



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**- PONTO FOCAL -**

**DÉBORA CÁSSIA VIEIRA GOMES**

**TOXICOGENÉTICA E OS EFEITOS ANTITUMORAIS DE EXTRATOS OBTIDOS DO**  
*Neonothopanus gardneri*: **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E FARMACÊUTICO**

TERESINA-PI

2019

**DÉBORA CÁSSIA VIEIRA GOMES**

**TOXICOGENÉTICA E OS EFEITOS ANTITUMORAIS DE EXTRATOS OBTIDOS DO**  
*Neonothopanus gardneri*: **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E FARMACÊUTICO**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, ponto focal Universidade Federal do Piauí, em cumprimento às exigências para o título de Doutor em Biotecnologia.

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

**CO-ORIENTADOR:** Prof Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior

**ÁREA E LINHA DE PESQUISA**

Biotecnologia em Saúde – Desenvolvimento de Agentes Profiláticos, Terapêuticos e Testes Diagnósticos.

TERESINA-PI

2019

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

G633t Gomes, Débora Cássia Vieira.  
Toxicogenética e os efeitos antitumorais de extratos obtidos do *Neonothopanus gardneri* : potencial biotecnológico e farmacêutico / Débora Cássia Vieira Gomes. – 2019.  
240 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Teresina, 2019.

“Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante”.

“Coorientador: Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior”.

1. *Neonothopanus gardneri*. 2. Danos ao DNA.  
3. Apoptose. 4. Antitumorais. I. Título.

CDD 660.6

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

**ALUNO:** Débora Cássia Vieira Gomes

**TÍTULO DO PROJETO:** "TOXICOGENÉTICA E OS EFEITOS ANTITUMORAIS DE EXTRATOS OBTIDOS DO *Neonothopanus gardneri*: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E FARMACÊUTICO"

**PROFESSOR ORIENTADOR:** Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Cidó - UFPI (Examinadora)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo - UFPI (Examinador)	<u>SANSFATÓRIO</u>	<u>[Assinatura]</u>
Profa. Dra. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade - IFMA (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 22 de Janeiro de 2019

**HORÁRIO:** 09:00h

**LOCAL:** Núcleo de Tecnologia Farmacêutica -NTF/UFPI

*"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida; e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."*

*(Augusto Cury)*

# *Dedicatória*

---

A **Deus**, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais **Willams Silva Gomes** e **Huldancy Vieira Gomes** que, mesmo eu não merecendo tanto amor, ensinaram-me a viver com dignidade, iluminaram os caminhos mais escuros com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo. E sempre se doaram por inteiro, renunciando muitas vezes dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, dedico essa minha conquista.

Aos meus queridos irmãos, **Diego Rangel** e **Willams Filho**, amo vocês!!

À minha avó, **Maria de Lourdes Rodrigues da Silva**, pela sua garra e força perante a vida!  
Amo a senhora!

Aos meus sogros, **Raimundo Lima** e **Lilian Ferreira**, que são como verdadeiros pais para mim. Aos meus cunhados **Ana Mara** e **Marcus Benedito** pelo apoio e amizade. Foi uma bênção ter começado a fazer parte desta família e partilhar todos os momentos que temos vivido juntos.

Ao meu esposo **Rubens Paulo**, que me enche de amor; e aos nossos filhos, **Miguel Gomes** e **Ana Lis** que amo incondicionalmente! Vocês são minha resposta de oração!

# *Agradecimentos*

---

À minha orientadora **Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante** pela sua infinita disponibilidade, paciência, por todos os conselhos pessoais e profissionais, pelos conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho, pela confiança na minha pessoa, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado desde minha graduação, pela impecável condução deste trabalho, por ser a maior incentivadora na superação dos meus limites, além da amizade e compreensão em momentos difíceis. Você é meu exemplo de competência e liderança!

Agradeço à **Universidade Federal do Piauí**, particularmente ao Programa **Renorbio**, aos professores e funcionários pela realização do curso de pós-graduação, em especial à profa Carla Eiras, Deusilene e Eliane pelo compromisso perante o programa Renorbio.

Ao laboratório **Lapgenic** (UFPI) pelo suporte no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior** pela co-orientação, apoio e confiança.

Aos professores (as) **Dra. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e Dr. José Arimateia Dantas Lopes** pela sua colaboração essencial na elucidação da parte química dos compostos isolados do cogumelo *N. gardneri*. Agradeço também aos alunos do Instituto Federal do Piauí (IFPI), **Maria das Dores, Neicyano e Bárbara Queiroz**, por colaborarem com a parte experimental deste estudo.

Ao amigo **Muhammad Torequl Islam**, ao professor **Dr. João Marcelo de Castro e Sousa e à Márcia Fernanda** pelas colaborações que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A minhas amigas e amigos de trabalho laboratorial do Hospital Universitário (**Ciro Araújo, Ataliba Félix, Helenita Aguiar, Viviane Amorim, Adelino Lima, Luís Alberto, Dilbert**

**Veloso, Patrícia Régia**) e a todo o corpo técnico do Laboratório HU, em especial à Marina Luisa e Clotildes, pela presença constante em minha vida, pelos valiosos conselhos e pelas frases de otimismo e motivação. Vocês sempre me ajudaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

Em especial, minhas amigas **Ilka Barros, Naíza Ribeiro e Danielle Mota** por sempre torcerem por mim e pelas palavras de otimismo e compreensão nos momentos mais difíceis. Muito obrigada!

Ao meu chefe **José Couras** pelo exemplo de compreensão e liderança exercida.

Aos amigos residentes, que sempre me estenderam a mão sem pedir nada em troca: **Duanne, Veridiana, Sávio Freire, Paulo Monteiro e Kelcianne**.

A meus amigos, companheiros de bancada e parceiros dos testes no laboratório Lapgenic (**Ana Maria, Antonielly Reis, Rosália Lima, José Williams, Marcus Alencar, Tonny Braga, Antonio Júnior, Márcia Fernanda, Ricardo Melo, Ag-Anne Melo, José Victor, Luiza Alves, Gabriela Alves, Caroline Milanez, Bárbara Cavalcante**) pela jornada diária no laboratório, por nunca me negar ajuda, pelos desabafos e frases de otimismo. Esse trabalho não teria sido concluído sem a ajuda de vocês!

Ao meu queridíssimo, que Deus me presenteou, **Rubens Paulo**, ouvinte atento de minhas dúvidas, inquietações e desânimos. Ao meu filho **Miguel Gomes** e minha filha **Ana Lis**, que logo logo estará conosco! Vocês são a melhor parte da minha vida.

A todos os professores e colegas de doutorado e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, ajudaram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

# TOXICOGENÉTICA E OS EFEITOS ANTITUMORAIS DE EXTRATOS OBTIDOS DO *Neonothopanus gardneri*: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E FARMACÊUTICO

## RESUMO

As espécies do filo Basidiomycota, a exemplo do *Neonothopanus gardneri*, são ricas em bioativos com potencial biotecnológico e farmacológico. Apresentam atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, imunoestimulante, hipoglicemiante e antitumoral. Entretanto, os estudos sobre essas propriedades com o *N. gardneri* ainda são incipientes. A terapia do câncer ainda apresenta diversos efeitos colaterais e riscos para instabilidade genética em células não tumorais, o que suscita pesquisas com novos compostos. Assim, o estudo teve por objetivos identificar alguns das substâncias químicas por abordagem fitoquímica, cromatografia líquida e ressonância magnética; além de avaliar os efeitos toxicogenéticos e antitumorais dos extratos metanólico e acetato de etila obtidos do *N. gardneri*, em *Saccharomyces cerevisiae*, modelos murinos para Sarcoma 180 e para o câncer de mama. Em estudos de revisão em periódicos *PubMed*, *Science Direct*, *Web of Science* e *Scopus*, utilizando os indexadores 'mushroom', 'bioluminescent mushrooms', 'mushroom and biological activities', 'mushroom and secondary metabolites' e 'mushroom and antitumoral activity' foi possível constatar que os metabólitos e compostos químicos, obtidos dos Basidiomycota, apresentam efeitos tóxicos/citotóxicos por diversos mecanismos compatíveis com apoptoses. Em *S. cerevisiae* e em células de Sarcoma 180, os extratos em 500, 1000, 1500 e 2000 µg/mL foram avaliados quanto a danos oxidativos e viabilidade celular, com aplicação do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese em células de Sarcoma 180. Em modelos para o câncer de mama, camundongos *Swiss* (20 a 50 g e 6 a 7 semanas de idade) foram submetidos à administração do 7,12-dimetilbenzantraceno (6 mg.Kg<sup>-1</sup>v.o), durante onze semanas, com monitoramento toxicológico e citogenético. A terapia com o extrato metanólico foi feita na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>v.o; e com ciclofosfamida, em 25 mg.Kg<sup>-1</sup> i.p. No extrato metanólico foram encontrados alcaloides, açúcares redutores, proteínas, catequinas, taninos e depsídeos e foram isoladas duas amidas inéditas: 7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida e 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida como metabólitos. Em *S. cerevisiae*, nas duas maiores concentrações, os extratos induziram danos oxidativos; mas, nas menores, foram antioxidantes. Citotoxicidade foi observada para todas as concentrações, em Sarcoma 180, na coloração Tripán, como também pelos índices de divisão nuclear sem e com apoptoses e necroses; e por danos genotóxicos similares à doxorubicina (2 µg/mL). No monitoramento toxicológico (comportamental [campo aberto, *rota rod*], peso de órgãos, hematológico e bioquímico para enzimas renais e hepáticas) não foram observadas alterações comportamentais, renais e hipocráticas. Mas, observou-se alterações em plaquetas e em enzimas hepáticas. Em camundongos fêmeas, o carcinoma mamário ductal invasivo foi observado na mama direita, por análises histopatológicas e por marcação de Ki67. O extrato metanólico teve efeitos antitumorais para o carcinoma mamário com menos danos em tecidos não neoplásicos (medula, fígado e linfócitos de sangue periférico), de forma contrária ao observado para a ciclofosfamida (25 mg.Kg<sup>-1</sup> i.p), durante as três semanas de terapias. Efeitos antitumorais do extrato foram observados por mecanismos associados a danos ao DNA e indução de apoptoses, possivelmente, com inclusão de danos oxidativos induzidos por seus bioativos. As substâncias isoladas ainda devem ser testados como produtos naturais para formulações antitumorais.

**Palavras chave:** *Neonothopanus gardneri*, danos ao DNA, apoptose, antitumorais

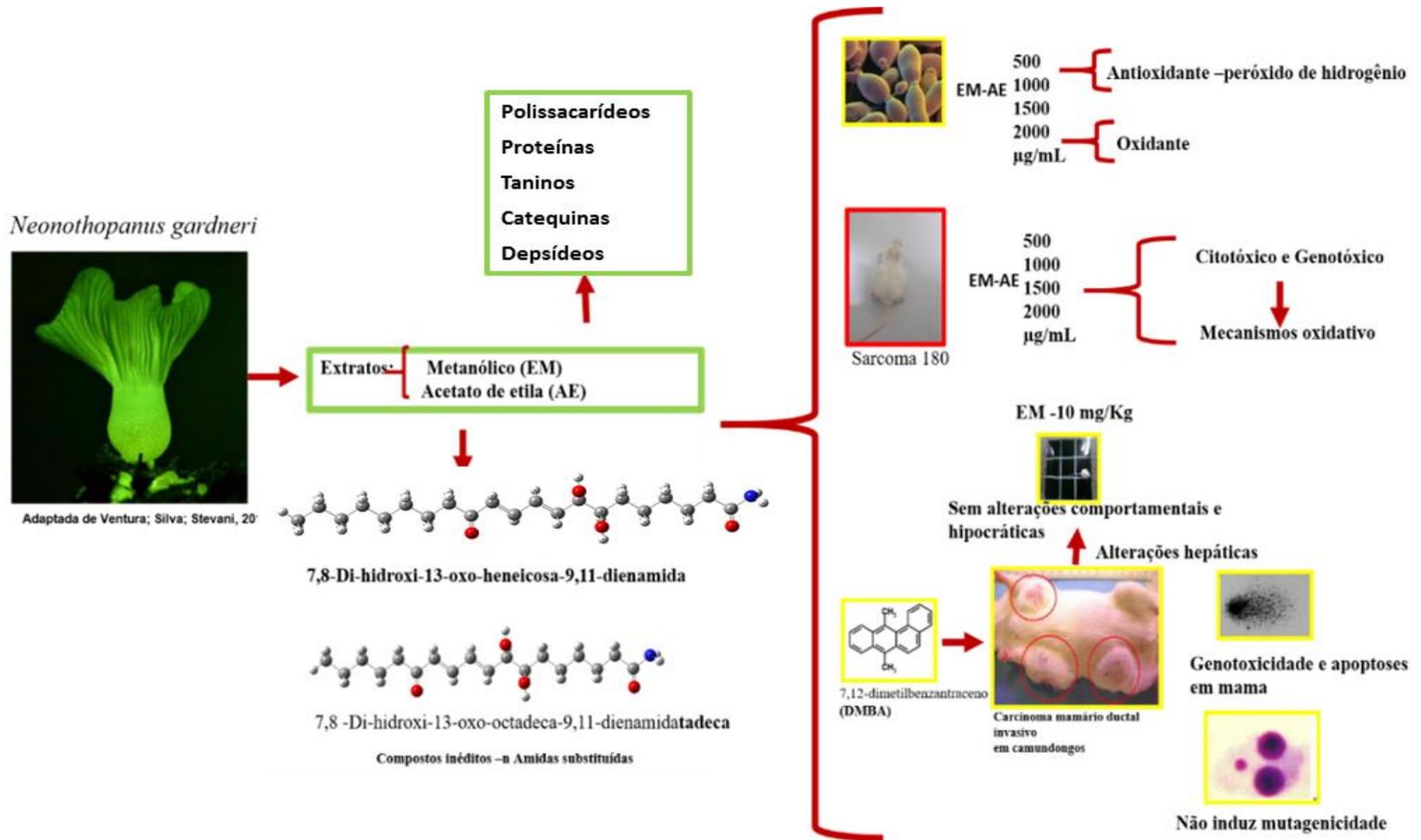
**TOXICOGENETIC AND THE ANTITUMOR EFFECTS OF EXTRACTS  
OBTAINED FROM *Neonothopanus gardneri*: BIOTECHNOLOGICAL AND  
PHARMACEUTICAL POTENTIAL**

