

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA  
MEDICINA

**Investigação *in silico* dos alvos moleculares da artemisinina frente ao  
câncer**

Trabalho de Conclusão de Curso

Orientador: prof. Vinicius Barreto da Silva

**Gabriel Sousa Albuquerque**

**Maria Vitória da Silva Paula Cirilo**

GOIÂNIA

2021

## Resumo

**Introdução:** A *Artemisia annua* L. é uma planta nativa do Sudeste Asiático, conhecida por suas propriedades antimaláricas, cuja atividade ocorre devido a molécula bioativa conhecida como artemisinina. Além de propriedades antiviral, anti-inflamatória e antioxidante, a artemisinina tem se mostrado como um potencial quimioterápico em decorrência de sua alta especificidade em relação às células cancerosas, tornando-se fundamental a identificação dos mecanismos e das propriedades de ação da artemisinina. **Metodologia:** As estruturas químicas da artemisinina e dos principais fármacos antitumorais clássicos foram modeladas e foi gerado um modelo farmacofórico entre ambos a partir do programa Pharmagist. Enquanto potenciais alvos terapêuticos da artemisinina foram extraídos através dos servidores Molinspiration, PASS, SwissTargetPrediction, SEA e PharmMapper mantendo-se as características padrões dos servidores. **Resultados:** O modelo farmacofórico de maior pontuação entre a artemisinina e os fármacos antitumorais foi da classe dos Agentes Alquilantes. Dentre os potenciais alvos contra o câncer encontrados, destacam-se as enzimas do citocromo (CYP) P450 e a família das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK). Dentre os alvos observa-se que artemisinina ativa a via de sinalização da MAPK por meio da fosforilação da p38 induzindo aumento da apoptose. Além disso, é capaz de interferir no metabolismo de drogas por meio das CYPs, induzir a parada do ciclo celular em G1 e também é responsável por efeitos antiapoptóticos ao inativar procaspases. **Conclusão:** A artemisinina possui um potencial anticâncer, porém, provavelmente, não envolve os mecanismos clássicos dos antineoplásicos. A pesquisa permite inferir que existe um grande conjunto de alvos que a molécula parece influenciar.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Artemisia annua*; Antineoplásicos; Medicamentos Fitoterápicos.

## Introdução

O gênero *Artemisia*, comumente conhecido como absinto, pertencente à família *Asteraceae*, é heterogêneo e possui mais de 500 espécies com ampla distribuição geográfica, porém, a maioria das espécies cresce preferencialmente no hemisfério norte<sup>1</sup>. As folhas são alternadas, o odor é característico e aromático, enquanto o sabor é amargo<sup>2</sup>. A *Artemisia annua L.* é nativa do Sudeste Asiático, em especial da China, Coreia e Mongólia, conhecida mundialmente por suas propriedades antimaláricas<sup>3</sup>. Usada tradicionalmente na Medicina Chinesa, a planta pode ser consumida através de chás e sucos<sup>1</sup>. O uso tradicional contra febre e calafrios decorrentes da malária deve-se a uma lactona sesquiterpeno endoperóxido conhecida como artemisinina, um dos princípios ativos da planta<sup>4</sup>.

Na *Artemisia annua L.* podem ser encontrados oito grupos de produtos naturais, sendo eles os (1) monoterpenos; (2) sesquiterpenos; (3) diterpenos; (4) esteróis e triterpenos; (5) hidrocarbonetos alifáticos, álcoois, aldeídos e ácidos; (6) álcoois aromáticos, cetonas e ácidos; (7) fenilpropanóides; e (8) flavonóides<sup>5</sup>. Sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os compostos majoritários<sup>2</sup>.

Vários marcadores ativos da *Artemisia annua L.* foram identificados, cuja concentração varia de acordo com o local geográfico, material utilizado e como é tratada. Dentre os monoterpenos encontra-se 1,8-cineol,  $\alpha$ -e- $\beta$ -pineno, canfeno, borneol, cânfora, carvona, limoneno,  $\alpha$ -terpineno, mirtenol<sup>1</sup>, artemísia cetona,  $\alpha$ -mirceno, crisantenona e  $\alpha$ -copaeno<sup>5</sup>. Dentre os sesquiterpenos encontrados, terpenos com três unidades de isopreno, estão o velleral, sabineno, hidrato de cissabineno, germacreno A<sup>5</sup>, artemisinina, arteanuína B e ácido artemisínico; já entre as cumarinas, compostos derivados da benzo- $\alpha$ -pirona, encontradas na *Artemisia annua L.* destacam-se a escopolina, escopoletina<sup>6</sup> e isofraxidina<sup>5</sup>.

Dentre esses compostos foram relatadas atividades anti-inflamatória e antitumoral da isofraxidina, antifúngica da artemísia cetona, antibacteriana do velleral e antimalárica da artemisinina<sup>5</sup>. Devido a essa variedade de moléculas bioativas, a *Artemisia annua* L. tem se mostrado promissora contra uma variedade de patologias e tem sido amplamente estudada.

A *Artemisia annua* é alvo de muito interesse entre as demais espécies do gênero *Artemisia* pelo fato de possuir, exclusivamente, a artemisinina, um sesquiterpeno lactona, que é o composto ativo dos extratos de *Artemisia annua* L.<sup>3</sup>. Além de sua reconhecida atividade no tratamento da malária, a planta possui outras potenciais propriedades terapêuticas, como a antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antidiabética, antiobesidade, na artrite reumatoide e osteoartrite degenerativa, além da propriedade anticâncer, cujos estudos acerca de sua eficácia intensificaram-se desde o fim da década de 1990<sup>2-4; 7-10</sup>.

A busca por medicamentos cada vez mais potentes e eficazes no tratamento dos mais diversos tipos de câncer tem favorecido a pesquisa em fontes naturais, como por exemplo as plantas medicinais, que têm se mostrado promissoras<sup>11</sup>. A *Artemisia annua* L. é uma dessas plantas com potencial quimioterápico em decorrência de sua alta especificidade em relação às células cancerosas, seus efeitos de amplo espectro contra diferentes tipos de câncer e sua atividade sinérgica com outras drogas anticâncer<sup>12</sup>.

O mecanismo de ação da artemisinina e de seus derivados, como a diidroartemisinina, está associado com a inibição da proliferação celular, a indução da parada do ciclo celular e da apoptose<sup>13</sup>, além de inibir a angiogênese e a invasão do tecido do tumor, assim como as metástases<sup>3</sup>.

Yan et al. (2019)<sup>9</sup> mostrou que houve um aumento significativo no número de células apoptóticas precoces e tardias em uma linha de células de câncer de ovário humano que recebeu o tratamento com o extrato de artemisinina, além de que características típicas de alterações morfológicas apoptóticas, como a condensação da cromatina nuclear, fragmentação nuclear e a formação de corpos apoptóticos, foram identificados nesse grupo. Além disso, o estudo de Saeed et al. (2020)<sup>11</sup> mostrou que animais tratados com *A. annua* apresentaram uma taxa de sobrevivência significativamente maior do que o grupo de animais (com

carcinomas e sarcomas) não tratados e que a artemisinina é mais ativa em tumores de crescimento rápido do que em tumores de crescimento lento.

