

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2027.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Gabriela Abreu Botelho

**Perspectivas em Aminas Biogênicas: ensaio translacional
in vitro e *in silico* na interação do extrato da folha da
Bergamota no Osteossarcoma.**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha
Coorientadora: Profa. Dra. Camila Renata Corrêa Camacho

**Botucatu
2025**

Gabriela Abreu Botelho

Perspectivas em Aminas Biogênicas: ensaio
translacional *in vitro* e *in silico* na interação do
extrato de folha da Bergamota no Osteossarcoma.

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha
Coorientadora: Profa. Dra. Camila Renata Corrêa Camacho

Botucatu
2025

B748p Botelho, Gabriela Abreu
Perspectivas em Aminoácidos Biogênicos : ensaio translacional in vitro e in silico na interação do extrato da folha de Bergamota no Osteossarcoma. / Gabriela Abreu Botelho. -- Botucatu, 2025
80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientadora: Noeme Sousa Rocha
Coorientadora: Camila Renata Corrêa Camacho

1. Biogenic Amines. 2. Citrus. 3. Oncology. 4. Osteosarcoma. 5. Cell Culture. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Título da dissertação: “**Perspectivas em Aminas Biogênicas: ensaio translacional *in vitro* e *in silico* na interação do extrato da folha da Bergamota no Osteossarcoma**”.

Impacto Científico esperado: Compartilhar um estudo com base nas diretrizes de Saúde Única, utilizando Extrato Natural da Folha de um Cítrus, rico em compostos bioativos, sem efeitos colaterais, como potencial terapêutico fitoterápico na inibição de células cancerígenas, com potencial de ser um coadjuvante nos tratamentos oncológicos.

Impacto Social: Retornar a sociedade, uma pesquisa científica de qualidade, na busca de corroborar aos trabalhos presentes na literatura, traduzir a linguagem acadêmica tornando-a acessível a todos, vislumbrar possibilidades futuras nos auxílios aos protocolos terapêuticos oncológicos convencionais, redução e ressignificação no uso de tratamentos alopáticos químicos convencionais, mostrando uma visão biotecnológica no uso das plantas como adjuvantes.

Impacto Econômico: Demonstrar que a utilização de subprodutos biodegradáveis descartáveis pela indústria é viável na diminuição de resíduos, na criação de potenciais fármacos com custo-benefício significativo.

Mestranda: Gabriela Abreu Botelho

Orientadora: Noeme Sousa Rocha

Co-orientadora: Camila Renata Correa

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Dissertation title: “Perspectives on Biogenic Amines: *in vitro* and *in silico* translational assay on the interaction of Bergamot leaf extract in Osteosarcoma”.

Expected Scientific Impact: To share a study based on the Single Health guidelines, using natural citrus leaf extract, rich in bioactive compounds, with no side effects, as a potential herbal therapy to inhibit cancer cells, with the potential to be an adjunct in cancer treatments.

Expected social impact: To return quality scientific research to society, in an attempt to corroborate the work in the literature, to translate academic language so that it is accessible to all, to envision future possibilities in aiding conventional cancer therapeutic protocols, to reduce and give new meaning to the use of conventional chemical allopathic treatments, showing a biotechnological vision in the use of plants as adjuvants.

Expected economic impact: To demonstrate that the use of disposable biodegradable by-products by industry is viable in reducing waste, creating potential drugs with significant cost-benefit.

Master's student: Gabriela Abreu Botelho

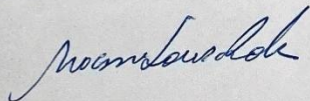
Supervisor: Noeme Sousa Rocha

Co-advisor: Camila Renata Correa

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GABRIELA ABREU BOTELHO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 27 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 10h, no(a) Anfiteatro Prof. Emérito Antonio Carlos Cicogna (Bloco V) - Unipex - FM/Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GABRIELA ABREU BOTELHO, intitulada **Perspectivas em Aminoácidos Biogênicos: Ensaio Translacional *in vitro* e *in silico* na Interação do Extrato da Folha de Bergamota no Osteossarcoma**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. NOEME SOUSA ROCHA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Veterinária / FMVZ/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. FÁBIO RODRIGUES FERREIRA SEIVA (Participação Presencial) do(a) Depto de Ciências Químicas e Biológicas / IB/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. DIJON HENRIQUE SALOMÉ DE CAMPOS (Participação Presencial) do(a) Centro Universitário Planalto do Distrito Federal. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. NOEME SOUSA ROCHA



Dedicatória

A Deus, por me sustentar em todas as fases da minha vida.

