **Proteomes**, v. 4, n.4, Dec. 2016.

KIM, H-R. et al. Transgelin-2: A Double-Edged Sword in Immunity and Cancer Metastasis. **Front Cell Dev Biol**, v.8, n. 9, p. 606149, 2021.

KUMAR, R.M.; FUCHS, B. Hedgehog signaling inhibitors as anti-cancer agents in osteosarcoma. **Cancers (Basel)**, v. 7, n.2, p. 784-94, may. 2015.

LI, Y. et al. Prognosis value of Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in patients with bone and soft tissue sarcoma: a meta-analysis. **Springerplus**, v. 5, n.1, p. 1370, Aug. 2016.

---

LIANG, J. A. et al. Vanillin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression through down-regulation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. **Mol Pharmacol**, v. 75, n.1, p. 151-7, jan. 2009.

LIRDPRAPAMONGKOL, K. et al. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. **Eur J Pharm Sci**, v. 25, n.1, p. 57-65, may 2005.

LIRDPRAPAMONGKOL, K. et al. Vanillin Suppresses Metastatic Potential of Human Cancer Cells through PI3K Inhibition and Decreases Angiogenesis in Vivo. **J. Agric. Food Chem**, v.57, n. 8, p. 3055–3063, march 2009.

LOPES, D.; MAIATO, H. The Tubulin Code in Mitosis and Cancer. **Cells**, v.9, n.11, p. 2356, 2020.

MA, Y. et al. Regulation of Intrinsic and Extrinsic Apoptotic Pathways in Osteosarcoma Cells Following Oleandrin Treatment. **Int J Mol Sci**, v.17, n.11, p.1950, 2016.

MINH, T. N. et al. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Phalaenopsis Orchid Hybrids. **Antioxidants (Basel)**, v. 5, n.3, Sep. 2016.

MOORE, D. D.; LUU, H. H. Osteosarcoma. **Cancer Treat Res**, v. 162, p. 65-92, July 2014.

SAED, G. M.; DIAMOND, M. P.; FLETCHER, N.M. Updates of the role of oxidative stress in the pathogenesis of ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v.145, n.3, p. 595-602, Feb. 2017.

SAINZ, R.M.; LOMBO, F.; MAYO, J.C. Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. **Cancers (Basel)**, v. 4, n.2, p. 442-74, Apr. 2012.

SAMPSON, V.B. et al. MicroRNAs and Potential Targets in Osteosarcoma: Review. **Front Pediatr**, v. 3, n. 69, Aug. 2015.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Rev. Bras. Cancerol**, v. 47, n. 3, p.303-308, 2001.

SHAIKH, A.B. et al. Present Advances and Future Perspectives of Molecular Targeted Therapy for Osteosarcoma. **Int J Mol Sci**, v. 17, n.4, Apr. 2016.

---

SHARMA, S. et al. Antimycobacterial mechanism of vanillin involves disruption of cell-surface integrity, virulence attributes, and iron homeostasis. **Int J Mycobacteriol**, v. 5, n.4, p. 460-468, Dec. 2016.

SHI, Y. et al. A risk signature-based on metastasis-associated genes to predict survival of patients with osteosarcoma. **J. Cell. Biochem**, v. 121, p. 3479-3490, 2020.

SILVA, L. et al. Tocotrienol and cancer metastasis. **BioFactors**, v. 42, n.2, p.149-152, mar. 2016.

SIRANGELO, I. et al. Vanillin Prevents Doxorubicin-Induced Apoptosis and Oxidative Stress in Rat H9c2 Cardiomyocytes. **Nutrients**, v.12, n.8, p. 2317, july 2020.

TAI, A. et al. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, n. 2, p. 170-7, feb. 2011.

TAKMA, D. K. ; KOREL, F. Impact of preharvest and postharvest alginate treatments enriched with vanillin on postharvest decay, biochemical properties, quality and sensory attributes of table grapes. **Food Chem**, v. 221, p. 187–195, apr. 2017.

VIŠNJEVEC A.M.; SCHWARZKOPF M. Phenolic Compounds in Poorly Represented Mediterranean Plants in Istria: Health Impacts and Food Authentication. **Molecules**. v. 25, n.16, p. 3645, 2020.

WU, C. C. et al. Combined Use of Zoledronic Acid Augments Ursolic Acid-Induced Apoptosis in Human Osteosarcoma Cells through Enhanced Oxidative Stress and Autophagy. **Molecules**, v. 21, n.12, nov. 2017.

XU, H. (Z) - 3,4,3',5'-tetramethoxystilbene, a natural product, induces apoptosis and reduces viability of paclitaxel-and cisplatin-resistant osteosarcoma cells. **J Cancer Res Ther**, v.12, n.4, oct. 2016.

YE, X. et al. Quantitative proteomic analysis of MDCK cell adhesion. **Mol Omics**. v.17, n.1, p.121-129, 2021.

YONG, B. C. et al. LDOC1 regulates Wnt5a expression and osteosarcoma cell metastasis and is correlated with the survival of osteosarcoma patients. **Tumour Biol**, v. 39, n.2, feb. 2017.

---

ZHANG, C. et al. Eldecalcitol induces apoptosis and autophagy in human osteosarcoma MG-63 cells by accumulating ROS to suppress the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Cell Signal**, v.78, 2021.

ZHANG, L. et al. Hypoxia stimulates the migration and invasion of osteosarcoma via up-regulating the NUSAP1 expression. **Open Medicine**, v.16, p. 1083–1089, 2021.

ZHANG, Y.S. et al. Bioprinting the Cancer Microenvironment. **ACS Biomater Sci Eng**, v. 2, n.10, oct. 2016.

ZHOU, Y. et al. Single-cell RNA landscape of intratumoral heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in advanced osteosarcoma. **Nat Commun**, v.11, p. 6322-6, 2020.

ZOU, J. ; ZHANG, W. ; LI, X.L. Effects of SOST Gene Silencing on Proliferation, Apoptosis, Invasion, and Migration of Human Osteosarcoma Cells Through the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. **Calcif Tissue Int**, feb. 2017.

---

---