**ABSTRACT**

The species of the phylum Basidiomycota, like the *Neonothopanus gardneri*, are rich in bioactive with biotechnological and pharmacological potential. They present anti-inflammatory, anti-oxidant, antimicrobial, immunostimulatory, hypoglycemic and anti-tumor activities. However, studies on these properties with *N. gardneri* are still rare. Cancer therapy still has several side effects and risks for genetic instability, especially in non-tumor cells, which raises research with new compounds. Thus, the study aimed to identify some of the chemical compounds by phytochemistry, liquid chromatography and magnetic resonance; in addition to evaluating the toxicogenic and antitumor effects of the methanolic and ethyl acetate extracts obtained from *N. gardneri*, *Saccharomyces cerevisiae*, murine models for Sarcoma 180 and for breast cancer. In review studies in *PubMed*, *Science Direct*, *Web of Science* and *Scopus* periodicals, using the indexes 'mushroom', 'bioluminescent mushrooms', 'mushroom and biological activities', 'mushroom and secondary metabolites' and 'mushroom and antitumoral activity' It is possible to verify that the metabolites and chemical compounds obtained from Basidiomycota present toxic/cytotoxic effects by several mechanisms compatible with apoptosis. In *S. cerevisiae* and Sarcoma 180 cells, extracts at 500, 1000, 1500 and 2000 µg/mL were evaluated for oxidative damage and cell viability, with the application of the micronucleus test with blocking of cytokinesis in Sarcoma 180 cells. In breast cancer models, Swiss (20 to 50 g and 6 to 7 weeks of age) underwent 7,12-dimethylbenzanthracene (6 mg.Kg<sup>-1</sup>v.o) for eleven weeks, with toxicological monitoring and cytogenetic. Therapy with the methanolic extract was done at a dose of 10 mg.kg<sup>-1</sup>v.o; and cyclophosphamide at 25 mg.Kg<sup>-1</sup> i.p. In the methanolic extract, alkaloids, reducing sugars, proteins, catechins, tannins and depositions were identified and two novel amides were isolated: 7,8-dihydroxy-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamide and 7,8- hydroxy-13-oxo-octadeca-9,11-dienamide as major isolates. In *S. cerevisiae*, in the two highest concentrations, the extracts induced oxidative damages; but in the minor ones they were antioxidants. Cytotoxicities were observed for all concentrations, in Sarcoma 180, in Tripan staining, as well as by nuclear division indices with and without apoptosis and necrosis; and genotoxic damage similar to doxorubicin (2 µg/mL). In the toxicological monitoring (behavioral [open field, rotated rod], organ weight, hematological and biochemical for renal and hepatic enzymes) no behavioral, renal and hippocampic changes were observed. However, alterations in platelets and liver enzymes were observed. In female mice, invasive ductal mammary carcinoma was observed in the right breast, by histopathological analysis and by Ki67 labeling. The extract had antitumor effects for mammary carcinoma with less damage in non-neoplastic tissues (medulla, liver and peripheral blood lymphocytes), contrary to that observed for cyclophosphamide (25 mg.Kg<sup>-1</sup> i.p) during the three weeks of therapies. Antitumor effects of the extract were observed by mechanisms associated with DNA damage and induction of apoptosis, possibly with the inclusion of oxidative damage induced by its bioactives. However, the compounds alone must still be tested as natural products for antitumor formulations

**Keywords:** *Neonothopanus gardneri*, DNA damage, apoptosis, antitumor.

## GRÁFICO RESUMO



## LISTA DE FIGURAS

<b>INTRODUÇÃO</b>	
Figura 1. Esquema representativo da tese.	20
<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	
Figura 1. Danos ao DNA e respostas celulares.	22
Figura 2. Instabilidade genômica e reparo de DNA.	24
Figura 3. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes.	28
Figura 4. Danos ao DNA e mecanismos de reparo.	30
Figura 5. Fases do processo de carcinogênese.	32
Figura 6. Estrutura molecular do 5-Fu.	46
Figura 7. Estrutura molecular da DOX.	47
Figura 8. Estrutura molecular da CPA.	48
Figura 9. CPA e seus metabólitos.	49
Figura 10. Estrutura molecular do Taxol.	50
Figura 11. Estrutura química 7, 12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antraceno (DMBA).	54
Figura 12. Modelo murino de Sarcoma 180	56
Figura 13. <i>Neonothopanus gardneri</i> .	65
Figura 14. Atividades biológicas apresentadas pelos fungos basidiomicetos.	67
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Figura 1. Fluxograma da análise e elegibilidade das publicações encontradas nesta pesquisa.	75
Figura 2. Espécie <i>Neonothopanus gardneri</i> .	77
Figura 3. <i>N. gardneri</i> em luz natural (à esquerda) e no escuro (à direita).	77
Figura 4. Mecanismo de emissão de luz em fungos.	78
Figura 5. Mecanismos antitumorais de compostos químicos, metabólitos secundários isolados de espécies do filo Basidiomycota que podem ser consideradas como fontes de bioativos para agentes antitumorais.	96
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Figura 1.</b> Estrutura química dos compostos isolados do extrato metanólico obtidos do <i>N. gardneri</i> . Em <b>A</b> composto <b>1</b> : 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicososa-9,11-dienamida. Em <b>B</b> o composto <b>2</b> : 7,8 -Di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida.	127
<b>Figura 2.</b> Efeitos de extratos obtidos do <i>N. gardneri</i> na viabilidade celular avaliada pelo teste de exclusão por azul de Tripán em células do líquido ascítico de Sarcoma 180, após 72h de exposição. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. CN: células não tratadas. DOX: Doxorubicina (2 $\mu$ g/mL). A: extrato metanólico e B: acetato de etila. ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> Significante em relação ao CN (controle negativo); <sup>b</sup> Significante em relação à Dox e <sup>#</sup> Significante em relação à maior concentração.	128
<b>Figura 3.</b> Efeitos genotóxicos do extrato metanólico (EM) e fração acetato de etila (AE) extraídos do <i>N. gardneri</i> . Em <b>A</b> (Índice de Danos) e <b>B</b> (Frequência de Danos), dados para o EM; e em <b>C</b> (Índice de Danos) e <b>D</b> (Frequência de Danos), dados para FAE. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. CN: células não tratadas. Dox: Doxorubicina (2 $\mu$ g/mL). A e B: Extrato metanólico; C e D: acetato de etila. ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> Significante em relação ao CN (controle negativo); <sup>b</sup> Significante em relação à Dox.	129
<b>Figura 4.</b> Efeitos oxidativos dos extratos metanólicos (EM) e acetato de etila (AE) obtidos de <i>N. gardneri</i> em cultura primária de Sarcoma 180 co-tratada com peróxido de hidrogênio na concentração de 2000 $\mu$ g/mL. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: Doxorubicina 2 $\mu$ g/mL. Em <b>A</b> e <b>B</b> - extrato metanólico (EM); e em C e D - acetato de etila (AE). ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. $p < 0,05$ comparado ao grupo CN (a) e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (b).	130

<b>Figura 5.</b> Apoptose e necrose induzidas pelos extratos de <i>N. gardneri</i> em cultura primária de S180, após 72h de exposição. A e B: apoptose. C e D: necrose. Valores representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: doxorubicina 2 µg/mL. Extrato metanólico de <i>N. gardneri</i> . A e C: Extrato metanólico e B e D: Acetato de etila de <i>N. gardneri</i> . ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. * p<0,05 comparado ao grupo CN (a). * p<0,05 comparado ao grupo CP (b). ** p<0,01 e *** p<0,001.	132
<b>Figura 6.</b> Perfil oxidante dos extratos acetato de etila (AE) e metanólico (EM) em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> proficientes e mutadas em defesas antioxidantes. CN: solução de Tween 80. CP: Peróxido de hidrogênio 10 mM. ANOVA, Teste de Dunnett's. *p<0,05 comparado ao CN. #p<0,05 comparado ao CP.	133
<b>Figura 7.</b> Atividade antioxidante (co-tratamento) dos extratos acetato de etila (AE) e metanólico (EM) frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio 10 mM em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> . ANOVA, Teste de Dunnett's. *p<0,05 comparado ao CN. #p<0,05 comparado ao CP.	134
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR</b>	
<b>Figura 1.</b> Perfil fotomicrográfico de cultura primária de S180 no ensaio cometa expostas ao extrato metanólico.	152
<b>Figura 2.</b> Perfil fotomicrográfico de cultura primária de S180 no ensaio cometa expostas ao extrato acetato de etila.	153
<b>Figura 3.</b> Perfil fotomicrográfico de células tumorais de Sarcoma 180 tratadas com extrato metanólico avaliadas pelo teste CBMN	154
<b>Figura 4.</b> Perfil fotomicrográfico de células tumorais de Sarcoma 180 tratadas com extrato acetato de etila avaliadas pelo teste CBMN	154
<b>Figura 05.</b> Perfil fotomicrográfico de células de sarcoma 180 após exposição aos extratos metanólico e acetato de etila no teste de Aberrações Cromossômicas	155
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Figura 1:</b> Cromatogramas do HPLC-PDA e espectro UV dos compostos <b>1</b> (A - 7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicososa-9,11-dienamida) e composto <b>2</b> (B- 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida, obtidos dos extratos metanólico (fração acetato de etila).	169
<b>Figura 2</b> Estrutura química dos compostos isolados do extrato metanólico obtidos do <i>N. gardneri</i> . Em <b>A</b> composto <b>1</b> : 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicososa-9,11-dienamida. Em <b>B</b> o composto <b>2</b> : 7,8 -Di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida.	170
<b>Figura 3.</b> Efeitos do extrato metanólico (EM) obtido do <i>N. gardneri</i> sobre o peso de órgãos de camundongos fêmeas, após 11 semanas de tratamento com DMBA (6 mg/mL) e 3 semanas de terapia com EM (10 mg/mL). Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5); EM: Extrato metanólico de <i>N. gardneri</i> . DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno 6 mg/kg. CPA: ciclofosfamida 25 mg/kg. <sup>a</sup> p<0,05 comparado ao Veículo (azeite de oliva), <sup>b</sup> p<0,05 comparado ao grupo DMBA. (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).	173
<b>Figura 4:</b> Perfil macroscópico das mamas dos animais, após indução do câncer com DMBA. <b>A</b> : Tratamento com DMBA. Círculo azul: mama direita. Seta azul: indicação de uma maior vascularização. Seta preta e branca: inchaço mamário. Círculo branco: mama esquerda. <b>B</b> : Tratamento com EM, observa-se que houve redução das mamas após tratamento com EM (10 mg/Kg). Círculo verde: Mama direita. Círculo amarelo: Mama esquerda.	175
<b>Figura 5.</b> Perfil histopatológico na mama de camundongos fêmeas, após 7 semanas de tratamento com DMBA ( <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> ) e terapia com EM ( <b>D</b> , <b>E</b> e <b>F</b> ). <b>A</b> : hiperplasia ductal atípica; <b>B</b> : Tecido conjuntivo misturado com lesão, sugerindo carcinoma invasivo. <b>C</b> : congestão vascular e hiper cromatismo nuclear. <b>D</b> : hiperplasia ductal usual. <b>E</b> : congestão vascular. <b>F</b> : padrão tecidual normal. Coloração H&E (aumento de 200X).	176
<b>Figura 6.</b> Perfil imuno-histoquímico de proliferação celular (Ki-67), analisado em mama de camundongos, após 11 semanas de indução do câncer com DMBA e terapia com EM (10 mg/kg). <b>A</b> : controle (Azeite) – leve marcação (16 ± 4%). <b>B</b> : DMBA – expressiva marcação (85 ± 15%), <b>C</b> e <b>D</b> : EM – moderada (55 ± 9 %) marcação. % mensurada pela contagem individual	177

de 400 células (n=3) com citoplasma acastanhado (aumento de 200X).