Aos meus familiares, em especial as minhas avós, por todo apoio, orações e suporte.

A minha Tia Lila, pelo exemplo e referência de dedicação a vida acadêmica.

Aos meus melhores amigos, que se fazem presente em todos os momentos.

As minhas orientadoras e orientadores da vida acadêmica, bem como os professores colaboradores que tornaram possível a realização de todas as etapas do projeto e as facilites utilizadas.

Ao meu avô Zé (*In memoriam*), que foi acometido por essa triste neoplasia estudada neste projeto.

Aos projetos de extensão desenvolvidos durante este período de mestrado, em especial ao Médicos da Alegria que tem sido força motora no propósito do aprofundamento dos estudos com o olhar carinhoso e primordial na humanização dos cuidados.

Eu, dedico.

Agradecimento

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasil.

A Parceria com Laboratório de Química e Bioquímica e ao Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Anatomia do IBB UNESP de Botucatu, junto aos Professores Fabio R. F. Seiva e Gustavo Chuffa, com todo apoio da Mestre Roberta Carvalho, nas etapas desenvolvidas.

Ao apoio da empresa CROP-Labs na Realização do Ensaio de Citotoxicidade Celular por Vermelho Neutro diferencial regulamentado pela ANVISA.

Aos colegas Tainá Dorte e Gabriel Caxali, do Laboratório Interactions and Cancer Biology (ICB LAB) – BGA/GEN. - IBB, por todo apoio e paciência nos processamentos de dados da bioinformática.

A todos colegas da Salinha do IB que “adotoram” uma estranha no ninho.

Ao Laboratório Redox da UNIPEX, A Professora Camila minha coorientadora e toda equipe, por me ensinar e instruir a ir atrás e fazer a pesquisa aplicada.

Eu, agradeço.

Epígrafe

*“Diante da vastidão do tempo e a imensidão do universo, é um imenso prazer
dividir um planeta e uma época com você”.*
- Carl Sagan

RESUMO

Introdução: O Osteossarcoma é uma neoplasia altamente maligna que afeta cães e humanos sem predileções. O uso de terapias combinadas na Oncologia e a medicina de precisão é uma realidade nos tratamentos. O Extrato da folha da Bergamota, demonstra valiosa fonte de compostos bioativos atuantes no auxílio de diversas comorbidades. O uso de infusões e extratos ricos em compostos bioativos atuam de forma benéfica ao organismo reduzindo os índices de inflamação e estresse oxidativo. **Objetivo:** Avaliar a interação do Extrato da Folha de Bergamota (*Citrus Bergamia*) sob células de Osteossarcoma Canino e Humano *in vitro* com enfoque na Citotoxicidade celular e verificar via Bioinformática *in silico* as proteínas presentes no Osteossarcoma Humano, Canino e Tecido Ósseo controle diferencialmente expressas. **Material e métodos:** Realizada cultura primária de Osteossarcoma Canino (OSA7), Cultura da Linhagem MG-63 de Osteossarcoma Humano e Linhagem de Fibroblasto controle 3T3-E1, aplicadas diferentes dosagens do extrato de folha da bergamota nas amostras. Avaliada citotoxicidade por técnica de MTT e Vermelho Neutro. Realizado estudo da concentração inibitória de 50% das células (IC50). Adicionalmente, análises *in silico* avaliaram a relação de proteínas presentes em Osteossarcoma Humano e Tecido Ósseo controle, redes de interação proteicas via SPRING, comparação das proteínas dos Osteossarcomas em similaridade de Genes Positivamente expressos (DEG's *UP* Regulados) e realização de predição farmacológica das Aminoácidos Biogênicos do Extrato via Docking Molecular. **Resultado:** O Extrato da folha da Bergamota demonstrou índices de citotoxicidade celular diverso *in vitro* nos modelos comparativos do Osteossarcoma, demonstrando maior resistência nas células de Fibroblastos controle. O índice de concentração inibitória de 50% das células apresentou diferença estatística significativa dentre as amostras celulares. Os estudos *in silico* demonstraram separação das amostras de tumorais e tecido ósseo controle, realizada normalização e análise das diferentes vias de expressão das DEG's *Up* e *Down*, comparação das redes de interação proteicas positivamente expressas e Docking Molecular das Aminoácidos Biogênicos. **Conclusão:** O tratamento *in vitro* possui potencial inibitório de crescimento celular nas diferentes linhagens e apresentou baixa citotoxicidade as células de fibroblastos saudáveis. As análises *in silico* demonstram uma gama de possibilidades terapêuticas para o Extrato e boa afinidade ligante por *docking* molecular das Aminoácidos Biogênicos em contato com uma proteína alvo do Osteossarcoma.