A eficácia do extrato de *Artemisia annua* L. pode estar atribuída não somente à artemisinina, mas também a outros compostos da planta, que também possuem potencial anticâncer. Lang et al. (2019)<sup>7</sup> revelou que o tratamento com um extrato da planta, no qual a artemisinina não foi identificada, foi capaz de diminuir seletivamente a viabilidade de linhas de células cancerosas resistentes ao tratamento, induziu a apoptose em células de câncer de mama *in vitro* e reduziu de forma dose-dependente o volume do tumor. Dentre os compostos identificados nesse extrato, estavam presentes a arteanuína B, casticina, crisosplenol D, ácido artenuico e 6,7-dimetoxicumarina.

Diante disso e da necessidade crescente de medicamentos que possam auxiliar não só no tratamento, mas na prevenção dos mais diversos tipos de câncer, o estudo acerca das propriedades farmacológicas da *Artemisia annua* L. devem ser intensificados ainda mais. Dessa forma, o principal objetivo do presente estudo destinou-se a elucidar o papel da artemisinina enquanto potencial fármaco antitumoral, assim como gerar modelos farmacofóricos entre os fármacos antitumorais clássicos e a artemisinina, além de sugerir seus principais alvos biológicos de atividade antitumoral.

## **Métodos**

As estruturas químicas da artemisinina e dos principais fármacos antineoplásicos disponíveis na prática clínica, já identificados e devidamente caracterizados na literatura<sup>14</sup>, foram modeladas em representações 2D e 3D por meio do programa computacional ACD/ChemSketch Freeware Version. Arquivos moleculares nos formatos mol e mol2 foram gerados para cada fármaco e as moléculas foram agrupadas, segundo as classes farmacológicas, através do programa Discovery Studio 2021.

Os modelos farmacofóricos entre os fármacos antitumorais e a artemisinina foram gerados a partir do programa Pharmagist<sup>15</sup>. Para criação dos modelos foi definido um número de farmacóforos de saída igual a 5, associado a um número mínimo de características farmacofóricas igual a 3. Nenhuma das

moléculas do arquivo foi estabelecida como molécula-chave. Os pesos das características farmacofóricas foram atribuídos segundo a configuração padrão do programa, ou seja, aromático igual a 3, carga formal igual a 1, acceptor e / ou doador de ligação de hidrogênio igual a 1,5 e hidrofóbico igual a 0,3.

A predição de bioatividade da artemisinina foi realizada com os servidores Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/>), PASS<sup>16</sup>, SwissTargetPrediction<sup>17</sup> e SEA<sup>18</sup>, empregando como input a descrição SMILES {C[C@@H]1CC[C@H]2[C@H](C(=O)O[C@H]3[C@@]24[C@H]1CC[C@](O3)(OO4)C)} da artemisinina e tendo como ponto de corte alvos biológicos relacionados à fisiopatologia do câncer.

No servidor Molinspiration, a classificação das prováveis atuações da artemisinina foi realizada por meio da pontuação oferecida pelo próprio programa. Nos servidores PASS e SwissTargetPrediction foram selecionadas as moléculas e/ou atividades que possuíram Pa “ativo” (a probabilidade de a atividade e/ou o substrato serem verdadeiros e apresentarem relação com a artemisinina) e similaridade acima de 70% (>0,7), respectivamente.

Potenciais alvos terapêuticos da artemisinina foram selecionados também através do servidor PharmMapper<sup>19</sup>. Foi inserido o arquivo no formato mol2 da artemisinina selecionando-se apenas os alvos de proteínas humanas e limitando a 100 alvos máximos a serem encontrados, demais configurações foram mantidas de acordo com o padrão do servidor. Dentre os alvos encontrados foram selecionados aqueles com uma pontuação de ajuste normalizada maior que 0,9.

## **Resultados**

A geração dos modelos farmacofóricos revelou que a característica de acceptor de ligação de hidrogênio foi compartilhada pela artemisinina com todas as classes de fármacos antineoplásicos. A segunda característica espacial mais compartilhada foi a aromática, que esteve presente em todas as classes, exceto nos Agentes Alquilantes. Os doadores de ligação de hidrogênio somente estão

presentes nos Antimetabólitos e Antibióticos Antitumorais, enquanto a característica hidrofóbica esteve presente apenas no modelo dos Antimitóticos.

Os resultados são exibidos na Tabela 1 e mostram que o modelo de maior pontuação, antes da inclusão da artemisinina, foi da classe dos Antibióticos Antitumorais (51.442), contendo cinco das oito moléculas do arquivo e compartilhando 10 características: aromáticos (n=3), doadores de ligações de hidrogênio (n=3) e aceptores de ligação de hidrogênio (n=4).

Ao inserir a molécula da artemisinina, o modelo de maior pontuação foi da classe dos Agentes Alquilantes (15.875), compartilhando 04 características, das quais todas são aceptores de ligações de hidrogênio. Curiosamente, esse modelo apresentou as mesmas moléculas e pontuação do modelo em que a artemisinina não estava presente.

Com relação aos Antibióticos Antitumorais e os agentes Antimitóticos, nenhuma característica foi compartilhada com a artemisinina, o que revela total dissimilaridade esteroeletrônica entre essas duas classes e a artemisinina.

Tabela 1 - Características dos Modelos Farmacofóricos obtidos através do servidor Pharmagist.

Classes Farmacológicas	Sem a artemisinina			Com a artemisinina		
	Nº de moléculas no modelo/Nº total de moléculas	Pontuação do Modelo	Nº de características	Nº de moléculas no modelo	Pontuação do Modelo	Nº de características
Antimetabólitos	7/10	23.717	4	10	14.925	3
Agentes Intercalantes	4/4	27.780	5	5	12.728	3
Antimitóticos	4/6	24.605	6	-	-	-
Agentes Alquilantes	7/15	15.875	4	8	15.875	4
Antibióticos	5/8	51.44	10	-	-	-
Antitumorais		2				

Das quatro estratégias adicionais utilizadas, três forneceram informações que auxiliam na predição de bioatividade da artemisinina contra o câncer. Através do servidor Molinspiration, foi possível prever a atuação em potencial da artemisinina como inibidor enzimático (Tabela 2).



Tabela 2 - Predição de bioatividade da artemisinina obtida através do programa Molinspiration.

<b>Cálculo das Pontuações de Bioatividade</b>	
Ligante de GPCR	-0,17
Modulador de Canal Iônico	-0,31
Inibidor de Quinase	-0,65
Ligante de Receptor Nuclear	-0,00
Inibidor de Protease	-0,19
Inibidor Enzimático	0,39

O programa PASS, que oferece nos resultados possibilidades de alvos e de atividade biológica para a artemisinina, apresentou 29 possibilidades, apresentadas nas Tabelas 3 e 4, incluindo as seguintes atividades: antineoplásico, anti-melanoma, antileucêmico, antagonista da interleucina 6, imunossupressor, agonista de apoptose. O programa também forneceu dados relativos aos seus possíveis alvos biológicos, sugerindo a atuação da artemisinina como substrato de: CYP1A2, CYP2A, CYP2A6, CYP2B, CYP2B6, CYP2H, CYP3A, CYP3A2, CYP3A4, CYP3A5, UGT1A1, UGT1A6, UGT1A9 e UDP-glucuronosiltransferase.