**Figura 7.** Efeitos antitumorais do extrato metanólico (EM) obtido do *N. gardneri* em mama, medula óssea, fígado e leucócitos de camundongos fêmeas pela indução de genotoxicidade. DMBA (6 mg/kg); EM (10 mg/kg) e CPA (25 mg/kg). Veículo (azeite de oliva). Média ± desvio padrão (n=5). <sup>a</sup>p<0,05 comparado ao grupo azeite, <sup>b</sup>p<0,05 comparado ao DMBA e <sup>c</sup>p<0,05 comparado ao CPA (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

178

**Figura 8.** Efeitos antitumorais do extrato metanólico (EM) obtido do *N.gardneri* em carcinoma mamário, fígado, medula e linfócitos de sangue periférico por indução de apoptoses. Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). EM (10 mg/kg); DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno (6 mg/kg semanal); CPA (25 mg/kg) = ciclofosfamida. ANOVA (duas vias), pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 comparado ao Azeite, <sup>b</sup> p<0,05 comparado ao DMBA e <sup>c</sup> p<0,05 comparado ao CPA<sup>c</sup>.

179

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	
Tabela 1. Classificação dos tipos de carcinoma ductal invasivo de mama, segundo o tipo histológico.	35
<b>Quadro 1.</b> Classificação Histológica dos Sarcomas de Tecidos Moles Cutâneos.	43
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Tabela 1. Levantamento quantitativo das publicações relacionadas às atividades biológicas/farmacológicas de basidiomicetos nas bases de dados pesquisadas.	75
Tabela 2. Extratos e constituintes químicos isolados do filo Basidiomycota e mecanismos antioxidantes, em diferentes estudos não clínicos.	82
Tabela 3. Extratos e constituintes químicos isolados do filo Basidiomycota e mecanismos de atividades anti-inflamatórias em modelos de estudos não clínicos	85
Tabela 4. Alguns mecanismos de toxicidade/citotoxicidade de compostos químicos isolados de espécies do filo Basidiomycota compatíveis para ações antitumorais, em modelos de estudos não clínicos.	87
Tabela 5. Extratos e constituintes químicos isolados de espécies do filo Basidiomycota e alguns mecanismos antitumorais, em modelos não clínicos.	92
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Tabela 1. Testes realizados para caracterização fitoquímica dos extratos de <i>N. gardneri</i> .	121
Tabela 2. Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usadas no estudo.	124
Tabela 3. Caracterização fitoquímica dos extratos metanólico e acetato de etila obtidos de <i>N. gardneri</i> .	125
Tabela 4. Características obtidas em RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) e <sup>13</sup> C (600 MHz) das substâncias (amidas substituídas) inéditas: 7,8-dihidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida (substância <b>1</b> ) e 7,8-dihidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (substância <b>2</b> ) isolados do extrato metanólico obtido do <i>N. gardneri</i>	126
Tabela 5. Danos citogenéticos dos extratos metanólicos (EM) e acetato de etila (AE) obtidos de <i>N. gardneri</i> em células de Sarcoma 180, após 72h de exposição, avaliados por meio do teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese.	131
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Tabela 1.</b> Compostos isolados do extrato metanólico obtidos do <i>N. gardneri</i> . Dados de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C-RMN de 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida ( <b>1</b> ), 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida em CD <sub>3</sub> OD (Multiplicidade, J em Hz)	167
<b>Tabela 2.</b> Avaliação comportamental e atividade locomotora de camundongos fêmeas, virgens, durante 14 semanas de tratamento com azeite, 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e terapias químicas com ciclofosfamida (CPA) e EM.	171
<b>Tabela 3.</b> Perfil metabólico durante terapia com extrato metanólico obtido do <i>N. gardneri</i> em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas em três semana. Veículo (azeite de oliva- 10 mg/Kg <sup>-1</sup> ). EM (extrato metanólico-10 mg/Kg <sup>-1</sup> ). Os valores representam a média ± desvio padrão. Anova two way com pós teste de Tukey's. * p<0,05 comparado ao Azeite, na mesma semana	172
<b>Tabela 4.</b> Efeitos do extrato metanólico (EM) de <i>N. gardneri</i> no perfil hematológico de camundongos com câncer de mama induzido pelo DMBA.	174
<b>Tabela 5.</b> Efeitos do extrato metanólico (EM) de <i>N. gardneri</i> no perfil bioquímico de camundongos com câncer de mama induzido pelo DMBA.	174
<b>Tabela 6.</b> Estudo de reparo de danos ao DNA, em linfócitos de sangue periférico de camundongos fêmeas, durante a indução do câncer de mama com DMBA e terapia com extrato metanólico obtido do <i>N.gardneri</i> .	179
<b>Tabela 7.</b> Efeitos mutagênicos do extrato metanólico (EM) obtido do <i>N. gardneri</i> , avaliado pela formação de micronúcleos (MN), pontes (PT) e brotos (BT).	180

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS: 2,20-azino-bis (ácido. 3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)  
AE: Acetato de Etila  
ALT: alanina aminotransferase  
AST: aspartato aminotransferase  
ATM: ataxia telangiectasia mutada  
ATP: trifosfato de adenosina  
CA: campo aberto  
CM: câncer de mama  
CPA: ciclofosfamida  
CPT: camptotecinas  
DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DPPH: 2,2-difenil-1-picrylhydrazil  
Dox: doxorubicina  
EM: Extrato metanólico  
ERN's: espécies reativas de nitrogênio  
ERO's: espécies reativas de oxigênio  
FD: frequência de danos  
FDA: Food and Drug Administration  
GSH: glutationa  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio  
HCM: hemoglobina corpuscular média  
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
ID: índice de danos  
IDN: índice de divisão nuclear  
IDNC: índice de divisão nuclear considerando apoptose e necrose  
MN: micronúcleos  
OH: grupo hidroxila  
•OH: radical hidroxila  
RR: rota rod  
RMN: Ressonância Magnética Nuclear  
S180: sarcoma 180  
SOD: superóxido dismutase  
TP53: tumor protein P53  
TLS: Síntese Translesão  
VCM: volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 Geral.....	21
2.2 Específicos .....	21
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>22</b>
3.1 A instabilidade genética, reparo de DNA e câncer.....	22
3.1.1 Instabilidade genética.....	22
3.1.2 Instabilidade genética, estresse oxidativo e defesas antioxidantes .....	25
3.1.3 Reparo de DNA.....	28
3.1.4 Alterações genômicas e câncer .....	30
3.1.5 O câncer de mama.....	33
3.1.6 Sarcomas .....	37
3.2 Quimioterapia no câncer.....	44
3.2.1 Agente análogo sintético de purimidina - Fluorouracil (5-Fu) .....	45
3.2.2 Antraciclina - Doxorrubicina (DOX).....	46
3.2.3 Agente alquilante - Ciclofosfamida (CPA).....	47
3.2.4 Agente inibidor dos microtúbulos - Taxol .....	49
3.3 Modelos de estudo em oncologia.....	50
3.3.1 Modelos in vitro .....	51
3.3.2 Modelos in vivo .....	53
3.3.2.1 7, 12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antraceno (DMBA).....	53
3.3.2.2 Modelo murino de Sarcoma 180.....	55
3.4 Biomarcadores Citogenéticos .....	57
3.4.1 Teste em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	58
3.4.2 Ensaio Cometa .....	60
3.4.3 Teste de Micronúcleos .....	61
3.4.4 Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (teste CBMN) .....	62
3.5 Biomarcadores Hematológicos e Bioquímicos.....	63
3.6 <i>Neonothopanus gardneri</i> .....	64
3.6.1 Taxonomia.....	64
3.6.2 Atividades biológicas .....	65
3.6.3 Compostos bioativos isolados de cogumelos.....	67
<b>CAPÍTULO I- Bioativos de espécies do filo Basidiomycota e mecanismos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais.....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO II - Efeitos antitumorais de extratos do <i>Neonothopanus gardneri</i> em células de Sarcoma 180 e oxidantes/antioxidantes em <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>114</b>
<b>CAPÍTULO III- Efeito antitumoral de extrato metanólico do <i>Neonothopanus gardneri</i> em modelo murino para câncer de mama: monitoramento toxicológico e citogenético.....</b>	<b>156</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>195</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>197</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>236</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças que envolve fatores moleculares, celulares e teciduais e que presume iniciações mutagênicas capazes de provocar metástases (TOMASETTI et al., 2017). Epidemiologicamente, os cânceres são originados pela exposição contínua a agentes genotóxicos e/ou mutagênicos, porém a susceptibilidade individual depende tanto da predisposição genética quanto do estilo de vida e hábitos nutricionais (HUANG, 2013). Estima-se que, no biênio 2018-2019, haverá 600.000 novos casos de câncer no Brasil. A maior incidência é câncer de próstata e o câncer de mama feminino, o que provavelmente afetará cerca de 68.000 e 60.000 homens e mulheres, respectivamente. Com exceção do câncer de pele não melanoma, os cânceres mais comuns em mulheres são câncer de mama, colorretal, cervical, pulmonar e tireoidiano, com frequência de 29,5%, 9,4%, 8,1%, 6,2% e 4,0%, respectivamente (INCA, 2018).

A mama feminina é composta de lóbulos (glândulas produtoras de leite), ductos (pequenos tubos que transportam o leite dos lóbulos ao mamilo) e estroma (tecido adiposo e tecido conjuntivo que envolvem os ductos e lóbulos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos) (HUNT; MITTENDORF, 2017). A maioria dos cânceres de mama começa nas células que revestem os ductos (carcinoma ductal) (LOPEZ-GARCIA et al., 2010). Alguns começam nas células que revestem os lóbulos (carcinoma lobular), enquanto um número pequeno se desenvolve em outros tecidos (LAKHANI et al., 2012).

O câncer está entre as doenças que causam mais morte no mundo; e, entre mulheres, o tumor de mama é predominante (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Outro tipo de câncer que, diferente do câncer de mama, é considerado raro, é o sarcoma de partes moles, já que sua recorrência é de 1% em adultos e 15% em crianças, sendo difícil diagnosticá-lo devido à ausência de sintomas que permitam detectar precocemente (SILVA; DE CASTRO et al., 2009).

O uso de modelos experimentais está sendo de grande relevância no descobrimento de novos fármacos antineoplásicos, como também no aperfeiçoamento dos métodos para prevenir, diagnosticar e tratar doenças em humanos (LIU et al., 2015). O modelo de carcinogênese mamária que utiliza o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) apresenta características relevantes como homogeneidade, reprodutibilidade e geração de tumores de forma rápida e é bastante utilizado na pesquisa de compostos antitumorais (ARROYO-ACEVEDO et al., 2015; ABBA et al., 2016). Os modelos *in vitro*, como as culturas de

linhagens tumorais, a exemplo da linhagem leucêmica promielocítica aguda HL-60; e *in vivo*, como culturas primárias de células tumorais de Sarcoma 180, contribuem para os avanços na pesquisa oncológica, pois são modelos promissores utilizados em laboratórios para estudo da biologia do câncer além do seu uso para testar a eficácia terapêutica de novos agentes antitumorais (GILLET; VARMA; GOTTESMAN, 2013; CHEN et al., 2015).