Palavras-chave: Osteossarcoma; *Citrus bergamia*; Bioinformática; Aminoácidos Biogênicos; Oncopatologia.

ABSTRACT

Introduction: Osteosarcoma is a highly malignant neoplasm that affects dogs and humans without predilection. The use of combined therapies in oncology and precision medicine is a reality in treatments. Bergamot leaf extract (*Citrus bergamia*) proves to be a valuable source of bioactive compounds that help with comorbidities situations. The use of infusions and extracts rich in bioactive compounds acts beneficially on organism by reducing inflammation and oxidative stress. **Objective:** Evaluate the interaction of this Extract on Canine and Human Osteosarcoma cells *in vitro* focused on cellular cytotoxicity and verify *in silico* the differentially expressed proteins present in Human Osteosarcoma, Canine Osteosarcoma and Control Bone Tissue. **Material and methods:** Cell culture of Canine Osteosarcoma (OSA7), Culture of Human Osteosarcoma Line MG-63 and Control Fibroblast Line 3T3-E1, different dosages of bergamot leaf extract applied to the samples. Cytotoxicity was assessed using the MTT and Neutral Red techniques. A 50% cell inhibitory concentration (IC50) study was carried out. In addition, *in silico* analyses evaluated the ratio of proteins present in Human Osteosarcoma and Control Bone Tissue, protein interaction networks with SPRING, comparison of Osteosarcoma proteins in terms of similarity of Positively Expressed Genes (UP Regulated) and pharmacological prediction of the Biogenic Amines contained in Extract via Molecular Docking. **Results:** Bergamot leaf extract showed different cell cytotoxicity indices *in vitro* on comparative osteosarcoma models, showing greater resistance on control fibroblast cells. The IC50 of the cells showed a statistically significant difference between the cell samples. The *in silico* studies showed separation of the tumor and control bone tissue samples, normalization and analysis of the different Up and Down DEG expression pathways, comparison of the positively expressed protein interaction networks and Molecular Docking of Biogenic Amines. **Conclusion:** *In vitro* treatment has cell growth inhibitory potential in the different lineages and showed low cytotoxicity to healthy fibroblast cells. *In silico* analyses show range of therapeutic possibilities in extract and good binding affinity by molecular docking of the biogenic amines in contact with an osteosarcoma target protein.

Keywords: Osteosarcoma; *Citrus bergamia*; Bioinformatics; Biogenic Amines; Oncopathology.