Tabela 3 - Possibilidades de Atividades para a artemisinina fornecidas pelo programa PASS.

<b>Pa</b>	<b>Pi</b>	<b>Atividades</b>
0,992	0,001	Anti-protozoário
0,974	0,001	Inibidor de células T
0,960	0,002	Anti-Leishmania
0,954	0,001	Anti-Plasmodium
0,903	0,001	Anti-esquistossomótico
0,895	0,002	Anti-Amoeba
0,889	0,003	Anti-melanoma
0,857	0,002	Antiparasitário
0,853	0,007	Antineoplásico
0,836	0,002	Antagonista da Interleucina 6
0,825	0,003	Imunossupressor
0,806	0,004	Antileucêmico
0,793	0,005	Antifúngico
0,789	0,009	Agonista de apoptose
0,768	0,002	Anti-Coccidiano

Tabela 4 - Prováveis alvos biológicos de ação da artemisinina fornecidos pela análise com o programa PASS.

<b>Pa</b>	<b>Pi</b>	<b>Alvos biológicos</b>
0,946	0,003	CYP2A
0,940	0,003	CYP2A6
0,929	0,002	CYP3A2
0,923	0,003	CYP2B6
0,912	0,004	CYP2B
0,887	0,007	CYP3A4
0,873	0,007	CYP3A
0,860	0,004	CYP3A5
0,853	0,004	UGT1A6
0,807	0,016	CYP2H
0,793	0,004	UGT1A9
0,796	0,007	UDP- glucuronosiltransferase
0,723	0,005	UGT1A1
0,716	0,008	CYP1A2

O servidor SwissTargetPrediction, por sua vez, ao estimar os alvos macromoleculares mais prováveis para a artemisinina, encontrou uma similaridade de 1.000 em comparação 2D entre a artemisinina e os ligantes do alvo CYP1A2 (citocromo P450 1A2), o que confirma que a artemisinina está presente nas bases de dados do programa como ligante da respectiva enzima. Em análise de similaridade 3D, dos quinze alvos mais bem pontuados, os quais apresentaram similaridade entre 0.750 e 0.905, onze estão associados a estudos revelando o seu envolvimento com a fisiopatologia do câncer: CYP1A2<sup>20,21</sup>, CDK2<sup>22,23</sup>, GRM5<sup>24</sup>, PTPN1<sup>25</sup>, CHRM1<sup>26</sup>, CRHR1<sup>27</sup>, MTNR1A<sup>28</sup> e MTNR1B<sup>29</sup>, MAPK8, 9 e 10<sup>30-32</sup>. Os resultados, juntamente com as pontuações, são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Alvos macromoleculares prováveis para a artemisinina

<b>Alvo</b>	<b>Sigla</b>	<b>Classe</b>	<b>3D: N° de molécul as compara das</b>	<b>Similarid ade</b>	<b>2D: N° de molécul as compara das</b>	<b>Similarid ade</b>
Citocromo P450 1A2	CYP1 A2	Citocro mo P450	2	0.821 – 0.791	1	1.000
Anandamid a amidohidrol ase	FAAH	Enzima	40	0.905 – 0.751	0	0
Quinase dependent e de ciclina 2/ciclina A	CDK2 CCNA 1 CCNA 2	Outra proteín a citosóli ca	59	0.880 – 0.751	0	0
Quinase dependent e de ciclina 2	CDK2	Quinas e	79	0.880 – 0.751	0	0
Receptor metabotróp ico de glutamato 5	GRM5	Recept or acopla do à família da	233	0.880 – 0.750	0	0

---

		proteín a CG				
Proteína- tirosina fosfatase 1B	PTPN1	Fosfata se	29	0.880 – 0.750	0	0
Receptor de acetilcolina muscarínic o M1	CHRM 1	Recept or acopla do à família da proteín a AG	68	0.879 – 0.751	0	0
Receptor 1 do fator de liberação de corticotropi na	CRHR 1	Recept or acopla do à família da proteín a BG	24	0.877 – 0.750	0	0
Receptor de melatonina 1A	MTNR 1A	Recept or acopla do à família da proteín a AG	296	0.877 – 0.750	0	0
Receptor de	MTNR 1B	Recept or	245	0.877 – 0.750	0	0

---

melatonina 1B		acopla do à família da proteín a AG				
Citocromo P450 19 <sup>a</sup> 1	CYP19 A1	Citocro mo P450	167	0.877 – 0.750	0	0
11-beta- hidroxiester óide desidrogen ase 1	HSD11 B1	Enzima	135	0.877 – 0.750	0	0
c-Jun N- terminal quinase 1	MAPK 8	Quinas e	124	0.876 – 0.750	0	0
c-Jun N- terminal quinase 3	MAPK 10	Quinas e	80	0.876 – 0.750	0	0
c-Jun N- terminal quinase 2	MAPK 9	Quinas e	58	0.876 – 0.750	0	0

No servidor SEA, que busca avaliar os compostos através da similaridade química e modelagem 2D, os resultados, apresentados na Tabela 6, revelaram dois alvos: CYP1A2 e Q9N6S8\_PLAFA (Cisteína proteinase falcipain 2a), sendo que esse possui atividade contra o *Plasmodium falciparum*, parasita causador de Malária P. falciparum.

Tabela 6 - Alvos Potenciais para a artemisinina fornecidos pelo programa SEA.

<b>Alvo</b>	<b>Nome</b>	<b>Descrição</b>	<b>P-valor</b>	<b>TC máximo</b>
CP1A2_HUMAN	CYP1A2	Citocromo P450 1A2	0.901	1.00
Q9N6S8_PLAFA	-	Cisteína proteínase falcipáína 2a	1.253e-23	0.36

Após análise com a estratégia do servidor PharmMapper, cujo objetivo é identificar candidatos a alvos terapêuticos para a molécula por meio de encaixe em modelos farmacofóricos, dos doze alvos encontrados segundo a metodologia, representados na Tabela 7, seis mostram correlação com a fisiopatologia do câncer, incluindo: estromelisina-1<sup>33</sup>, MAPK1<sup>34</sup>, MAPK8, MAPK10, Caspase-7<sup>35</sup> e glutathione S-transferase P<sup>36</sup>. Dentre esses alvos, observa-se que o MAPK8 e o MAPK10 também foram sugeridos como alvos da artemisinina através do servidor SwissTargetPrediction (Figura 1).