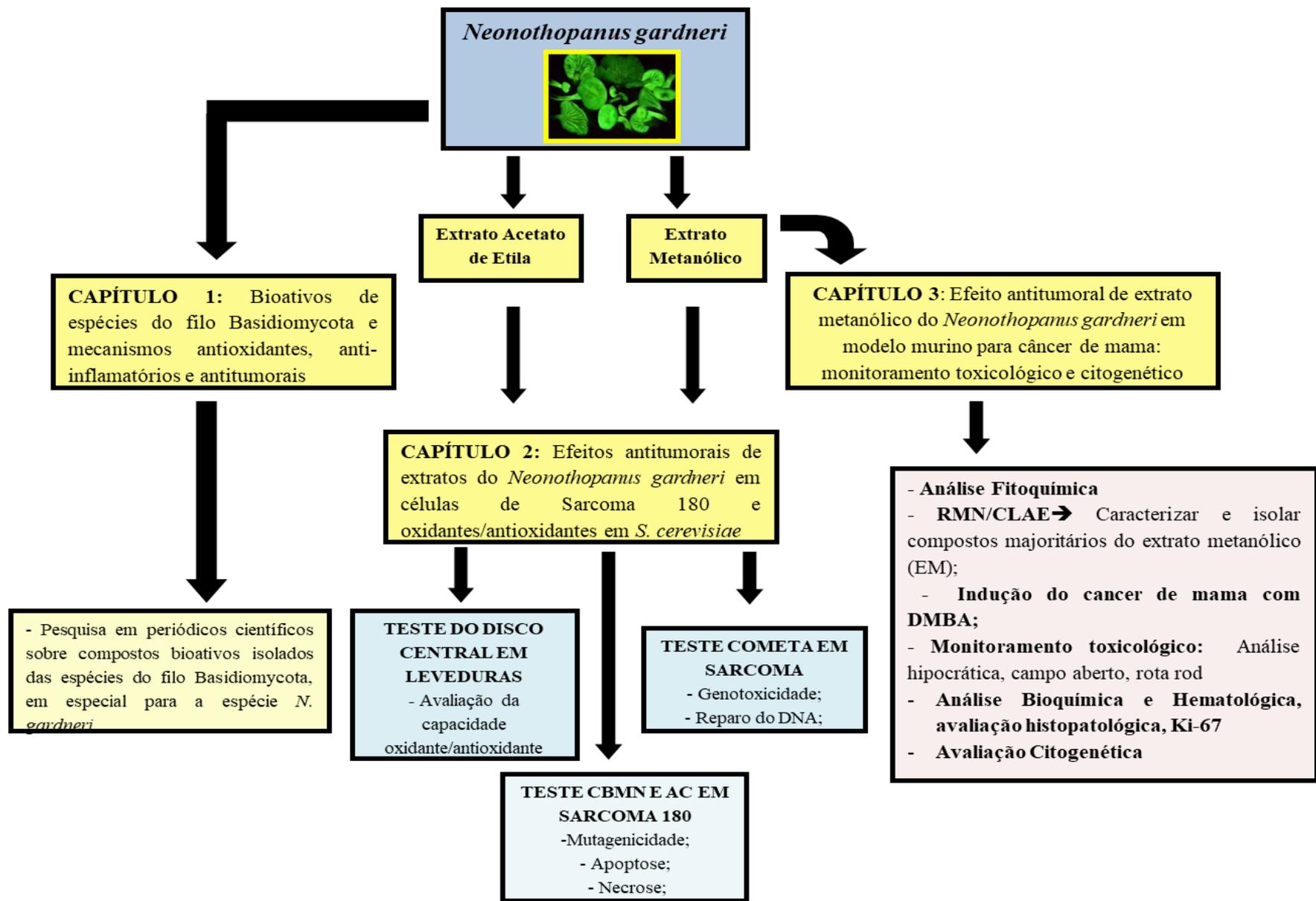
As drogas utilizadas no tratamento de neoplasias, de maneira geral, apresentam atividade citotóxica, agindo na inibição do crescimento celular. A maioria dos agentes quimioterápicos age não especificamente sobre células neoplásicas, afetando também as células normais, o que resulta em uma ampla gama de reações adversas em praticamente todos os tecidos do organismo (FREEDMAN; PATRIDGE, 2011). Chakraborty et al. (2012) relatam que as pesquisas sempre buscam uma maior seletividade, a fim de diminuir os efeitos colaterais em células normais. Assim, o desenvolvimento de novos princípios ativos, bem como sistemas de entrega de compostos ativos e o descobrimento de novos alvos de ação são fundamentais para o avanço na terapia oncológica.

Estudos sobre cogumelos com aplicações medicinais têm se expandido nos últimos anos. A explicação científica sobre as funções dos compostos derivados do cogumelo no sistema humano está sendo cada vez mais estabelecida (SHIRMILA e RADHAMANY, 2012). No que se referem às propriedades apresentadas pelos cogumelos, destacam-se as atividades: alimentares e nutracêuticas (CHANG; BUSWELL, 1996; LIN e LIN, 1997; RUBEL, 2006; FAN et al., 2006), antimicrobiana (POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006; FAN et al., 2006; IMITIAJ; LEE, 2007), antiviral (FAN et al., 2006), potencial para controle de doenças de plantas causadas por micro-organismos (KOBAYASHI; HIRAMATSU; AKATSUKA, 1997; DI PIERO; PASCHOLATI, 2004) e antitumoral (OLIVEIRA, 2015).

O cogumelo *Neonothopanus gardneri* (fungo bioluminescente) já foi encontrado nos estados do Piauí, Tocantins, Goiás e Maranhão (OLIVEIRA et al, 2013). Essa espécie é caracterizada por corpos de frutificação muito maiores e que emitem luz mais intensa do que os outros (VENTURA et al, 2015). Na literatura existem poucos estudos que caracterizem atividades biológicas do gênero *Neonothopanus*. Este estudo objetivou avaliar os efeitos toxicogênicos e antitumorais de extratos obtidos do *N. gardneri* em modelos murinos para Sarcoma 180 e para o câncer de mama, com aplicação de biomarcadores toxicogênicos (comportamentais, bioquímicos, hematológicos, histopatológicos, imunohistoquímico, genotóxico e citogênicos) implicados em mecanismos antitumorais.

A tese está dividida em três capítulos: O primeiro versa sobre uma revisão sistemática das atividades biológicas e farmacológicas de substâncias isoladas de fungos do filo Basidiomycota, incluindo a espécie *Neonothopanus gardneri*; o segundo capítulo relata as atividades dos extratos metanólico e acetato de etila obtidos do *N. gardneri* como oxidante e antioxidante frente aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em *Saccharomyces cerevisiae* e os efeitos antitumorais em células de Sarcoma 180; e no terceiro capítulo estão relatados os efeitos antitumorais do extrato metanólico de *N. gardneri* em modelo murino para câncer de mama induzido pelo DMBA (**Figura 1**).

Figura 1. Esquema representativo da tese.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar os efeitos toxicogenéticos dos extratos metanólico e acetato de etila obtidos do *Neonothopanus gardneri*, bem como os efeitos antitumorais do extrato metanólico em modelos murinos para Sarcoma 180 e para o câncer de mama.

### 2.2 Específicos

- Coletar e identificar o *N. gardneri* e obter os extratos metanólico e acetato de etila;
- Isolar e caracterizar alguns dos metabólitos secundários presentes no extrato metanólico de *N. gardneri* por cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear;
- Verificar os efeitos oxidantes/antioxidantes dos extratos metanólico e acetato de etila em *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas antioxidantes para as enzimas superóxido dismutase citoplasmática, mitocondrial e duplos mutantes, bem como para catalase e mutante;
- Avaliar os efeitos toxicogenéticos e antitumorais dos extratos metanólico e acetato de etila em modelos murinos para Sarcoma 180 (células do líquido ascítico) com aplicação do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos;
- Realizar o monitoramento toxicológico com os testes de campo aberto, rota rod e *screening* hipocrático, além do perfil hematológico, bioquímico, histopatológico e imuno-histoquímico durante a indução do câncer de mama com 7,12 – dimetilbenzantraceno e terapia com o extrato metanólico em camundongos fêmeas;
- Avaliar os efeitos toxicogenéticos e antitumorais dos extratos metanólicos em modelos murinos para câncer de mama (carcinoma ductal), com aplicação do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos.
- Caracterizar os mecanismos citogenéticos indicativos da atividade antitumoral do extrato metanólico de *N. gardneri* em camundongos fêmeas com carcinoma ductal em mama.
- Comparar a potencialidade antitumoral do extrato metanólico com quimioterápicos atualmente utilizados no tratamento do câncer.

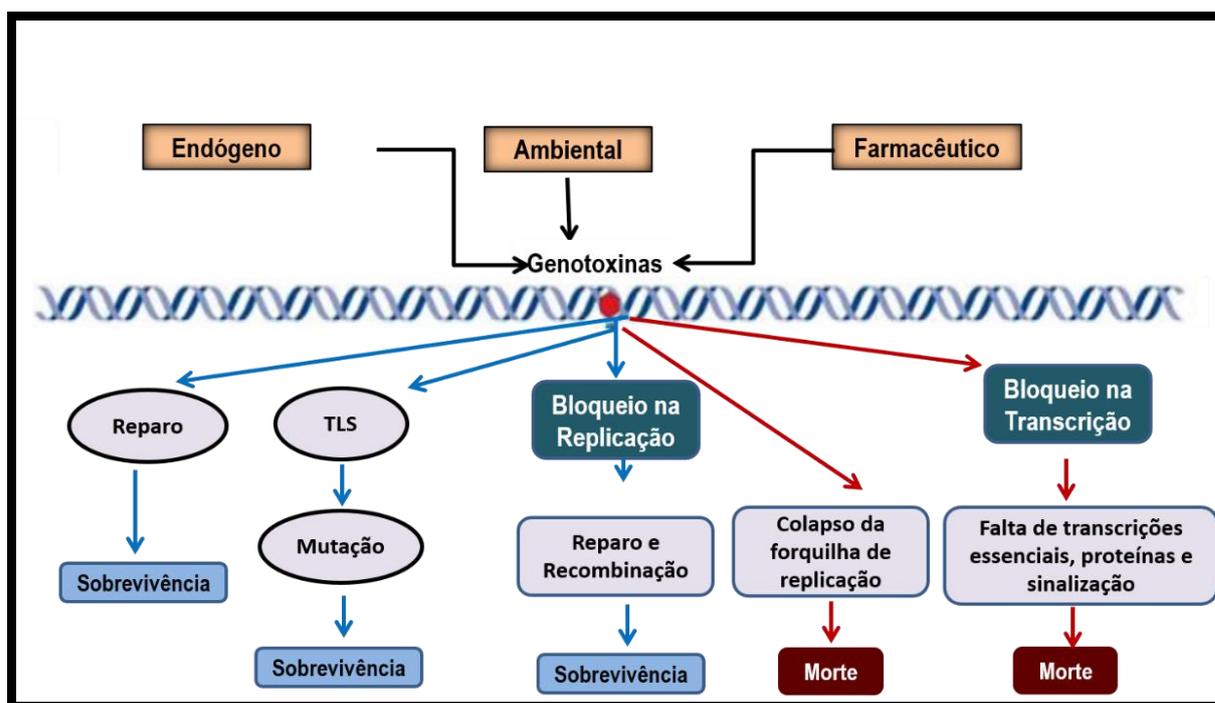
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 A instabilidade genética, reparo de DNA e câncer.

##### 3.1.1 Instabilidade genética

Como decorrência do progresso e da modernização, o homem vem sendo exposto a agentes químicos, físicos e biológicos, que podem induzir alterações ao material genético (THOMAS et al., 2011; AKHTAR et al., 2016). As células humanas são, diariamente, expostas a riscos de danos no seu material genético, cujas fontes podem ter origem exógenas (toxinas de plantas, raios UV, raios X e gama, químicos mutagênicos, quimioterápicos e vírus) e endógenas (produção de espécies reativas de oxigênio e geração de radicais livres, metabólitos de estrógenos, desaminações, alquilações), que podem ocasionar danos ao material genético. O aumento dos níveis de danos ao DNA e os mecanismos de reparos inefficientes são eventos moleculares de muitas patologêses e de muitas doenças relacionadas ao estilo de vida, tais como o câncer e as doenças neurodegenerativas, levando à instabilidade genética (**Figura 1**) (GUNASEKARANA, RAJ, CHAND, 2015; ROOS; THOMAS; KAINA, 2016).

**Figura 1.** Danos ao DNA e respostas celulares



Fonte: Adaptada de ROOS; THOMAS; KAINA (2016).

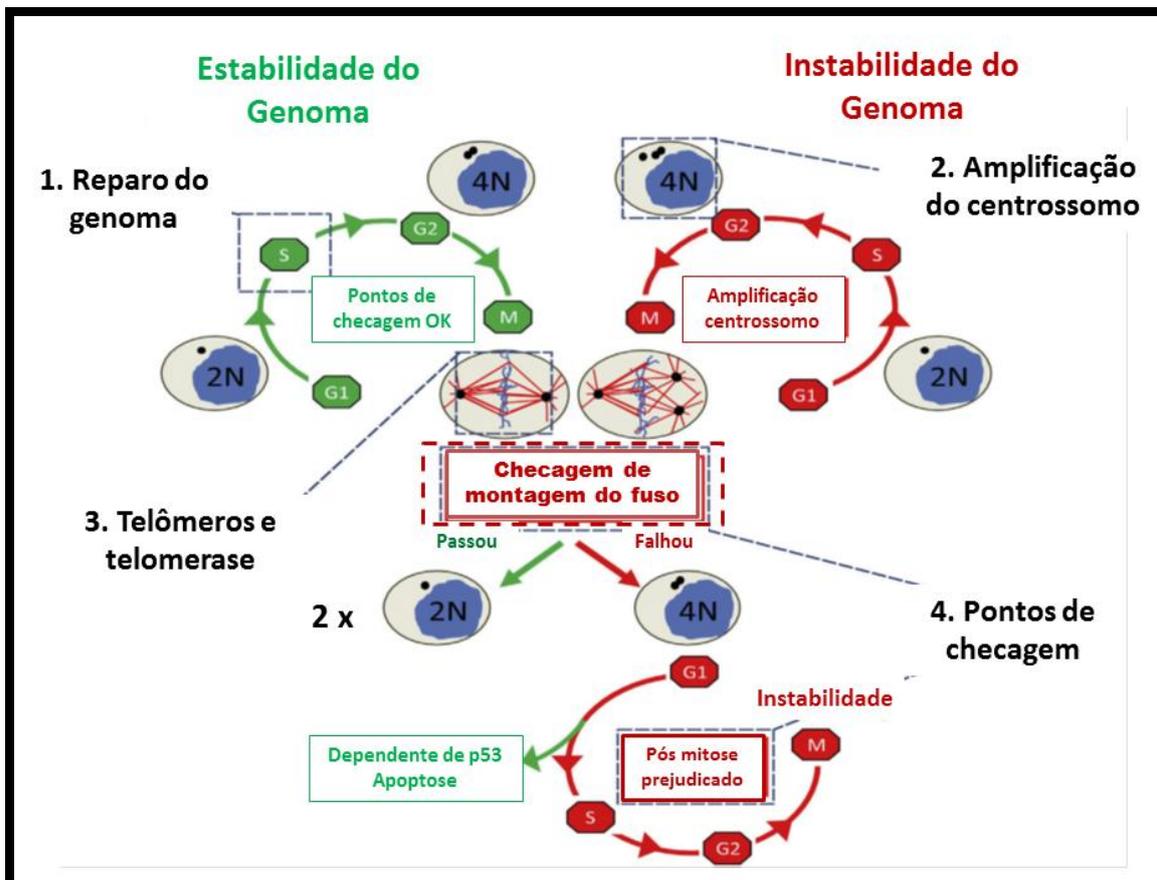
A molécula de DNA, embora tenha a importante função biológica de conter e transmitir a informação genética das células, não é inerte. O material genético está, continuamente, exposto a uma gama de agentes genotóxicos, que podem ocasionar lesões no DNA e, conseqüentemente, levar à instabilidade genética. A instabilidade genética se associa a uma maior propensão ao acúmulo de danos ao material genético (O'CONNOR, 2015). Quando o DNA é lesado, seja por quebras, ligação de aductos, deleção, inserção ou substituição de nucleotídeos (GAVANDE et al., 2016), ocorrem eventos inter e intracelulares a fim de detectar e reparar tais danos (KANG et al., 2015). Nesses eventos incluem-se a parada do ciclo celular, controle da replicação do DNA e reparo desses danos no DNA (CICCIA; ELLEDGE, 2010). Tem-se sugerido que todos os cânceres apresentam defeitos no reparo do material genético (GAVANDE et al., 2016).