RESUMO PARA SOCIEDADE

Introdução: A cura, a amenização, o auxílio no entendimento do câncer e muitas outras vertentes é o sonho de muitos pesquisadores. O câncer é a doença que mais nos assusta, nos tira o sono, causa destruições catastróficas e a cada dia nós pesquisadores estudamos infinitas possibilidades de ajudar a elucidar, buscar novas possibilidades de terapia, sejam elas focais a doença ou adjudantes para as terapias convencionais já existentes. O câncer que estudamos neste projeto chama-se Osteossarcoma, ele ocorre em humanos e animais de ambos os sexos, de diferentes faixas etárias entre as espécies e na espécie humana é o tipo mais comum de câncer ósseo em crianças e adolescentes. Ocorrem, frequentes diagnósticos em pacientes adolescentes que passam por períodos de rápido crescimento e assim como outros cânceres infantis as melhorias nos resultados científicos devem ser continuadas de forma incessantes nas tentativas de refinar o protocolo de terapêutico. Os pesquisadores realizam testes de diferentes formas para progressão nos estudos desta doença. **Como foi feito:** Neste projeto usamos 3 pilares que integram a Saúde Única (Ambiental, Animal e Humana), o primeiro pilar é o uso de um Extrato Natural feito com Folhas da Bergamota, um cítrico parecido com um limão siciliano, retirado lá da Região da Calábria na Itália, onde as folhas se tornam resíduos e são descartadas pela indústria. Se descobriu em estudos anteriores que esta folha tinha potencial terapêutico para doenças inflamatórias e de estresse oxidativo do organismo. Pensando por um lado sustentável e biotecnológico utilizamos este mesmo Extrato em nosso estudo. O segundo Pilar é o modelo experimental comparativo que usamos seguindo um princípio de não utilização de animais na pesquisa. O terceiro pilar é a utilização de células cultivadas em laboratório de Osteossarcoma Humano, Animal e Células de Crescimento Saudáveis tratadas por 24h em uma estufa que imita um organismo vivo. Além dos três pilares descritos também realizamos pesquisas com dados de sistema via Bioinformática, estes dados são analisados de forma computacional. **Resultado:** O tratamento aplicado as células de Osteossarcoma apresentou resultados positivos em diferentes doses e nas células saudáveis não houve efeito colateral significativo. **Conclusão:** O extrato da folha de Bergamota possui potencial terapêutico e necessita de mais estudos para seu uso em possíveis tratamentos num futuro.

Esse resumo foi revisado por amigos e familiares, em busca de compreensão e transformação de texto técnico científico para caráter social.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I – Revisão de Literatura

Figura 1. Arbusto de Bergamota na Calábria

Figura 2. Transformação colorimétrica MTT

Capítulo II – Artigo Científico

Figura 1. Caracterização histopatológica OSA7

Figura 2. Cromatograma Aminas Biogênicas

Figura 3. Donut Separação de amostras de acordo com o tecido

Figura 4. PCA Plot de variação

Figura 5. Número de genes diferencialmente expressos

Figura 6. Volcano Plot – Genes diferencialmente expressos

Figura 7. STRING I – *Homo sapiens*

Figura 8. STRING II – *Canis familiares*

Figura 9. *Interações Doking Molecular*

Figura 10. Gráfico de Barras MTT OSA7

Figura 11. Gráfico de Regressão IC50 OSA 7

Figura 12. Gráfico de Barras MTT MG-63

Figura 13. Gráfico de Regressão IC50 MG-63

Figura 14. Gráfico de Barras MTT 3T3-E1

Figura 15. Gráfico de Regressão IC50 3T3-E1

Figura 16. IC50 MG-63 por Vermelho Neutro

Figura 17. IC50 BALB/c 3T3 A1 por Vermelho Neutro

LISTA DE TABELAS

Capítulo II – Artigo Científico

Tabela 1. Dez Genes UP Expressos

Tabela 2. Avaliação de afinidade *Docking*

Tabela 3. Viabilidade celular por NR MG-63

Tabela 4. Viabilidade celular por NR BALB/c 3T3 A1

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABs – Aminoácidos Biogênicos

ANOVA – Análise de Variância

BLFE - Extrato da folha de bergamota (*Bergamot Leaf Extract*)

BPF - Fração polifenólica da bergamota (*Bergamot Polyphenolic Fraction*)

CAAF - Citologia Aspirativa Com Agulha Fina

CAF – Cancer-Associated Fibroblast (fibroblasto associado ao câncer)

CEUA - Comissão de Ética em Experimentação Animal

DEGs - Genes Diferencialmente Expressos (*Differentially Expressed Genes*)

DL50- Dose letal de 50% da população em teste

DNA - ácido desoxi-ribonucleico

DOWN – Negativos

GO- Ontologia Genética

KEGG- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

MAPK – Quinases Ativadas por Mitógenos

MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo).