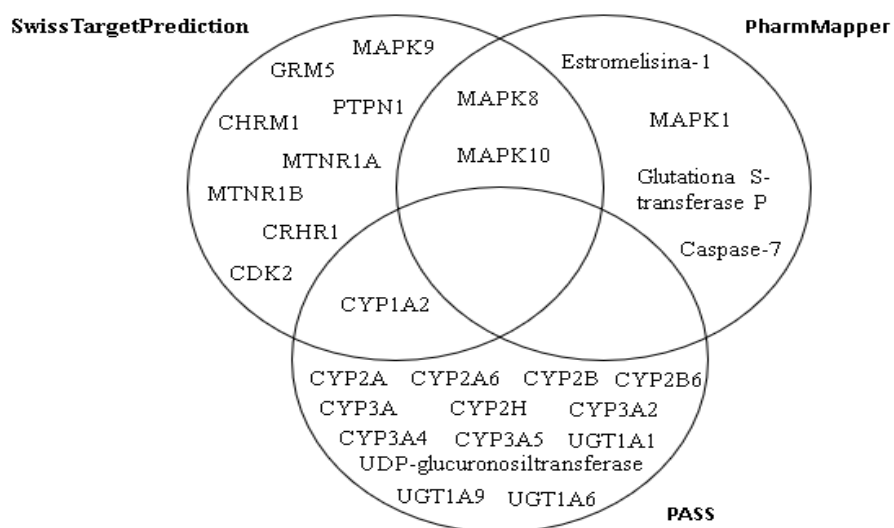
Tabela 7 - Prováveis Alvos Terapêuticos da artemisinina revelados pelo servidor PharmMapper.

Posição	PDB ID	Nome	Número de Características	Fit Score	Fit Score Normalizado	Z'-score
1	1PMV	Proteína-quinase ativada por mitógenos 10	3	2.959	0.9864	1.6219
2	1E7A	Albumina sérica	3	2.94	0.9801	1.44157
3	1P01	Colinesterase	3	2.923	0.9746	1.47654
4	1BM6	Estromelisin a-1	3	2.868	0.956	1.14731
5	1UKI	Proteína-quinase ativada por mitógenos 8	3	2.864	0.9548	1.16176
6	1R50	Fator de Complemento B	3	2.86	0.9533	1.23077
7	1IF4	Anidrase carbônica 2	3	2.815	0.9384	1.04721
8	1LBK	Glutathion S-transferase P	3	2.789	0.9298	0.997695
9	2OJI	Proteína-quinase	3	2.783	0.9277	0.974044



		ativada por mitógenos 1				
10	1PQ 9	Receptor de oxisteróis LXR-beta	3	2.77 6	0.922	0.92207 2
11	1W8 M	Peptidil- prolil cis- trans isomerase A	3	2.77 6	0.9088	0.91195 4
12	1SH K	Caspase-7	3	2.72 6	0.9088	0.67641 3

Figura 1. Interseção de potenciais alvos moleculares da artemisinina de acordo com os resultados obtidos com os servidores PASS, PharmMapper e SwissTargetPrediction.



## Discussão

A artemisinina, um dos principais compostos da espécie *Artemisia annua* L., possui, comprovadamente, propriedades anticâncer e antimalárica. Dentre os mecanismos que podem explicar a sua atividade antitumoral, as maiores evidências se concentram na interrupção da proliferação de células tumorais. A

principal hipótese é de que essa ação se dá por meio da clivagem mediada pelo ferro da ponte peróxido da artemisinina e de seus derivados, levando a produção de compostos citotóxicos com qualidades alquilantes<sup>37,38</sup>. Após a construção dos modelos farmacofóricos entre fármacos antineoplásicos e a artemisinina, a maior semelhança química foi obtida justamente com os agentes alquilantes, o que reforça a ideia da artemisinina atuar como agente citotóxico a nível de DNA.

Além disso, propõe-se também a participação da artemisinina na apoptose de células tumorais, por meio do seu acúmulo lisossomal e consequente degradação de proteínas, e na autofagia, na qual atua de maneira independente. Entretanto, sugere-se que essa sua ação possa ocorrer por meio de diferentes vias adicionais, incluindo a via intrínseca das caspases 3 e 9<sup>37,39</sup>. Reações de dano oxidativo, comprometimento da angiogênese e regulação do microambiente tumoral também são ações que podem ocorrer por meio da atividade da artemisinina<sup>40,41</sup>.

Dos alvos sugeridos na etapa de predição de bioatividade, membros de duas famílias foram apresentados em uma maior frequência: as CYPs e as MAPKs. As MAPKs (proteína-quinases ativadas por mitógenos) desempenham papel de extrema importância na proliferação, desenvolvimento e morte celular, incluindo o processo de apoptose celular, além de atuarem como moduladores inflamatórios. Wu et al. (2020)<sup>42</sup> demonstraram, através de um estudo realizado em células de Mieloma Múltiplo, que o tratamento com diidroartemisinina, um derivado da artemisinina, ativou a via de sinalização da MAPK por meio da fosforilação da p38 de modo dependente da dose e do tempo de uso do composto, induzindo aumento da apoptose e redução da autofagia. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que artemisinina apresenta potencial para atuar pelo mesmo mecanismo.

Além disso, Li et al. (2019)<sup>43</sup> constataram, por meio de um estudo realizado em células de osteossarcoma, que a artemisinina é capaz de suscitar a fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) através da ativação da via p38/MAPK. Além do mais, a análise *in vivo* evidenciou que artemisinina também é apta a impossibilitar a angiogênese por meio da

regulação da via p38/MAPK/CREB/TSP-1 (secreção de trombospondina-1), de modo a impedir, assim, a proliferação do osteossarcoma.

O desequilíbrio da sinalização por meio da via Ras/RAF/MEK/ERK, pertencentes à via das MAPKs, leva à proliferação celular, desdiferenciação e resistência à apoptose. Essa via é hiperativa, por causas mutacionais, em torno de 85% das neoplasias malignas, estando constantemente alterada nos mais diversos tipos de câncer, associando-se à progressão da doença<sup>44</sup>. Essa via tornou-se alvo de estudos com objetivos terapêuticos, que possuem como finalidade a inibição contra Ras e RAF oncogênicos, a fim de atuarem nessa via de sinalização e auxiliar no tratamento contra o câncer<sup>45,46</sup>.

A família dos citocromos P450 (CYPs), que foi numerosamente apresentada no estudo como alvo de ação da artemisinina, por sua vez, abrange um grande número de proteínas com capacidade de catalisar o metabolismo oxidativo de uma série de drogas e produtos químicos. Os poliformismos são frequentes e podem relacionar-se à resistência a medicamentos, suscetibilidade ou proteção contra algumas doenças. Alterações na expressão, que pode estar aumentada ou reduzida, em algumas dessas isoformas podem gerar ativação de procarcinógenos, sendo que CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 pareceram apresentar essa relação<sup>47</sup>.

As subfamílias CYP1, CYP2 e CYP3 desempenham papel importante na metabolização de fármacos, sendo a CYP3A a mais comumente envolvida, sugerindo o envolvimento dessas isoformas no mecanismo de resistência a drogas. Além disso, níveis aumentados da isoforma CYP3A4 parecem estar relacionados a pior prognóstico e maior progressão do tumor em casos de câncer de mama, enquanto a isoforma CYP3A5 pode apresentar-se reduzida em tecidos de carcinoma hepatocelular (CHC) como um recurso de sobrevivência do próprio câncer, visto que a atividade normal dessa CYP pode ser capaz de impedir o crescimento dessa neoplasia<sup>48</sup>.