De fato, os sistemas de reparo do DNA são mecanismos de defesa universais das células, e o seu bom funcionamento é fundamental para a manutenção da integridade do genoma (PUIGVERT; SANJIV; HELLEDAY, 2016). A instabilidade genômica leva ao acúmulo de mutações na molécula da vida, o DNA (BONASSI et al., 2011; BURRELL; SWANTON, 2014). A instabilidade genômica ocasiona sinalização ploriferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, indução da angiogênese, invasão e metástase, reprogramação do metabolismo energético, fugindo da destruição imunológica (WANG; LI 2014). Altos níveis de danos ao DNA são correlacionados com diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (COLLINS et al., 2014 (a); GOMES JÚNIOR et al., 2015; NIKOLAEV; YANG, 2017; TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017).

A idade, sexo e constituição genética se apresentam como fatores endógenos relacionados com a predisposição para o acometimento de mutações sobre a molécula de DNA. Hábitos de consumo e alimentação, exposição a medicamentos e outros agentes químicos, físicos e biológicos surgem como fatores exógenos aos organismos quanto à probabilidade de influenciarem alterações morfológicas no DNA. Estes agentes podem estar ligados a interferências funcionais, espontâneas ou induzidas, no material genético, o que irá gerar efeitos silenciosos ou não aos organismos (TORRES-BUGARÍN et al., 2014; BITGEN et al., 2016). Os agentes antineoplásicos apresentam atividade citotóxica (FREEDMAN E PATRIDGE, 2011) e tóxica (REIS-FILHO, 2006; JESUS et al., 2016) devido a danos ao DNA (URIOL et al., 2013).

Para a manutenção da estabilidade e integridade genômica celular se faz necessário o bom funcionamento da maquinaria de reparo de danos ao material genético, pois falhas nesse processo podem ocasionar alterações genômicas, tais como: aberrações cromossômicas (translocações, perda de cromossomos) e mutações, que levam ao início de alterações fisiológicas celulares, que iniciam o processo tumoral (BARTKOVA et al., 2005; KHANNA, 2015; CECCALDI; RONDINELLI; D'ANDREA, 2016; TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017). Ferguson et al. (2015) concordaram que a instabilidade genômica está envolvida no início, progressão e prognóstico do câncer; e apontaram os mecanismos de instabilidade genética, além das prioridades para a prevenção desta patologia, dentre os quais: prevenção de danos ao DNA, aumento da capacidade de reparo, diminuição de reparo deficiente, impedir o agrupamento de centrossoma e inibir atividade da telomerase. Durante a replicação do DNA, na fase S da divisão celular, ocorrem erros que podem ocasionar a segregação de cromossomos e levar às aneuploidias (**Figura 2**).

**Figura 2.** Instabilidade genômica e reparo de DNA



Fonte: Adaptada de FERGUSON et al. (2015).

Como relatado, diversos agentes danificam o DNA (metabólitos endógenos, carcinógenos ambientais, medicamentos, terapias oncológicas, radiações ionizantes e não ionizantes) e as células respondem a esses danos por diversos mecanismos de ativação de redes de sinalizações para reparo, sobrevivência ou para morte celular (VOULGARIDOU et al., 2011). Diversos fatores estão envolvidos nessa sinalização, tais como os de reconhecimentos dos danos, reparação (proteínas DDR, ATM, ATR, DNA PK, p53) tolerância, apoptoses, necroses, autofagia e senescência. Esses fatores, também, são alterados em terapias oncológicas. Entretanto, em baixos níveis de danos ao DNA são ativados diversos genes tais como: XPF, XPG, DDB2, XPC, XRCC1 (ROOS; THOMAS; KAINA, 2016).

O DNA lesionado segue, obrigatoriamente, três vias fisiológicas a depender da funcionalidade dos mecanismos endógenos relacionados à reparação de danos no material genético. Na ausência de reparação dos danos sobre o material genético, o mesmo perde as atividades, que seriam conferidas após a codificação genética daquele segmento. Caso o reparo seja incorreto, mutações podem ser geradas, por exemplo, pelo mau pareamento de bases nitrogenadas. Entretanto, quando o sistema de reparo responde corretamente, o DNA é completamente restaurado (FENECH, 2007). O não reparo ocasiona mutações e instabilidade genômica em tecidos normais (ECCLES; O'NEILL; LOMAX, 2011; NIKITAKI et al., 2016).

### 3.1.2 Instabilidade genética, estresse oxidativo e defesas antioxidantes

O dano celular causado pelos radicais livres parece ser um contribuinte importante para o envelhecimento e doenças degenerativas do envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imunológico, doenças hepáticas, diabetes *mellitus*, inflamação, insuficiência renal, dentre outras (HALLIWELL, 1994; KOZARSKI et al., 2015). Há cerca de 2,45 bilhões de anos, o oxigênio molecular foi introduzido em nosso ambiente pelos organismos fotossintéticos evoluindo em O<sub>2</sub> e as espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais estiveram presentes desde então na vida aeróbica (KUMP, 2008). Tais espécies se encontram relacionadas com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, aterosclerose, envelhecimento e, em especial, o câncer (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A molécula de O<sub>2</sub> pode gerar radical livre que conduz à geração de ERO's e pode danificar as células de todos os organismos. Um radical livre é um composto químico, que contém um ou mais elétrons não emparelhados em orbitais atômicos ou moleculares

(HALLIWELL, 1994). As moléculas reativas, tais como: o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), o íon hidroxila ( $OH^-$ ), o óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são radicais livres e formas moleculares não radicais, respectivamente derivadas de oxigênio molecular. Os radicais livres são instáveis e podem reagir com diversos compostos celulares. O cérebro está exposto a vários radicais livres, uma vez que estes participam de reações essenciais, são, constantemente, formados e podem se tornar prejudiciais quando sua produção se encontra superior ao normal pelos sistemas oxidantes (FREEMAN; KELLER 2012).

Os elétrons livres, que caracterizam o radical, estão geralmente nos átomos de oxigênio, enxofre e nitrogênio, culminando no surgimento das chamadas espécies reativas. Dentre estas, destacam-se as espécies reativas derivadas de oxigênio (ERO's), as derivadas de nitrogênio (ERN's) resultantes da decomposição do óxido nítrico (NO); e as derivadas de enxofre (ERE's), formadas a partir de reações de tióis com ERO's. Por sua vez, as ERO's incluem o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), oxigênio singlete ( $O^2$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e o radical hidroperoxila ( $HO^2\cdot$ ) (ABDALLA; FAINE, 2008; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Nos seres humanos, a oxidação é um processo que o corpo usa para produção normal de energia e função imunológica. Esta é a parte do processo que permite que o corpo transforme os nutrientes, tais como hidratos de carbono, gorduras e proteínas em energia. Durante a oxidação, as ERO's são produzidas em baixos níveis em condições fisiológicas normais, que são necessárias para manter funções celulares e os sistemas endógenos de defesas antioxidantes para evitar quaisquer efeitos nocivos. No entanto, ERO's em altas concentrações são, extremamente, prejudiciais para organismos. Quando seu nível excede os mecanismos de defesa, elas podem afetar muitas funções celulares por danificar ácidos nucleicos, oxidando proteínas e causando peroxidação lipídica (SÁNCHEZ, 2017).

As ERO's podem ser produzidas por fontes externas (por exemplo: fumo do tabaco, ozônio, estresse, etc.) ou como subprodutos durante o transporte de elétrons mitocondriais na respiração aeróbia ou por enzimas oxirredutases e oxidação catalisada por metal (CEDERBAUM; LU; WU, 2009). Pelo fato de serem reativos, os radicais procuram maneiras de emparelhar seu elétron. Assim, os radicais atacam, frequentemente, compostos químicos próximos. Estes compostos químicos podem estar envolvidos em reações enzimáticas importantes, podem ser componentes de paredes celulares, ou podem fazer parte de uma molécula de DNA. Se a sua estrutura química é alterada, a sua função na célula pode ser perdida e o resultado pode ser a senescência celular ou apoptose (SÁNCHEZ, 2017).

A neutralização de radicais livres ou radicais peróxidos por um agente antioxidante é importante para a proteção celular contra estresse oxidativo. Neste sentido, os antioxidantes são substâncias químicas que inibem a reação de oxidação dos radicais livres através da troca de um de seus próprios elétrons com as moléculas de radicais livres para estabilizá-los. Estes compostos podem ser antioxidantes endógenos ou obtidos com a dieta, tais como polifenol, vitamina A (carotenoides), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol),  $\beta$ -glicano ou proteínas e antioxidantes de baixo peso molecular, tais como ácido ascórbico (vitamina C), glutathione (GSH) (SÁNCHEZ, 2017). A glutathione pode ser a defesa intracelular mais importante contra os efeitos deletérios das ERO's. É um tripeptídeo (glutamil-cisteinil-glicina), que proporciona um grupo sulfidrílico exposto como alvo para ataque. As proteínas e enzimas de ligação a metais também são proteínas antioxidantes. As enzimas que podem combater a formação de radicais livres e a sua propagação são a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx); e enzimas que repararam ou eliminam danos contra biomoléculas, incluem: lipase, peptidase, transferase, entre outras (POPRAC et al, 2017).

As ERO's são poderosos agentes que danificam o DNA, causando rupturas, alterações em bases de guanina e timina e translocações entre cromátides irmãs. Essas alterações podem levar à inativação de genes supressores de tumores como o *p53* e ATM ou levar ao aumento da expressão gênica de proto-oncogenes (FERRAIUOLO et al., 2017).

A extensão desses danos ocasionados pelas ERO's pode ser potencializada ou minimizada a partir dos mecanismos de defesas antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. Enzimas tais como: a superóxido dismutase (SOD), que está presente no citosol e na mitocôndria, catalisa a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em  $H_2O_2$ . Esta enzima está presente na célula em sua isoforma com diferentes grupos prostéticos: isoforma SOD-cobalto citossólica e a SOD-manganês mitocondrial. A catalase (CAT) é uma hemoproteína tetramétrica citoplasmática codificada por um único gene em espécies de mamíferos, que converte o  $H_2O_2$  em oxigênio molecular e água. A glutathione peroxidase (GPx) catalisa a degradação de  $H_2O_2$  e hidroperóxidos provenientes da degradação de ácidos graxos insaturados. As vitaminas A, C, E, e selênio são importantes antioxidantes não enzimáticos de origem, especialmente, dietética (BARBOSA et al., 2010). Em síntese, o estresse oxidativo ocasionado por processos metabólitos endógenos (**Figura 3**), especialmente induzidos pelo peróxido de hidrogênio (radical superóxido) e óxido nítrico é neutralizado por enzimas antioxidantes, como citado anteriormente, a exemplo da SOD, GSH e CAT que podem prevenir a instabilidade genética ocasionada por danos oxidativo (IMAM et al., 2017).



mutacional nos diferentes tipos de tumores (LAWRENCE et al., 2014). Os antineoplásicos são agentes genotóxicos compatíveis com deficiências em reparo de DNA, e que também exercem influência na condução da resposta ao bloqueio do *checkpoint* imunológico. Cabe enfatizar que a deficiência de reparo de danos ao DNA, que leva à instabilidade genética é comum em tumores. Assim, o uso de biomarcadores para avaliar a instabilidade genética assume importância clínica nas terapias oncológicas (WU et al., 2016; ASATRYAN; KOMAROVA, 2016; MOUW et al., 2017).