NSCLC – Células não pequenas de Pulmão (*Non-Small Cell Lung*)

NSG- Sequenciamento de Próxima Geração (*Next Generation Sequencing*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OSA – Osteossarcoma

PAAF - Punção Aspirativa Com Agulha Fina

PCA – Análise de Componente Principal (*Principal Component Analysis*)

PPI – Interações Proteína-Proteína (*Protein Protein Interactions*).

ScRNA-seq – RNA de Célula Única

STRING - Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins.

TARGET – Investigação aplicável à terapêutica para gerar tratamentos eficazes (*Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments*).

TCGA - *The Cancer Genome Atlas* (O atlas de genoma do câncer)

IC50 – Concentração inibitória de 50% do item teste (IC- *inhibitory concentration*)

UP – Positivos (*UP Regulados*)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – Revisão de Literatura

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO, DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

1.2 BIOINFORMÁTICA

1.2.1. A Bioinformática e o Câncer

1.2.2. Predição Farmacológica

1.3. O CÂNCER

1.3.1. Etiologia e carcinogênese

1.3.2. O Osteossarcoma

1.4. BERGAMOTA (*Citrus bergamia*)

1.4.1. Compostos bioativos

1.4.2. Aminas biogênicas

1.5. CULTURA CELULAR (*in vitro*)

1.5.1. Ensaios de viabilidade por MTT

1.6. IMPLICAÇÕES CIENTÍFICAS

2. REFERÊNCIA

3. OBJETIVO

3.1 Específico

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

1. INTRODUÇÃO

2. METODOLOGIA

3. RESULTADO

4. DISCUSSÃO

5. CONCLUSÃO

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Capítulo I- Revisão de Literatura

1. INTRODUÇÃO

O Osteossarcoma, tumor ósseo maligno altamente agressivo que afeta indivíduos jovens, permanece como desafio terapêutico significativo, devido elevada taxa de recorrência e resistência. A busca por novas abordagens terapêuticas que integrem tratamentos alternativos com base em compostos naturais tem ganhado relevância, sobretudo considerando a crescente resistência dos tumores aos tratamentos alopáticos.

O uso de extratos vegetais ricos em compostos bioativos como o da folha de Bergamota (*Citrus bergamia*) tem emergido como uma alternativa promissora no campo da oncologia no adjuvante com potencial terapêutico. Estudos recentes demonstram que o extrato da folha de Bergamota é rico em compostos bioativos, dentre eles compostos fenólicos, carotenoides e aminas biogênicas. Os compostos descritos apresentam propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, efeitos modulatórios, dentre outros benefícios. Tornando relevante a investigação do Extrato como potencial terapêutico adjuvante no Osteossarcoma.

Nesse contexto, as aminas biogênicas (AB) recentemente caracterizadas no extrato, desempenham papel crucial em uma variedade de processos fisiopatológicos como a modulação de sistemas neuroquímicos, regulação cardiovascular, resposta imunológica e nos processos de crescimento e diferenciação celular. Há descrições que denotam relevância científica das Aminas em condições clínicas, dentre elas, toxicidade alimentar, alterações de neurotransmissões e condições de produção excessivas de Catecolaminas ligadas a tumores neuroendócrinos.