Diversos estudos buscam avaliar o impacto da ação da artemisinina nas isoformas da família CYP. Asimus et al. (2007)<sup>49</sup> apresentaram que as atividades de CYP3A e CYP2C19 foram induzidas após a administração da artemisinina e de seus derivados, ao passo que a atividade de CYP1A2 mostrou ser induzida e

inibida por esses compostos. De modo oposto, Ericsson et al. (2014)<sup>50</sup> expuseram que os endoperóxidos da artemisinina são capazes de atuar como inibidores *in vitro* das CYPs, principalmente sobre as isoformas CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 e CYP3A4. Por fim, Simonsson et al. (2006)<sup>51</sup> demonstraram que a artemisinina é capaz de interferir no metabolismo de drogas por meio do receptor CAR, que se sucede na regulação positiva de genes como o CYP2B.

As quinases dependentes de ciclinas (CDKs), representadas no estudo por meio da CDK2, atuam no ciclo celular através da fosforilação de substratos necessários para o seu seguimento, de modo que a regulação negativa da atividade das CDKs envolvidas na fase G1 do ciclo celular vem sendo utilizada como mecanismo de diversas drogas antitumorais<sup>52</sup>. Tran et al. (2014)<sup>53</sup> apresentaram que a artemisinina foi capaz de induzir a parada do ciclo celular em G1 por meio da regulação negativa sobre CDK2, CDK4 e CDK6, mas principalmente em CDK4, em células de câncer de endométrio.

Estudos adicionais comprovam a atividade da artemisinina e de seus derivados na parada do ciclo celular por meio da parada da interação entre os promotores da CDK2 e CDK4, levando à inativação e diminuição da expressão desses genes<sup>54,55</sup>.

No presente estudo identificamos como um potencial alvo da artemisinina relacionado ao câncer a caspase-7. Chen et al. (2018)<sup>56</sup> e Ahmad et al, (2020)<sup>57</sup> observaram em seus estudos que a artemisinina inibe a proliferação de células cancerosas devido a uma parada do ciclo celular e apoptose com participação de enzimas desta família. Observou-se um aumento de caspases devido à capacidade da artemisinina de inibir a fosfo-AKT que é responsável por efeitos antiapoptóticos ao inativar procaspases.

A estromelisina-1, também conhecida como metaloproteinase-3 da matriz, é uma enzima codificada pelo gene MMP3 conhecida por lisar o colágeno da membrana basal e induzir a síntese de outras metaloproteínas<sup>58</sup>. A superexpressão do gene MMP3 está positivamente associada à neoplasia, incluindo o câncer de mama e próstata<sup>59</sup>. Frieling et al. (2020)<sup>58</sup> observou em seu estudo que a ablação de MMP-3 sugeriu diminuição da sinalização mitogênica, além disso, ao ser suprimida transitoriamente ocorreu diminuição de

ARK fosforilada. Dessa forma, os dados oferecem indícios de que a artemisinina possui atividade antineoplásica por estimular a apoptose ao inibir a fosfo-ARK.

As glutathione S-transferases (GSTs) são uma família de enzimas importantes para a desintoxicação de compostos endógenos e exógenos. Estudos já demonstraram que exibem uma atividade antiapoptótica por meio de interações com c-Jun N-terminal quinase (JNK) inativando-as, o que pode explicar altos níveis de glutathione S-transferase P (GSTP) em células tumorais resistentes a drogas<sup>60</sup>. Já foi relatado na literatura que a artemisinina inibe a atividade de algumas GSTs<sup>61,62</sup>, este mecanismo pode estar relacionado à apoptose de células tumorais.

A família das UDP-glucuronosiltransferase, as quais incluem os alvos encontrados UGT1A1, UGT1A6 e UGT1A9, são responsáveis pela detoxicação de compostos exógenos, incluindo carcinógenos<sup>63</sup>. É provável que a diminuição dessas enzimas aumente a suscetibilidade de iniciação carcinogênica. A expressão de UGTs é variável dependendo do câncer, podendo estar diminuída em alguns, mas elevada em outros, como os de próstata, pâncreas e pulmão, indicando diversos padrões de regulação da expressão de UGT em tumores<sup>64</sup>. Apesar da ligação dessas enzimas em processos neoplásicos, não foi encontrado nenhuma ponte concreta que as ligue à artemisinina na literatura.

O receptor metabotrópico de glutamato 5 (GRM5) foi encontrado em nossos estudos como um potencial alvo para a artemisinina. Os receptores metabotrópicos de glutamato (GRMs) são receptores acoplados à proteína G, ativados pelo glutamato e estimulam segundos mensageiros, como AKT e MAPK. A expressão mais alta de GRM5 foi relacionada ao carcinoma de células renais<sup>25</sup>. Somado a isso, Wu, et al. (2012)<sup>65</sup> observou que a inativação de GRM5 suprime a proliferação de células de câncer ósseo e hepático, bloqueando as vias da MAPK. Apesar de não haver estudos relacionando diretamente a artemisinina ao GRM5, observa-se que ela interfere nos segundos mensageiros AKT e MAPK.

A PTPN1, pertencente à família das proteínas tirosina fosfatases (PTPs), é uma tirosina fosfatase não receptora que está envolvida em processos de proliferação celular, sobrevivência, migração, metabolismo e respostas imunes.

Chen J. et al. (2020)<sup>66</sup>, ao avaliarem os diferentes tipos de câncer do trato digestivo, encontraram que diversos PTPNs estavam relacionados, além de que PTPN1 estava altamente expresso em células de câncer de esôfago. Nunes-Xavier et al. (2019)<sup>67</sup> relataram que a diminuição de PTPN1 em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano (NH) procedeu em aumento da fosforilação da tirosina e proliferação celular, associando-se a metástases e mau prognóstico neste tipo de câncer, além de sugerirem o PTPN1 como biomarcador do NH.

Em adição, St-Germain et al. (2015)<sup>68</sup> divulgaram que as PTPN1 e PTPN2 são capazes de modular a fosforilação de FGFR3 (receptor 3 do fator de crescimento dos fibroblastos), cuja expressão aumentada está associada a neoplasias malignas, e que a perda dessa capacidade pode culminar em sua ativação. Por último, a degradação da PTPN1 por meio da calpaína 1, um promotor da progressão do câncer, está associada a pior comportamento na neoplasia e resistência medicamentosa em casos de adenocarcinoma pulmonar<sup>69</sup>.