As principais vias de reparo (**Figura 4**) utilizadas pelas células humanas são: reparo por excisão de bases (BER, do Inglês *Base Excision Repair*), que reparam bases modificadas, sítios abásicos e as quebras de cadeia simples de DNA (CALDECOTT, 2014); reparo de recombinação homóloga (HRR, do Inglês, *Homologous Recombination Repair*), e reparo de extremidades não homólogas (NHEJ, do Inglês, *Non-Homologous End-Joining*), que lidam com quebras de fita dupla de DNA (RADHAKRISHNAN; JETTE; LEES-MILLER, 2014; SHIBATA et al., 2014); reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do Inglês *Nucleotide Excision Repair*), corrige nucleotídeos modificados, que alteram a estrutura da dupla hélice do DNA (HOEIJMAKERS, 2009); reparo de emparelhamento errôneo (MMR, do Inglês, *Mismatch Repair*), que lida com erros de replicação (JIRICNY, 2006). Dessa forma, o reparo de diferentes tipos de lesões está condicionado a um conjunto de diferentes proteínas, que podem interagir entre elas para compor uma rede de proteção do genoma celular (O'CONNOR, 2015; CHATTERJEE; WALKER, 2017).

**Figura 4.** Danos ao DNA e mecanismos de reparo

<p><b>Agentes que danificam o DNA</b></p>	<p>Toxinas Agentes Alquilantes Desaminação de base Erros de Replicação</p>	<p>Danos Oxidativos Eletrófilos</p>	<p>Radiação Ionizante Radiação UV Agentes "crosslinking" Compostos aromáticos Calor, Frio, Hipóxia</p>
<p><b>DNA danificado</b></p>	 <p>Mismatch: Uracilo Sítios abásicos Aductos</p>	 <p>Lesão: Quebra de cadeia simples Quebra de cadeia dupla</p>	 <p>Grades lesões: Ligação inter e intra-fita Quebra de cadeia simples Quebra de cadeia dupla</p>
<p><b>Vias de reparo do DNA</b></p>	<p>Reparo mismatch Reparo por excisão de bases</p>	<p>Reparo por excisão de bases Reparo de quebra de cadeia simples Reparo de quebra de cadeia dupla</p>	<p>Reparo por excisão de nucleotídeos bases Reparo de ligação inter-fitas Reparo de quebra de cadeia simples Reparo de quebra de cadeia dupla Síntese translesão</p>

Fonte: Adaptada de CHATTERJEE; WALKER (2017).

### 3.1.4 Alterações genômicas e câncer

A instabilidade genômica leva ao acúmulo de mutações, passo inicial no processo da carcinogênese (BONASSI et al., 2011; BURRELL e SWANTON, 2014;). Assim, dados recentes apontam associação entre alterações genéticas e câncer (COLLINS et al., 2014(a)). O câncer é a segunda principal causa de morte no planeta, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, é considerado como um problema de saúde pública (BÜYÜKAVCU, ALBAYRAK e GÖKER, 2016). Pode ser considerado como o crescimento desordenado de células detentoras de potencial invasivo (SALEH et al., 2017). A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), documentos do *World Cancer Report* (2014) apontam para 2030 a incidência de 27 milhões de novos casos, com alta mortalidade (17 milhões de mortes) (VAIDYA; CHETLEN; SCHETTER, 2015).

Os agentes genotóxicos podem alterar a homeostasia metabólica celular, especialmente com as deficiências de reparo de DNA, o que gera a instabilidade genética (CHATTERJEE; WALKER, 2017). Os altos níveis de estresse oxidativo, supressão de danos

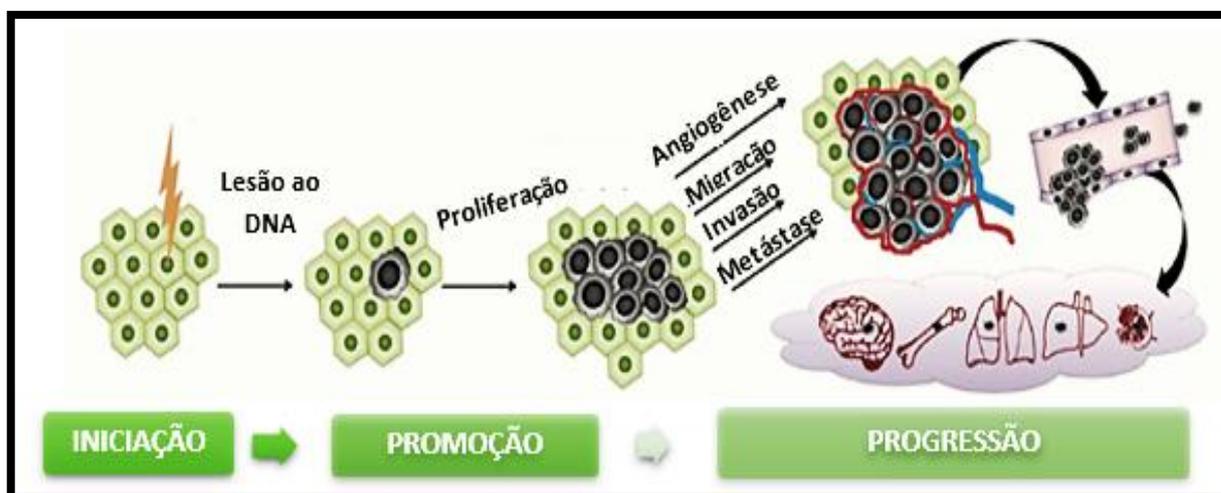
ao DNA e falhas no controle do ciclo celular contribuem na danificação do DNA e as perdas e falhas nos mecanismos de reparo assumem importância para a resposta da terapia oncológica (BURREL et al., 2013). Os danos ao DNA podem ser induzidos por agentes endógenos e exógenos físicos e químicos. Entretanto a maioria dos endógenos está relacionada com reações hidrolíticas e oxidativas, que geram espécies reativas de oxigênio, que podem alterar o DNA ocasionando doenças hereditárias e cânceres esporádicos (PERRONE, 2016). O acúmulo contínuo de eventos mutacionais, herdados ou adquiridos em uma célula normal, leva ao aparecimento de uma célula tumoral. Transformações celulares malignas e identificadas por alterações genéticas, nas vias de sinalização, que controlam a expressão de genes ligados a proliferação, diferenciação, apoptose celular e o crescimento celular são comuns no câncer (SANCHEZ-VEGA et al., 2018). Assim, ao longo desta transformação, uma célula pode vir a expressar uma proteína em níveis anormais ou até mesmo novas proteínas, que não tinham expressão anterior, perdendo o controle dos processos celulares tidos como vitais (ALEXANDROV et al., 2013).

Alguns estudos demonstraram que a capacidade das células cancerígenas para reparar danos no DNA, induzidos com a terapia anti-câncer, pode impactar na eficácia do tratamento (AUDEH et al., 2010; GARRETT; COLLINS, 2011; BEGG; STEWART; VENS, 2011; CARDNELL et al., 2013; WEBER; RYAN, 2015; BIXEL; HAYS, 2015). O tipo de reparo utilizado pela célula depende do tipo de dano e das vias de sinalização ativadas a partir desse dano (HOEIJMAKERS, 2001). Os genomas tumorais são mosaicos de variantes estruturais somáticas, que podem contribuir para a ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais (ESTELLER, 2007; ALAEI-MAHABADI et al., 2016). A extensão, os mecanismos envolvidos, bem como a ocorrência simultânea desses eventos mutacionais diferem inter e intratumores (PELTOMÄKI, 2012). Quando acontece alterações em um gene diretamente ligado à regulação do ciclo celular, surge uma desregulação entre proliferação e apoptose, podendo levar ao surgimento de tumores (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

As neoplasias podem ser classificadas como benignas ou malignas. Aquelas consideradas benignas são formadas por células bem diferenciadas, possuindo, ainda, estrutura típica do tecido de origem e mantém seu crescimento de forma organizada, geralmente lento, expansivo e não invade nem infiltra tecidos adjacentes. Já as neoplasias malignas, formam-se por células anaplásicas, na qual há a falta de diferenciação, crescimento rápido, além de possuírem um maior grau de independência e capacidade de se infiltrar em tecidos adjacentes vizinhos e provocar metástases (INCA, 2017).

O câncer é uma doença sistêmica que, inicialmente, apresenta manifestações locais, e posteriormente, avança em um processo de múltiplos passos, incluindo proliferação rápida, resistência à morte celular, neoangiogênese, invasão local e metástase a distância (ZAJICEK, 1978, HANAHAN; WEINBERG, 2011; LIU et al., 2015). Como relatado, o câncer envolve múltiplos estágios (**Figura 5**), apresentando eventos genotóxicos, causando alterações nos processos de transcrição, tradução e pós-tradução genética, e, conseqüente, alteração na proliferação celular, bem como na apoptose (morte celular) (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HERCEG, 2007). As etapas da carcinogênese podem ser divididas em três: iniciação, promoção e progressão (FARBER; CAMERON, 1980; LIU et al., 2015).

**Figura 5.** Fases do processo de carcinogênese



Fonte: Adaptada e modificada de: LIU et al. (2015). Legenda: As fases do processo de carcinogênese: Iniciação, promoção e progressão. A iniciação começa com lesão do DNA; a promoção é caracterizada por proliferação das células malignas; e na progressão ocorre o processo de metástase para outros órgãos e tecidos. As células verdes são as células normais; As células cinzas com núcleo preto são as células malignas.

Na etapa de iniciação, após danos ao DNA, as células apresentam processo de diferenciação celular descontrolado (PITOT, 2001; VINCENT; GATENBY, 2008), que leva ao acúmulo de alterações genéticas (FANG; GILLIES; GATENBY, 2008), mas não seria tumorigênica sem a estimulação ambiental (HENNINGSS et al., 1993; RUBIN et al., 2003; BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005; GATENBY; GILLIES, 2008; ZHANG et al., 2016). Como resultado dessas mudanças no microambiente tumoral, as células sofrem adaptações celulares e começam a mudar o metabolismo anaeróbico. Nestas condições as células mutantes se tornam bastante numerosas (VICENTI; GATENBY, 2008; EALES;

HOLLINSHEAD; TENNANT, 2016; ZHANG et al., 2016). Desta forma, as células iniciadas se multiplicam, gerando lesões pré-neoplásicas (PITOT, 2001; VICENTI; GATENBY, 2008).

A próxima etapa da carcinogênese é a progressão, que se refere às transformações seriadas de um tumor benigno para uma neoplasia e para malignidade (LIU et al., 2015). Nesta fase, é bastante notório o desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose, onde as células malignas se difundem cada vez mais para distâncias maiores. Desta forma o tumor consegue tamanho suficiente para alcançar a membrana basal, podendo, assim, atingir os vasos sanguíneos e conseguir atingir tecidos adjacentes (VICENTI; GATENBY, 2008). Além disto, estudos mostram que a progressão está associada a alterações cariotípicas, pois grande parte dos tumores avançados apresentam aneuploidia, com o número errado de cromossomos. Essa alteração é associada a um aumento na taxa de crescimento, invasividade, metástase e alterações na bioquímica e morfologia, devido às mutações contínuas ou à instabilidade genética (OLIVEIRA et al., 2007; LIU et al., 2015).

### 3.1.5 O câncer de mama

No Brasil, o câncer de mama corresponde, aproximadamente a 28% dos casos novos a cada ano. Ele acomete, de forma rara, os homens, representando apenas 1% do total de casos registrados. Antes dos 35 anos, a sua prevalência é baixa; mas, acima desta idade sua incidência cresce progressivamente, principalmente, após os 50 anos. Foram notificados 119.600 óbitos em homens, e 104.100 em mulheres, devido a neoplasias, sendo o câncer de mama o tipo que mais causou mortalidade entre mulheres (WHO, 2014). Se diagnosticado e tratado precocemente, o câncer de mama apresenta um bom prognóstico, sendo que a sobrevida média, após cinco anos do diagnóstico, é de aproximadamente 80% (INCA, 2014).

Um dos principais fatores de risco para desenvolvimento desta neoplasia é o fator hereditário. Diversos *loci* podem estar envolvidos na sua distribuição genética familiar, principalmente, devido a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (Breast Cancer Gene 1 e 2), que são importantes supressores tumorais e estão envolvidos no reparo ao DNA (ANDERSON; SCHWAB; MARTINEZ, 2014). A obesidade, também, é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento deste câncer, visto que mulheres obesas, no período pós-menopausa, apresentam um aumento do estradiol circulante, o que representa uma resposta diminuída ao tratamento quimioterápico (WOLIN; CARSON; COLDITZ, 2010; COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST, 2012; RAUSCH

et al., 2017). Além disto, a obesidade nessas mulheres é uma das principais causas de aumento dos níveis de estrogênio no sangue, o que causa um grande risco para o desenvolvimento da neoplasia mamária (SPRAGUE et al., 2011). A variação hormonal também constitui um importante fator de risco (CAVALIERI et al., 2000; OLDENBURG et al., 2007; SPRAGUE et al., 2011).