A presente dissertação propõe um estudo translacional, sobre a interação do extrato da folha de Bergamota em células de Osteossarcoma canino e humano *in vitro*, investigando a citotoxicidade celular do extrato, análises *in silico* da expressão gênica diferencial, avaliação da afinidade das Aminas biogênicas com os genes encontrados no Osteossarcoma e a predição farmacológica. Contribuindo para estratégias terapêuticas baseadas em compostos bioativos no tratamento Oncológico como base para futuras investigações clínicas.

REFERÊNCIAS

Al-Khan AA, Nimmo JS, Day MJ, Tayebi M, Ryan SD, Kuntz CA, Simcock JO, Tarzi R, Saad ES, Richardson SJ, Danks JA. **Fibroblastic Subtype has a Favourable Prognosis in Appendicular Osteosarcoma of Dogs.** J Comp Pathol. 2020; 176:133–44. DOI: 10.1016/j.jcpa.2020.02.011 | PMID: 32359626.

AZIZ, Muhammad Nazirul Mubin et al. Curcumin analog DK1 induces apoptosis in human osteosarcoma cells in vitro through mitochondria-dependent signaling pathway. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 75, 2018.

Balmant NV, Silva N de P, Santos M de O, Reis R de S, Camargo B de. **Delays in the health care system for children, adolescents, and young adults with bone tumors in Brazil.** J Pediatr (Rio J) [Internet]. 2019 Nov; 95(6):744–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jped.2018.07.003>

Barabasi AL, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. Nat Rev Genet. 2004;5:101–13.

BARON, G. *et al.* Analytical Profile and Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Enriched Polyphenol Fractions Isolated from Bergamot Fruit and Leave. **Antioxidants** **10**, 141 (2021).

Bartnik, M., Sławińska-Brych, A., Mizerska-Kowalska, M., & Zdzisińska, B. (2023). Avaliação do efeito biológico do bergapteno não ativado por UV em células tumorais humanas selecionadas e a percepção do mecanismo molecular de sua ação. *International Journal of Molecular Sciences* , 24 (21), 15555. <https://doi.org/10.3390/ijms242115555>

BATTAZZA, Alexandre. **Proteômica dos osteossarcomas caninos: uma descrição e comparação entre os sexos.** Dissertação (mestrado), 49 p. - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Botucatu, 2023.

Braga, K. M. da S., Cruz, V. de S., Arnhold, E., & Araújo, E. G. de .. (2022). **Recycled Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) Shell Ethanolic Extract Induces Apoptosis in Canine Osteosarcoma Cells.** *Ciência Animal Brasileira*, 23, e71198. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-71198>

BRAGA, Karla Márcia da Silva et al. Extrato etanólico de cascas recicladas de pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) induz apoptose em células de osteossarcoma canino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, p. e71198, 2022.

BRASILEIRO, Felipe César da Silva. Comparação da resposta in vitro entre os tratamentos com resveratrol, Viscum album e/ou doxorubicina em cultura de células de osteossarcoma canino. Dissertação de Mestrado. 2022.

Calvello, R. et al. Bovine and soybean milk bioactive compounds: Effects on inflammatory response of human intestinal Caco-2 cells. Food Chem. 1; 210:276–85 (2016).

Carolo dos Santos, K. *et al.* Recovery of Cardiac Remodeling and Dysmetabolism by Pancreatic Islet Injury Improvement in Diabetic Rats after Yacon Leaf Extract Treatment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 1–9 (2018).

CARONIA, Daniela. **Pharmacogenetic studies in osteosarcoma and breast cancer to identify genetic variants involved in treatment efficacy and toxicities**. 2011. Tese de Doutorado. Universidad Autónoma de Madrid.

Di Donna, L. *et al.* Statin-like principles of bergamot fruit (*Citrus bergamia*): Isolation of 3-hydroxymethylglutaryl flavonoid glycosides. *J. Nat. Prod.* **72**, 1352–1354 (2009).