O receptor muscarínico de acetilcolina M1 (CHRM1) é expresso no sistema nervoso e em órgãos de atuação dos neurônios parassimpáticos, acoplado-se à proteína Gq quando ativado. Yin et al. (2018)<sup>27</sup> revelaram que o CHRM1 é capaz de atuar inibindo a migração e invasão do câncer de próstata por meio da sinalização hedgehog, que envolve hedgehog sônico (SHH), patch 1 (PTCH1), smoothened (SMO) e proteína de dedo de zinco (GLI1), que contribui para a hostilidade do tumor, por meio da estimulação da proliferação celular, indução da angiogênese e inibição da apoptose. Ademais, Renz et al. (2018)<sup>70</sup> divulgaram que a via de sinalização do CHRM1 é capaz de impedir o desenvolvimento do tumor pancreático através da regulação negativa de MAPK e PIK3/AKT (fosfoinosítídeo 3-quinase; importante para o crescimento e metabolismo celular) nessas células tumorais.

Os CRHRs são receptores do hormônio liberador de corticotropinas (CRH), de modo que CRHR1, sugerido como alvo da artemisinina por este estudo, está expresso, principalmente, no cérebro, induzindo o hormônio corticotrópico adrenal. Lee et al. (2021)<sup>71</sup> indicaram que a deficiência de CRHR1 é capaz de impedir a progressão do câncer, por meio da inibição da expressão

da ciclooxigenase (COX) 2 e da regulação positiva da fosfolipase A2, uma promotora e uma supressora de tumor, respectivamente, em camundongos com câncer de cólon. Resultados semelhantes foram apresentados por Liu et al. (2014)<sup>72</sup>, que expuseram que a deficiência de CRHR1 auxilia para o alívio da tumorigênese associada à colite (TAC), além de que seu papel pró-inflamatório e pró-tumorigênico na TAC deve-se ao estímulo para macrófagos liberarem citocinas inflamatórias e levar à ativação dos sinais NFkB-BCL2 e STAT3, que resultam na diminuição da apoptose e o incentivo à proliferação celular tumoral.

Os receptores de melatonina MTNR1A e MTNR1B são os principais responsáveis por mediar os efeitos da melatonina no organismo humano. A melatonina tem importantes propriedades oncostáticas, por meio de mecanismos dependentes e independentes de receptor<sup>73</sup>. Os receptores de melatonina participam da inibição da adenil ciclase e do AMP cíclico, como consequência ocorre uma redução na captação de ácido linoléico, disto resulta seus efeitos antiproliferativos, estão associados ainda à atividade antioxidante, regulação da apoptose e inibição da angiogênese<sup>74,75</sup>. Estudos sugerem que polimorfismos nos genes desses receptores estão relacionados ao câncer de mama<sup>76</sup>, tal fato é devido a ligação à proteína reguladora de Ca<sup>2+</sup> calmodulina que eleva a fosfoativação de uma série de fatores que estão envolvidos na modulação da proliferação de células do câncer de mama<sup>77</sup>. Apesar de encontrarmos esses receptores em nosso estudo, eles mostram-se fracamente relacionados com os mecanismos antineoplásicos da artemisinina.

## **Conclusão**

A eficácia da artemisinina contra neoplasias malignas é evidente e os resultados encontrados apontam que essa atividade não deve ocorrer majoritariamente por mecanismos semelhantes aos dos fármacos antineoplásicos citotóxicos disponíveis na prática clínica. Por outro lado, inúmeros alvos moleculares relacionados com a fisiopatologia dos mais diversos tipos de câncer foram apontados como possíveis alvos de ação da artemisinina, com destaque para a família dos CYPs e MAPKs. Além disso, para alguns dos

alvos sugeridos não foram encontrados trabalhos na literatura que os relacionassem com a artemisinina, reforçando, então, que possam ser objetos de pesquisas futuras que busquem explorar o mecanismo de ação do princípio ativo em questão. Dessa forma, a atuação da artemisinina contra o câncer parece ocorrer de forma alvo-dirigida através de mecanismos múltiplos, o que reforça a artemisinina como um excelente ponto de partida para a otimização de fármacos com propriedades antitumorais.

## **Referências**

1. Septembre-Malaterre A, Rakoto ML, Marodon C, Bedoui Y, Nakab J, Simon E, et al. *Artemisia annua*, a traditional plant brought to light. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):1–34.
2. Bilia AR, Santomauro F, Sacco C, Bergonzi MC, Donato R. Essential Oil of *Artemisia annua* L.: An Extraordinary Component with Numerous Antimicrobial Properties. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014; 2014:159819.
3. Isani G, Bertocchi M, Andreani G, Farruggia G, Cappadone C, Salaroli R, et al. Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* L. and Pure Artemisinin on the D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line. Rijo P, editor. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2019; 2019:1615758.
4. Feng X, Cao S, Qiu F, Zhang B. Traditional application and modern pharmacological research of *Artemisia annua* L. *Pharmacol Ther*. 2020 Dec; 216:107650.
5. Mirbehbahani FS, Hejazi F, Najmoddin N, Asefnejad A. *Artemisia annua* L. as a promising medicinal plant for powerful wound healing applications. *Prog Biomater*. 2020 Sep;9(3):139–51.
6. Fu C, Yu P, Wang M, Qiu F. Phytochemical analysis and geographic assessment of flavonoids, coumarins and sesquiterpenes in *Artemisia annua* L.



based on HPLC-DAD quantification and LC-ESI-QTOF-MS/MS confirmation. *Food Chem.* 2020 May; 312:126070.

7. Lang SJ, Schmiech M, Hafner S, Paetz C, Steinborn C, Huber R, et al. Antitumor activity of an *Artemisia annua* herbal preparation and identification of active ingredients. *Phytomedicine* [Internet]. 2019; 62:152962.

8. Park CY, Choi E, Yang HJ, Ho SH, Park SJ, Park KM, et al. Efficacy of *Artemisia annua* L. extract for recovery of acute liver failure. *Food Sci Nutr.* 2020;8(7):3738–49.

9. Yan L, Xiong C, Xu P, Zhu J, Yang Z, Ren H, et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of A polysaccharide from *Artemisia annua* L. (Huang Huahao). *Carbohydr Polym* [Internet]. 2019;213(January):361–9.

10. Zhigzhitzhapova S V., Dylenova EP, Gulyaev SM, Randalova TE, Taraskin V V., Tykheev ZA, et al. Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. *Nat Prod Res* [Internet]. 2020;34(18):2668–71.

11. Saeed MEM, Breuer E, Hegazy M-EF, Efferth T. Retrospective study of small pet tumors treated with *Artemisia annua* and iron. *Int J Oncol* [Internet]. 2019/11/25. 2020 Jan;56(1):123–38.

12. Lam NS, Long X, Wong JW, Griffin RC, Doery JCG. Artemisinin and its derivatives: A potential treatment for leukemia. *Anticancer Drugs.* 2019;30(1):1–18.

13. Liu T, Guo J, Wang T, Zhang S, Yu X, Hou C, et al. Network pharmacology-based analysis of mechanisms of the anti-hepatocellular carcinoma effect by dihydroartemisinin. *Discov Med.* 2019 Sep;28(153):139–47.

14. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Bases do Tratamento. Ações Enferm para o Control do Câncer. 2008;488.
15. Schneidman-Duhovny D, Dror O, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul;36(Web Server issue): W223-8.
16. Filimonov DA, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik A V., Druzhilovskii DS, Pogodin P V., et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. *Chem Heterocycl Compd.* 2014;50(3):444–57.
17. Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. *Bioinformatics.* 2013;29(23):3073–9.
18. Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, Ernsberger P, Irwin JJ, Shoichet BK. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nat Biotechnol.* 2007;25(2):197–206.
19. Wang X, Shen Y, Wang S, Li S, Zhang W, Liu X, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jul;45(W1): W356–60.
20. Imene A, Maurice AJ, Arij M, Sofia P, Saad S. Breast Cancer Association with CYP1A2 Activity and Gene Polymorphisms--a Preliminary Case-control Study in Tunisia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(8):3559–63.
21. Sun WX, Chen YH, Liu ZZ, Xie JJ, Wang W, Du YP, et al. Association between the CYP1A2 polymorphisms and risk of cancer: a meta-analysis. *Mol Genet Genomics.* 2015;290(2):709–25.

22. Jin X, Ge L-P, Li D-Q, Shao Z-M, Di G-H, Xu X-E, et al. LncRNA TROJAN promotes proliferation and resistance to CDK4/6 inhibitor via CDK2 transcriptional activation in ER+ breast cancer. *Mol Cancer*. 2020 May;19(1):87.
23. Teng M, Jiang J, He Z, Kwiatkowski NP, Donovan KA, Mills CE, et al. Development of CDK2 and CDK5 Dual Degradator TMX-2172. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2020 Aug;59(33):13865–70.
24. Huang C-Y, Hsueh Y-M, Chen L-C, Cheng W-C, Yu C-C, Chen W-J, et al. Clinical significance of glutamate metabotropic receptors in renal cell carcinoma risk and survival. *Cancer Med*. 2018 Dec;7(12):6104–11.
25. Jin T, Li D, Yang T, Liu F, Kong J, Zhou Y. PTPN1 promotes the progression of glioma by activating the MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways and is associated with poor patient survival. *Oncol Rep*. 2019 Aug;42(2):717–25.
26. Yin Q-Q, Xu L-H, Zhang M, Xu C. Muscarinic acetylcholine receptor M1 mediates prostate cancer cell migration and invasion through hedgehog signaling. *Asian J Androl*. 2018;20(6):608–14.
27. Sato N, Takagi K, Suzuki T, Miki Y, Tanaka S, Nagase S, et al. Immunolocalization of corticotropin-releasing hormone (CRH) and its receptors (CRHR1 and CRHR2) in human endometrial carcinoma: CRHR1 as a potent prognostic factor. *Int J Gynecol cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc*. 2014 Nov;24(9):1549–57.
28. Lin Y-W, Wang S-S, Wen Y-C, Tung M-C, Lee L-M, Yang S-F, et al. Genetic Variations of Melatonin Receptor Type 1A are Associated with the Clinicopathologic Development of Urothelial Cell Carcinoma. *Int J Med Sci*. 2017;14(11):1130–5.

29. Su S-C, Ho Y-C, Liu Y-F, Reiter RJ, Chou C-H, Yeh C-M, et al. Association of melatonin membrane receptor 1A/1B gene polymorphisms with the occurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Oct;8(49):85655–69.
30. Slattery ML, Lundgreen A, Wolff RK. MAP kinase genes and colon and rectal cancer. *Carcinogenesis*. 2012 Dec;33(12):2398–408.
31. Wang Z-X, Zhao Y, Wang Y-B, Zhang Q, Zou Q-X, Liang F-H, et al. CircRNF20 aggravates the progression of non-small-cell lung carcinoma by activating MAPK9. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Oct;24(19):9981–9.
32. Gao Y, Wang Y, Wang X, Zhao C, Wang F, Du J, et al. miR-335-5p suppresses gastric cancer progression by targeting MAPK10. *Cancer Cell Int*. 2021 Jan;21(1):71.
33. Krishnaveni D, Bhayal AC, Shravan KP, Jyothy A, Pratibha N, Venkateshwari A. Heterozygosity of stromelysin-1 (rs3025058) promoter polymorphism is associated with gastric cancer. *Indian J Cancer*. 2015;52(2):251–4.
34. Huang B, Zhou D, Huang X, Xu X, Xu Z. Silencing circSLC19A1 Inhibits Prostate Cancer Cell Proliferation, Migration and Invasion Through Regulating miR-326/MAPK1 Axis. *Cancer Manag Res*. 2020; 12:11883–95.
35. Cui R, Kim T, Fassan M, Meng W, Sun H-L, Jeon Y-J, et al. MicroRNA-224 is implicated in lung cancer pathogenesis through targeting caspase-3 and caspase-7. *Oncotarget*. 2015 Sep;6(26):21802–15.
36. Li X-M, Yu X-W, Yuan Y, Pu M-Z, Zhang H-X, Wang K-J, et al. Glutathione S-transferase P1, gene-gene interaction, and lung cancer susceptibility in the Chinese population: An updated meta-analysis and review. *J Cancer Res Ther*. 2015;11(3):565–70.

37. Konstat-Korzenny E, Ascencio-Aragón JA, Niezen-Lugo S, Vázquez-López R. Artemisinin and Its Synthetic Derivatives as a Possible Therapy for Cancer. *Med Sci (Basel, Switzerland)*. 2018 Feb;6(1).
38. Chen G-Q, Benthani FA, Wu J, Liang D, Bian Z-X, Jiang X. Artemisinin compounds sensitize cancer cells to ferroptosis by regulating iron homeostasis. *Cell Death Differ*. 2020 Jan;27(1):242–54.
39. Hooft van Huijsduijnen R, Guy RK, Chibale K, Haynes RK, Peitz I, Kelter G, et al. Anticancer properties of distinct antimalarial drug classes. *PLoS One*. 2013;8(12): e82962.
40. Alven S, Aderibigbe BA. Nanoparticles Formulations of Artemisinin and Derivatives as Potential Therapeutics for the Treatment of Cancer, Leishmaniasis and Malaria. *Pharmaceutics*. 2020 Aug;12(8).
41. Slezakova S, Ruda-Kucerova J. Anticancer Activity of Artemisinin and its Derivatives. *Anticancer Res*. 2017 Nov;37(11):5995–6003.
42. Wu X, Liu Y, Zhang E, Chen J, Huang X, Yan H, et al. Dihydroartemisinin Modulates Apoptosis and Autophagy in Multiple Myeloma through the P38/MAPK and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 2020; 2020:6096391.
43. Li Z, Ding X, Wu H, Liu C. Artemisinin inhibits angiogenesis by regulating p38 MAPK/CREB/TSP-1 signaling pathway in osteosarcoma. *J Cell Biochem*. 2019 Feb.
44. Yaeger R, Corcoran RB. Targeting Alterations in the RAF-MEK Pathway. *Cancer Discov*. 2019 Mar;9(3):329–41.

45. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*. 2020 Jan;9(1).
46. Yuan J, Dong X, Yap J, Hu J. The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2020 Aug;13(1):113.
47. Elfaki I, Mir R, Almutairi FM, Duhier FMA. Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 Aug;19(8):2057–70.
48. Lolodi O, Wang Y-M, Wright WC, Chen T. Differential Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and its Implication in Drug Discovery. *Curr Drug Metab*. 2017;18(12):1095–105.
49. Asimus S, Elsherbiny D, Hai TN, Jansson B, Huong N V, Petzold MG, et al. Artemisinin antimalarials moderately affect cytochrome P450 enzyme activity in healthy subjects. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007 Jun;21(3):307–16.
50. Ericsson T, Sundell J, Torkelsson A, Hoffmann K-J, Ashton M. Effects of artemisinin antimalarials on Cytochrome P450 enzymes in vitro using recombinant enzymes and human liver microsomes: potential implications for combination therapies. *Xenobiotica*. 2014 Jul;44(7):615–26.
51. Simonsson USH, Lindell M, Raffalli-Mathieu F, Lannerbro A, Honkakoski P, Lang MA. In vivo and mechanistic evidence of nuclear receptor CAR induction by artemisinin. *Eur J Clin Invest*. 2006 Sep;36(9):647–53.
52. Willoughby JAS, Sundar SN, Cheung M, Tin AS, Modiano J, Firestone GL. Artemisinin blocks prostate cancer growth and cell cycle progression by disrupting Sp1 interactions with the cyclin-dependent kinase-4 (CDK4) promoter and inhibiting CDK4 gene expression. *J Biol Chem*. 2009 Jan;284(4):2203–13.

53. Tran KQ, Tin AS, Firestone GL. Artemisinin triggers a G1 cell cycle arrest of human Ishikawa endometrial cancer cells and inhibits cyclin-dependent kinase-4 promoter activity and expression by disrupting nuclear factor- $\kappa$ B transcriptional signaling. *Anticancer Drugs*. 2014 Mar;25(3):270–81.

54. Du X-X, Li Y-J, Wu C-L, Zhou J-H, Han Y, Sui H, et al. Initiation of apoptosis, cell cycle arrest and autophagy of esophageal cancer cells by dihydroartemisinin. *Biomed Pharmacother*. 2013 Jun;67(5):417–24.

55. Tin AS, Sundar SN, Tran KQ, Park AH, Poindexter KM, Firestone GL. Antiproliferative effects of artemisinin on human breast cancer cells requires the downregulated expression of the E2F1 transcription factor and loss of E2F1-target cell cycle genes. *Anticancer Drugs*. 2012 Apr;23(4):370–9.

56. Chen J, Zhang L, Hao M. Effect of artemisinin on proliferation and apoptosis-related protein expression in vivo and in vitro. *Saudi J Biol Sci*. 2018 Nov;25(7):1488–93.

57. Ahmad F, Sarder A, Gour R, Karna SKL, Arora P, Kartha KPR, et al. Inhibition of prostate cancer cell line (PC-3) by anhydrodihydroartemisinin (ADHA) through caspase-dependent pathway. *EXCLI J*. 2020; 19:613–9.

58. Frieling JS, Li T, Tauro M, Lynch CC. Prostate cancer-derived MMP-3 controls intrinsic cell growth and extrinsic angiogenesis. *Neoplasia*. 2020 Oct;22(10):511–21.

59. Padala C, Tupurani MA, Puranam K, Gantala S, Shyamala N, Kondapalli MS, et al. Synergistic effect of collagenase-1 (MMP1), stromelysin-1 (MMP3) and gelatinase-B (MMP9) gene polymorphisms in breast cancer. *PLoS One*. 2017;12(9): e0184448.

60. Tew KD, Townsend DM. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Dec;17(12):1728–37.
61. Srivastava P, Puri SK, Kamboj KK, Pandey VC. Glutathione-S-transferase activity in malarial parasites. *Trop Med Int Health*. 1999 Apr;4(4):251–4.
62. Mukanganyama S, Widersten M, Naik YS, Mannervik B, Hasler JA. Inhibition of glutathione S-transferases by antimalarial drugs possible implications for circumventing anticancer drug resistance. *Int J cancer*. 2002 Feb;97(5):700–5.
63. Landerer S, Kalthoff S, Paulusch S, Strassburg CP. UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms affect diethylnitrosamine-induced carcinogenesis in humanized transgenic mice. *Cancer Sci*. 2020 Nov;111(11):4266–75.
64. Allain EP, Rouleau M, Lévesque E, Guillemette C. Emerging roles for UDP-glucuronosyltransferases in drug resistance and cancer progression. *Br J Cancer*. 2020 Apr;122(9):1277–87.
65. Wu Y Le, Wang NN, Gu L, Yang HM, Xia N, Zhang H. The suppressive effect of metabotropic glutamate receptor 5 (mGlu5) inhibition on hepatocarcinogenesis. *Biochimie*. 2012 Nov;94(11):2366–75.
66. Chen J, Zhao X, Yuan Y, Jing J-J. The expression patterns and the diagnostic/prognostic roles of PTPN family members in digestive tract cancers. *Cancer Cell Int*. 2020;20:238.
67. Nunes-Xavier CE, Aurtinetxe O, Zaldumbide L, López-Almaraz R, Erramuzpe A, Cortés JM, et al. Protein tyrosine phosphatase PTPN1 modulates cell growth and associates with poor outcome in human neuroblastoma. *Diagn Pathol*. 2019 Dec;14(1):134.



68. ST-GERMAIN, J. R. et al. Differential regulation of FGFR3 by PTPN1 and PTPN2. *Proteomics*, v. 15, n. 2–3, p. 419–433, jan. 2015.
69. Chen Y, Tang J, Lu T, Liu F. CAPN1 promotes malignant behavior and erlotinib resistance mediated by phosphorylation of c-Met and PIK3R2 via degrading PTPN1 in lung adenocarcinoma. *Thorac cancer*. 2020 Jul;11(7):1848–60.
70. Renz BW, Tanaka T, Sunagawa M, Takahashi R, Jiang Z, Macchini M, et al. Cholinergic Signaling via Muscarinic Receptors Directly and Indirectly Suppresses Pancreatic Tumorigenesis and Cancer Stemness. *Cancer Discov*. 2018 Nov;8(11):1458–73.
71. Lee Y, Ma EL, Patel M, Kim G, Howe C, Pothoulakis C, et al. Corticotropin-Releasing Hormone Receptor Alters the Tumor Development and Growth in *Apcmin/+* Mice and in a Chemically-Induced Model of Colon Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan;22(3).
72. Liu Y, Fang X, Yuan J, Sun Z, Li C, Li R, et al. The role of corticotropin-releasing hormone receptor 1 in the development of colitis-associated cancer in mouse model. *Endocr Relat Cancer*. 2014 Aug;21(4):639–51.
73. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther*. 2008 Sep;7(3):189–203.
74. Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang J-J, Xu D-P, et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*. 2017 Jun;8(24):39896–921.
75. Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, et al. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor

1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2008 Jul;99(7):1390–400.

76. Deming SL, Lu W, Beeghly-Fadiel A, Zheng Y, Cai Q, Long J, et al. Melatonin pathway genes and breast cancer risk among Chinese women. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Apr;132(2):693–9.

77. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan D-X, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang S-F, et al. Melatonin, a Full-Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2017 Apr;18(4).