O câncer de mama acomete qualquer uma das células da glândula mamária, sendo considerados adenocarcinomas; e apresentam um grande espectro de características morfológicas, com diferentes subtipos histopatológicos, com cursos clínicos específicos para cada tipo (REIS-FILHO; LAKHANI, 2008; WEIGELT et al., 2009; WEIGELT; KREIKE; REIS-FILHO, 2009; WEIGELT; BAEHNER; REIS-FILHO, 2010). Os carcinomas de mama constituem o tipo de lesão maligna mais recorrente, mas podem ser encontrados diferentes tipos de sarcomas e linfomas (FATTANEH; DEVILEE, 2003; MAKKI, 2015).

Uma forma de categorizar o câncer de mama e avaliar o prognóstico e tipo clínico da doença, é classificá-lo de acordo com a avaliação do grau histológico, como o seu grau de diferenciação, atividade proliferativa e sua agressividade (ELSTON; ELLIS, 1991; RAKHA et al 2010; KUROZUMI et al. 2015). O carcinoma de mama pode ser dividido em carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e Carcinoma ductal invasivo (CDI) de tipo especial ou sem nenhuma outra especificação (não apresentam características suficientes para uma classificação do tipo especial) (WHO, 2014; TAVASSOLI; DEVILEE, 2017).

A OMS reconhece 18 tipos de câncer de mama, sendo 17 tipos histológicos distintos de CDI do tipo especial, e quatro variantes do CDI, sem nenhuma outra especificação (WHO, 2012; TAVASSOLI; DEVILEE, 2017), conforme listado na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Classificação dos tipos de carcinoma ductal invasivo de mama, segundo o tipo histológico.

<b>Carcinoma ductal invasivo de tipo especial</b>	<b>Carcinoma ductal invasivo sem nenhuma outra especificação</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Carcinoma lobular:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alveolar</li> <li>• Sólido</li> <li>• Pleomórfico</li> <li>• Tubulolobular</li> </ul> </li> <li>✓ Mucinoso               <ul style="list-style-type: none"> <li>• cistadenocarcinoma</li> </ul> </li> <li>✓ Células colunares e anel de sinete)               <ul style="list-style-type: none"> <li>• neuroendócrino</li> <li>• sólido</li> <li>• carcinoide atípico</li> <li>• pequenas células ou “<i>oat-cell</i>” e grandes células)</li> </ul> </li> <li>✓ Metaplásico               <ul style="list-style-type: none"> <li>• epitelial e mesenquimal misto e puro</li> <li>• epitelial (4 subgrupos)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Carcinoma com células gigantes;</li> <li>✓ Carcinoma com achados coriocarcinomatosos;</li> <li>✓ Carcinoma com achados melanóticos;</li> <li>✓ Carcinoma pleomórfico</li> </ul>

Fonte: Adaptado de WHO, 2012.

O câncer de mama é uma doença heterogênea, com múltiplos tipos de tumores intrínsecos (BARNARD; BOEKE; TAMIMI., 2015; BÜYÜKAVCU, ALBAYRAK e GÖKER, 2016; ARRARAS et al., 2016) e sua incidência em mulheres ultrapassa um milhão e meio de casos, especialmente em mulheres com 40 a 45 anos representando cerca de 20,9% do total; e as com menos de 40 anos, 9,4% (REVIRIEGO et al., 2016). Mais de 1,7 milhões de casos diagnosticados mundialmente (ABDEL-ZAHER E ELDEIB, 2016) e responsável pela quinta causa de morte mundial entre as mulheres (HUANG et al., 2016). Esta patologia, que, na década de 1970, ocupava o quarto lugar entre as causas de morte; atualmente, ocupa a segunda posição de incidência mundial (BÜYÜKAVCU, ALBAYRAK e GÖKER, 2016), ameaçando a primeira posição ocupada pelo câncer de pulmão (TAN; GILLIGAN; PACEY, 2015).

O Instituto Nacional Câncer e o Ministério da Saúde recomendam exames clínicos para mulheres com mais de 40 anos; e mamografia para as mulheres com mais de 50 anos. E adverte para mulheres, que pertencem a grupos de alto risco para câncer de mama, fazerem exames a partir dos 35 anos. Estudo das características clínicas e patológicas dos tumores em mulheres jovens é um desafio para ciência, que busca diminuir a taxa de mortalidade, bem como a incidência de metástase (DE DEUS MOURA, CARVALHO e BACCHI, 2015).

Kallel et al. (2015) relatam que o risco de câncer de mama aumenta em mulheres na pós-menopausa com níveis elevados de estrogênio, bem como nas mulheres com níveis elevados de andrógenos.

Compreender a heterogeneidade do câncer de mama, visando melhoria na prevenção, diagnóstico e sobrevivência, é prioridade da pesquisa científica. Recentes avanços na análise molecular e genética permitiram conhecer, mais ainda, a diversidade dos tumores. Tal fato permitiu estabelecer prognósticos exclusivos para os diferentes subtipos de câncer, uma vez que são detentores de capacidades distintas de respostas à quimioprevenção e a quimioterapia (BARNARD et al., 2015). A predisposição genética é um fator de risco para o câncer onde três genes estão envolvidos nas formas hereditárias desta neoplasia: TP53 na Síndrome *de Li-Fraumeni*, *BRCA1* e *BRCA2* (CHAJÈS; ROMIEU, 2014; KALLEL et al., 2015; DE DEUS MOURA, CARVALHO; BACCHI, 2015; INCA, 2017). A exposição a agentes mutagênicos e carcinogênicos, hábito nutricional, estilo de vida, tabagismo (FARAZI, 2014) e como relatado, idade reprodutiva, menarca, menopausa podem ser associadas a transformações neoplásicas (PATTERSON et al., 2013).

O câncer em mulheres jovens é mais agressivo com frequente recorrência e metástase, incluindo alta taxa de presença da mutação dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, além de superexpressarem *Her2*, o gene do fator de crescimento epidérmico humano (CHAJÈS; ROMIEU, 2014; INCA, 2017). No entanto, Boufettal, Noun e Samouh (2010) não encontraram diferenças significativas no que diz respeito a taxas de recorrência entre mulheres jovens e mais velhas, embora a literatura científica enfatize o câncer em idade jovem correlacionado a um mau prognóstico (KALLEL et al., 2015). Um estudo realizado por Sabiani et al. (2016) foi verificado, em pacientes com menos de 36 anos, uma taxa de recorrência local e metástase significativa em comparação com mulheres na faixa etária de 35 a 40 anos. Esses autores alertam que 2-7% das mulheres, na faixa de idade inferior a 40 anos, são diagnosticadas com câncer.

A incidência também pode ser associada à taxa crescente de obesidade, que está associada ao risco de hipertensão (CADOO et al., 2016). Benassi-Evans e Fenech (2011) relatam que indivíduos portadores de mutação no gene *BRCA1* têm maior sensibilidade a agentes mutagênicos, a exemplo do peróxido de hidrogênio e radiação gama. A amplificação do fator de crescimento *HER2* está associada a um fenótipo biológico agressivo e com risco de recorrência, mesmo em situações de linfonodos negativos (CADOO et al., 2016).

A prioridade das pesquisas clínicas e epidemiológicas é a compreensão da heterogeneidade do câncer na expectativa de melhorar a prevenção, diagnóstico e sobrevivência. Considerado uma doença heterogênea no que diz respeito à clínica e à morfologia, 80% dos tumores têm origem no epitélio ductal, caracterizados como carcinomas ductal invasivo. No entanto, como se trata de um grupo heterogêneo de doença, há outros subtipos de carcinomas relatados na literatura como o lobular, o tubular, o mucinoso, o medular, o micropapilar e o papilar (INCA, 2017).

### 3.1.6 Sarcomas

Os dados epidemiológicos da incidência dos diferentes tipos de sarcoma no Brasil são bem escassos. Um estudo realizado por Passos e colaboradores (2018) em uma instituição de referência no Brasil, demonstrou em uma análise retrospectiva, desde 1980, de prontuários de 360 pacientes, que a idade média de diagnóstico foi de 45 anos 42,8% dos casos eram do sexo masculino e 57,2% dos pacientes do sexo feminino. A prevalência de localização foi a seguinte: 5% dos casos em cabeça e pescoço; 4,7% na região do tórax; 14,7% no abdome; 3,3% nas costas; 15% nos membros superiores; 36,5% nos membros inferiores; e 6,4% na pélvis e no períneo.

No Brasil, a incidência em 2017 foi de 6,67 por milhão, para a faixa de 0 a 14 anos; e de 7,54 por milhão para a faixa de 0 a 19 anos, com elevada morbidade e mortalidade geral em crianças e adolescentes do que em adultos (INCA, 2017). Apesar da etiologia dos sarcomas ainda ser pouco conhecida, a predisposição genética e exposição ambiental estão associadas a sarcomas específicos (FROEHNER; WIRTH, 2001). Existem relatos de que exposição ao cloreto de vinila, utilizada, extensivamente, na indústria de plásticos, tem sido claramente associada ao desenvolvimento de angiossarcoma hepático (ELLIOTT; KLEINSCHMIDT, 1997; COLLINS et al., 2014(b)). Também foi descrito que as radiações de 5.000 cGy (RUBINO et al., 2005) podem ser associadas a sarcomas.

Os sarcomas são derivados de tecidos mesenquimatosos (camada mesodérmica embrionária), que compreendem menos de 10% de todos os tipos de câncer (RIGGI et al., 2007; CHEN et al., 2010). Podem ser classificados devido seu caráter heterogêneo em sarcoma ósseo primário e sarcoma de tecido mole (SKUBITZ; D'ADAMO, 2007). O sarcoma ósseo primário inclui, principalmente, osteossarcoma, sarcoma de Ewing e condrossarcoma; sarcoma dos tecidos moles incluem, principalmente, leiomiossarcoma, sarcoma sinovial, rabdomiossarcoma e lipossarcoma (YOUN; MILANO; CONSTINE, 2014).

Entretanto, essa classificação foi mais bem definida com as análises de alterações moleculares e/ou patológicas (JEMAL et al., 2006), o que favoreceu a eficácia de terapias mais específicas (WARDELMANN et al., 2010). Os sarcomas podem ser definidos por sua patologia molecular. Análises citogenéticas apontaram para origem genética (MARIÑO-ENRÍQUEZ, 2015; MARIÑO-ENRÍQUEZ; BOVÉE, 2016), como relatado a presença de alterações na via do retinoblastoma (RB), indicando que mutações do alelo *RB* estão associadas com maior risco de desenvolver sarcomas (CHAUVEINC et al., 2001).

A exposição a radiações em pacientes com alterações do *RB* aumenta o risco para sarcomas (KLEINERMAN et al., 2005). Também existem relatos de que a síndrome de *Li-Fraumeni*, causada por mutações em *TP53*, aumenta predisposição para rhabdomyosarcoma (MALKIN et al., 1990; TRAHAIR; ANDREWS; COHN, 2007; GONZALEZ et al., 2009; MAGNUSSON et al., 2012) e mutações em *NFI* (neurofibromatose tipo I), também, estão relacionadas ao sarcoma (KING et al., 2000). As análises citogenéticas apontaram para cariótipos de maioria diploides simples, com poucos rearranjos cromossômicos, e complexos oriundos de instabilidade genética (HELMAN; MELTZER, 2003), considerando os mecanismos genéticos subjacentes à sarcomagenese (JAIN et al., 2010; TAYLOR et al., 2011).

Embora a cirurgia seja a principal abordagem para tratar a maioria dos sarcomas, a radioterapia também é empregada (STEEN; STEPHENSON, 2008), como também a quimioterapia sistêmica com doxorubicina e ifosfamida (KASPER et al., 2007) e em sarcomas pediátricos, a quimioterapia seguida de cirurgia e/ou radioterapia (CHA et al., 2004; KAUSHAL; CITRIN, 2008). Entretanto, ainda são necessárias novas abordagens para a doença metastática (SHENG; MOVVA, 2016).

Os sarcomas são um grupo de tumores malignos heterogêneos de origem mesenquimal, caracterizados por mais de 100 subtipos distintos (BRENNAN; ANTONESCU; MAKI, 2013; D'ANGELO, et al., 2014; KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016), dentre eles estão o fibrossarcoma, lipossarcoma, leiomiossarcoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma epiteloide, e outros, dependendo do seu tecido de origem (GUILLÉN; COCKERELL, 2001; SEGAL et al., 2003; HALDAR et al., 2007; SOUZA; SIQUEIRA, 2014).

Os sarcomas atingem todas as idades, mas, assim como os carcinomas, são mais comuns em pacientes mais idosos. Aproximadamente 15% dos casos ocorrem em indivíduos com idade inferior a 15 anos, e cerca de 40% atingem pacientes com idade superior a 55 anos.