Farr JN, Roforth MM, Fujita K, Nicks KM *et al.* Effects of Age and Estrogen on Skeletal Gene Expression in Humans as Assessed by RNA Sequencing. *PLoS One* 2015;10(9):e0138347. PMID: 26402159

Farr, J. N., Roforth, M. M., Fujita, K., Nicks, K. M., Cunningham, J. M., Atkinson, E. J., Therneau, T. M., McCreedy, L. K., Peterson, J. M., Drake, M. T., Monroe, D. G., & Khosla, S. (2015). Effects of Age and Estrogen on Skeletal Gene Expression in Humans as Assessed by RNA Sequencing. *PloS one*, 10(9), e0138347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138347>

Ferlemi, A. V. & Lamari, F. N. Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants* **5**, (2016).

Filimonov D.A., Lagunin A.A., Gloriovova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V. (2014). Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50 (3), 444-457.

FLEMING LABORATÓRIO. Como a genética influencia a resposta aos tratamentos contra o câncer? Disponível em: <https://fleminglaboratorio.com/glossario/como-genetica-influencia-resposta-tratamentos-cancer>. Acesso em: 5 jan. 2025.

FLETCHER, C.D.M. *et al.* **World Health Organization, classification of tumours: Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone** 4.ed. Lyon: IARC Press, 2013.

Formisano, C. *et al.* Detailed Phytochemical Characterization of Bergamot Polyphenolic Fraction (BPF) by UPLC-DAD-MS and LC-NMR. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 3159–3167 (2019).

Francisqueti-Ferron, F. V. *et al.* Basic concepts on the role of nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) in age-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–14 (2019).

GAO, Ying; GUO, Zhaoan; LIU, Yingying. Analysis of the potential molecular biology of triptolide in the treatment of diabetic nephropathy: A narrative review. *Medicine*, v. 101, n. 48, p. e31941, 2022.

GONG, Jianting *et al.* Understanding membrane protein drug targets in

computational perspective. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 5, p. 551-564, 2019.

Hopkins AL. Network pharmacology. *Nat Biotechnol.* 2007;25:1110–1.

Hurrle, S. & Hsu, W. H. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed. J.* **40**, 257–262 (2017).

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde (MS). **ABC do câncer:** abordagens básicas para o controle do câncer. 6. ed. Rio de Janeiro: [S.N.], (Brasil). 2020. 114 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/livro-abc-6-edicao-2020.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2024.

JAFARPOUR, Seyed Masoud et al. The radioprotective effects of curcumin and trehalose against genetic damage caused by I-131. **Indian Journal of Nuclear Medicine**, v. 33, n. 2, p. 99-104, 2018.

JIANG, Xi; HUANG, Yulin. Curcumin derivative C086 combined with cisplatin inhibits proliferation of osteosarcoma cells. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 26, p. e924507-1, 2020.

Leonardi L, Scotlandi K, Pettinari I, Benassi MS, Porcellato I, Pazzaglia L. Mirnas in canine and human osteosarcoma: **A highlight review on comparative biomolecular aspects** [Internet]. Vol. 10, *Cells*. 2021. p. 1–9. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10020428>

LIN, Jen-Kun. Molecular targets of curcumin. **The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease**, p. 227-243, 2007.

LU, Ko-Hsiu et al. New insights into antimetastatic signaling pathways of melatonin in skeletomuscular sarcoma of childhood and adolescence. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 39, p. 303-320, 2020.

LU, Ko-Hsiu et al. New insights into molecular and cellular mechanisms of zoledronate in human osteosarcoma. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 214, p. 107611, 2020.

Luu AK, Wood GA, Vilorio-Petit AM. **Recent Advances in the Discovery of Biomarkers for Canine Osteosarcoma**. *Front Vet Sci.* 2021; 8:734965.

MEANA, Clara et al. Correlation between endogenous polyamines in human cardiac tissues and clinical parameters in patients with heart failure. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 20, n. 2, p. 302-312, 2016.

MEDEIROS, Marcos Paulo Cavaliere de. Modelagem computacional de um acelerador linear e da sala de radioterapia para cálculo da dose efetiva em pacientes submetidos a tratamento de câncer de próstata (Tese de doutorado) 2018.

MESKO, B. The role of artificial intelligence in precision medicine. *Expert*

Review of Precision Medicine and Drug Development, v. 2, n. 5, p. 239–241, 3 set. 2017.

METELLO, António João de Oliveira Marques. **Osteossarcoma, Quimioterapia HDMTX e Reflexos Laboratoriais**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro (Portugal).

Mollace, V. *et al.* Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: From animal models to human studies. *Fitoterapia* **82**, 309–316 (2011).

MOTALLEBZADEH, Elham *et al.* Neuroprotective effect of melatonin on radiation-induced oxidative stress and apoptosis in the brainstem of rats. **Journal of cellular physiology**, v. 235, n. 11, p. 8791-8798, 2020.

Moufida, S. & Marzouk, B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry* **62**, 1283–1289 (2003).

Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(12): 993-6.

PAN, Li; CHAI, Hee-Byung; KINGHORN, A. Douglas. Discovery of new anticancer agents from higher plants. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 4, p. 142, 2012.

Risitano, R. *et al.* Flavonoid fraction of bergamot juice reduces LPS-induced inflammatory response through SIRT1-mediated NF- κ B inhibition in THP-1 monocytes. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).

SANTOS, Patricia Gomes. **Adenocarcinoma do Pâncreas-Estratégias Terapêuticas Atuais e Perspectivas Futuras**. 2021. Dissertação de Mestrado.
SIQUEIRA, Juliana Silva. Efeito do extrato das folhas de bergamota (*Citrus bergamia*) sobre o estado RedOx-Inflamatório nos órgãos alvo da obesidade. Dissertação de Mestrado. 2023.

SONESON, C.; DELORENZI, M. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC bioinformatics*, v. 14, n. 1, p. 91, 2013.

SUN, Yuanjue *et al.* Curcumin inhibits the proliferation and invasion of MG-63 cells through inactivation of the p-JAK2/p-STAT3 pathway. **OncoTargets and therapy**, p. 2011-2021, 2019.

THIEME, Stéfanie *et al.* Variantes genéticas nos genes ABCC2 e ABCC4 e a relação com os níveis plasmáticos de metotrexato em altas doses. **Clinical and biomedical research. Porto Alegre.**, 2022.

THOMPSON, K.G.; DITTMER, K.E. Tumors of bone. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**, 5.ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017. p. 356 – 424.

TOBEIHA, Mohammad *et al.* Potential of natural products in osteosarcoma

treatment: Focus on molecular mechanisms. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112257, 2021.

Vaziri, N.D. et al. High amylose resistant starch diet ameliorates oxidative stress, inflammation, and progression of chronic kidney disease. *PLoS One* 9;9(12) (2014).

Vistoli, G. *et al.* Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. *Free Radic. Res.* **47**, 3–27 (2013).

WAGNER, Krisley Cruz Wagner et al. Diagnóstico de neoplasia óssea por exames de imagem em cão. 2022.

Weivoda MM, Chew CK, Monroe DG, Farr JN et al. Identification of osteoclast-osteoblast coupling factors in humans reveals links between bone and energy metabolism. *Nat Commun* 2020 Jan 7;11(1):87. PMID: 31911667

Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D (2023). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.1.4, <https://github.com/tidyverse/dplyr>, <https://dplyr.tidyverse.org>.

Wooller, S. K., Benstead-Hume, G., Chen, X., Ali, Y., & Pearl, F. M. G. (2017). Bioinformatics in translational drug discovery. Em *Bioscience Reports* (Vol. 37, Número 4). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BSR20160180>

XIE, Z. et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Current Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1–51, 2021.

Yuqing Zhang, Giovanni Parmigiani, W Evan Johnson, *ComBat-seq*: batch effect adjustment for RNA-seq count data, *NAR Genomics and Bioinformatics*, Volume 2, Issue 3, September 2020, lqaa078, <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa078>.

Zhou, Y., Yang, D., Yang, Q. *et al.* Single-cell RNA landscape of intratumoral heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in advanced osteosarcoma. *Nat Commun* **11**, 6322 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20059-6>