É importante ressaltar que são mais comuns no sexo masculino. Entretanto, incidências de gênero e idade exibem variações entre os tipos histológicos (FLEURY JR, 2006).

Esses tumores são mais comuns nos ossos, músculos, tendões, cartilagens, nervos, gordura e vasos sanguíneos dos braços e pernas; mas, também, podem acontecer em outras áreas do corpo. Embora existam mais de 100 tipos de sarcoma, eles podem ser agrupados em dois tipos principais: sarcoma de partes moles e sarcoma ósseo ou osteossarcoma (MATSUMOTO et al., 2002; SAWAIZUMI; IMAI; MATSUMOTO, 2013).

Os sarcomas de tecidos moles (STM) são neoplasias raras, correspondendo a menos de 1% de todas as neoplasias malignas em adultos. No entanto, têm grande impacto para os pacientes por suas implicações terapêuticas e prognósticas (WEISS; GOLDBLUM, 2001; FLETCHER, 2013). Nos EUA, 12.390 novos casos de STM são diagnosticados a cada ano com 4.990 mortes. A incidência, tanto nos Estados Unidos quanto na Europa, gira em torno de 3-4 casos a cada 100.000 habitantes (STILLER et al., 2013; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). No Brasil não existem dados exatos; porém, sabe-se que em São Paulo no ano de 1998 foram diagnosticados 164 casos novos em homens e 222 em mulheres por 100 mil habitantes (ISHIHARA, 1998).

Os STM são tumores malignos extra-esqueléticos de origem celular mesenquimal. São classificados de acordo com o tecido normal, a qual eles se assemelham; por exemplo, rabdomiossarcoma (músculo esquelético), fibrossarcoma (tecido conjuntivo), neurofibrossarcoma (tecido nervoso), leiomiiossarcoma (músculo liso), lipossarcoma (tecido adiposo), sarcoma sinovial e angiossarcoma. Além disso, existem outros sarcomas de tecido mole considerados mais raros, como por exemplo: o sarcoma alveolar de partes moles e o sarcoma extra-ósseo de Ewing (DE VITA, et al., 2001; COINDRE, et al., 2001; CORMIER; POLLOCK, 2004; ERIKSSON, 2010; SULTAN et al., 2010; FLETCHER, 2013; PETER; DENIS, 2018).

Dentre os subtipos, os STM considerados mais comuns na população adulta são os sarcomas que se originam em extremidades, seguidos pelos sarcomas originados no tronco; enquanto o rabdomiossarcoma é considerado o tipo mais comum na infância (COINDRE, et al., 2001, CORMIER; POLLOCK, 2004; ARIFI et al., 2015). Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença incluem exposição à radiação externa, com período de latência de 10 anos, exposição ocupacional a agentes químicos, como herbicidas, ácidos fenoxiacéticos e clorofenóis e pacientes com linfedema crônico (CORMIER; POLLOCK, 2004)

O sarcoma sinovial é uma neoplasia agressiva que corresponde, aproximadamente, 10% a 20% dos sarcomas de partes moles em adolescentes e adultos jovens. É, tipicamente,

diagnosticado em adultos com idade média de 35 anos, havendo uma ligeira predileção pelo sexo masculino (LADANYI et al., 2002; HERZOG, 2005). Se apresenta como moderadamente sensível à quimioterapia citotóxica, com agentes como ifosfamida e antraciclinas (SPURRELL et al., 2005; AL-HUSSAINI et al., 2011). Difere das formas mais comuns de câncer em virtude de ter uma complexidade genética muito menor. Os sarcomas metastáticos e os recorrentes apresentam maior complexidade cromossômica (PRZYBYL et al., 2014). Geralmente, os tumores exibem figuras mitóticas, com poucos corpos apoptóticos. Na maioria dos casos, a progressão do tumor se dá de maneira lenta, de recorrência tardia e apresentando resistência à quimioterapia, o que é consistente com um fenótipo antiapoptótico (PELMUS et al., 2002). O tratamento se baseia na remoção cirúrgica ampla com radioterapia adjuvante ou neoadjuvante, que apresenta uma boa chance de cura para doença localizada (SULTAN et al., 2009).

Ao analisar os casos de STM, nenhum fator etiológico característico é reconhecível. Porém, há causas reconhecidas que podem desencadear a doença, como: radioterapia, exposição química, quimioterapia, linfedema crônico, predisposição genética e trauma e corpo estranho (CORMIER et al., 2003; PISTERS et al., 2004).

Os STM são onipresentes no seu local de origem, podendo desenvolver-se em qualquer parte do corpo e são, frequentemente, tratados com multimodal. Uma abordagem multidisciplinar é, portanto, obrigatória em todos os casos, envolvendo patologistas, radiologistas, cirurgiões, radioterapeutas, médicos oncologistas e oncologistas pediátricos, bem como especialistas em medicina nuclear e em órgãos (ESMO, 2014; RAVI, PATEL, BENJAMIN, 2015; ISSELS et al., 2018). Esses tumores apresentam potencial para estabelecer doença metastática; no entanto, o seu comportamento é dependente do subtipo histopatológico, tamanho e grau dos tumores, podendo variar de uma doença indolor com baixo potencial metastático, até uma doença que pode ser fatal em poucos meses (RAVI, PATEL, BENJAMIN, 2015).

O tratamento padrão para a maioria dos pacientes com STM localizado, do tipo adulto, é a cirurgia e radioterapia pré e pós-operatória. A radioterapia não é necessária quando o tumor se encontra localizado dentro de um compartimento ou é menor ou igual a 5 cm (CAHLON et al., 2012; BEANE et al., 2014). A quimioterapia adjuvante não é um padrão para o tratamento desses tipos de sarcoma, sendo mais utilizadas em caso de pacientes que apresentam alto risco. A quimioterapia padrão de STM é baseada em antraciclinas, como

tratamento de primeira linha (CORMIER; POLLOCK, 2004; REICHARDT, 2014; ISSELS et al., 2018).

A maioria dos sarcomas de partes moles é recorrente nos dois primeiros anos após o término da terapia. A história e o exame físico são os componentes mais úteis do acompanhamento para identificar possíveis recidivas locais após o tratamento definitivo. Estes devem ser realizados a cada três meses e radiografia de tórax deve ser feita a cada seis meses durante os dois ou três anos. A maioria dos especialistas recomenda que o local do tumor seja avaliado a cada seis meses por ultrassonografia ou ressonância magnética em pacientes com tumores de extremidade; ou por tomografia em pacientes com tumores intra-abdominais ou retroperitoneais (VANEL et al., 1994; LEWIS, 1998, CORMIER; POLLOCK, 2004).

Os sarcomas ósseos são, ainda, mais incomuns que os sarcomas de tecido mole, sendo responsáveis por 0,2% de todos os novos diagnósticos de câncer. Apesar de sua raridade, foi relatado ser o terceiro câncer mais comum na adolescência, fase em que linfomas e tumores cerebrais aparecem nas primeiras posições. Vale ressaltar que é extremamente raro em crianças antes dos cinco anos de idade (OTTAVIANI; JAFFE, 2010; KAGER, et al., 2010, LUETKE, et al., 2014).

Estes tumores, geralmente, são localmente agressivos e tendem a produzir metástases sistêmicas precoces (RAYMOND; JAFFE, 2009). Exigem uma predileção por ocorrer na metáfise dos ossos longos e mais, comumente, no fêmur distal (43%), tíbia proximal (23%) ou úmero (10%). A apresentação típica inclui o aparecimento de dor e inchaço no osso afetado (BIELACK, et al., 2002; ISAKOFF, et al., 2015).

O subtipo histológico tende a estar relacionado com a idade de diagnóstico onde, por exemplo, o osteossarcoma e sarcoma de Ewing são mais comuns em crianças e adolescentes. Embora o sarcoma ósseo afete, principalmente, a população mais jovem, certos tipos apresentam uma predileção pela população adulta, como o condrossarcoma que é, tipicamente, diagnosticado entre os 30 e 60 anos, e é o subtipo mais comum de sarcoma ósseo em adultos (DURFEE; MOHAMMED; LUU, 2016; KUMAR et al., 2018, STRAUSS; WHELAN, 2018).

No momento do diagnóstico de osteossarcoma, cerca de 10 a 20% dos pacientes apresentam evidência macroscópica de doença metastática, mais comumente (90%) nos pulmões. No entanto, as metástases também podem se desenvolver raramente nos gânglios linfáticos (8-10%). Um total de 30% a 40% dos pacientes com doença localizada

desenvolverão recorrência local ou distante (BACCI, et al., 2006; CHOU; GELLER; GORLICK, 2008; LUETKE, et al., 2014). Aproximadamente 90% das recaídas são metástases pulmonares que, geralmente, ocorrem nos primeiros dois a três anos. A recidiva, cinco anos após o tratamento inicial, é incomum, ocorrendo entre 1% e 2% de todos os pacientes com osteossarcoma (BACCI, et al., 2008 ; ERRANI, et al., 2011; LUETKE, et al., 2014).

A terapia para o tratamento dos diversos tipos de osteossarcoma vem sido descrita na literatura médica desde meados do século XIX, onde era marcada, principalmente, pela amputação. Hoje, o tratamento avançou para cirurgias complexas, que poupam os membros, juntamente com a utilização da quimioterapia (ISAKOFF, et al., 2015). No entanto, a ressecção cirúrgica completa, se possível, permanece essencial para cura. As atuais estratégias cirúrgicas se concentram em refinar a ressecção com o objetivo de preservar os tecidos não envolvidos, bem como utilizar novos tecidos esqueléticos e moldes biológicos e não biológicos como métodos de reconstrução para otimizar a função (YASKO, 2009; LUETKE, et al., 2014).

A quimioterapia tem sido utilizada, atualmente, no pré-operatório e pós operatório, após a remoção da doença, incluído as metástases. O osteossarcoma é considerado resistente a aplicações de radioterapia. Abordagens terapêuticas suplementares, como a quimioembolização ou angioembolização, ablação térmica, ablação térmica por radiofrequência e crioterapia tem sido utilizadas em pesquisas experimentais para o tratamento da doença (CHOU; GELLER; GORLICK, 2008; SCHWARZ , et al., 2009; ERRANI, et al., 2011; LUETKE, et al., 2014).

Recentemente, a maioria dos esquemas quimioterápicos aplicados foi baseada em torno de quatro drogas; metotrexato em altas doses (HDMTX) com resgate de leucovorina, doxorubicina (adriamicina), cisplatina e ifosfamida (TA, et al., 2009; ; LUETKE, et al., 2014). Estes agentes foram integrados em vários protocolos quimioterápicos. A quimioterapia pré-operatória "neoadjuvante" é, geralmente, administrada por um período de cerca de oito a dez semanas antes da cirurgia. Segue ressecção cirúrgica e um breve lapso para permitir a cicatrização de feridas, a quimioterapia adjuvante pós-operatória é mantida por um período de outras 12–29 semanas (GELLER; GORLICK, 2010; SMELAND, et al., 2011).

No Quadro 1, temos a classificação histológica dos sarcomas de tecidos moles cutâneos.

**Quadro 1.** Classificação Histológica dos Sarcomas de Tecidos Moles Cutâneos.

<b>Tumores Fibrosos</b>	Intermediários	Fibromatose do adulto (incluindo palmar, plantar, peniana e <i>knuckle pads</i> ) Fibrossarcoma infantil
	Malignos	Fibrossarcoma do adulto Mixofibrossarcoma Sarcoma fibromixoide de baixo grau
<b>Tumores Fibro-histiocíticos</b>	Intermediários	Fibroxiantoma atípico Dermatofibrossarcoma protuberans (incluindo a forma pigmentada de Bednar) Fibroblastoma de células gigantes Fibro-histiocitoma angiomatoide
	Malignos	Fibro-histiocitoma maligno
<b>Tumores Lipomatosos</b>	Intermediários	Lipoma atípico (lipossarcoma bem diferenciado superficial / tumor lipomatoso atípico)
	Malignos	Lipossarcoma (bem diferenciado, mixoide - células redondas, pleomórfico, indiferenciado)
<b>Tumores de músculo liso e lesões relacionadas</b>	Malignos	Leiomiossarcoma
<b>Tumor de músculo esquelético</b>	Maligno	Rabdomiossarcoma
<b>Tumores de vasos sanguíneos e linfóides</b>	Intermediários	Hemangioendotelioma
	Malignos	Angiossarcoma Sarcoma de Kaposi
<b>Tumores perivasculares</b>	Malignos	Tumor glômico maligno Hemangiopericitoma maligno/ Tumor fibroso solitário maligno
<b>Tumores de bainha neural periférica e lesões relacionadas</b>	Malignos	Tumor maligno de bainha perineural (TMBNP)
<b>Tumores paraganglionares</b>	Maligno	Paraganglioma maligno
<b>Tumores ósseos e cartilagosos extra-esqueléticos</b>	Maligno	Condrossarcoma Osteossarcoma extra-esquelético
		Sarcoma sinovial

<b>Tumores Miscelânea</b>	Maligno	Sarcoma alveolar de partes moles Sarcoma epitelióide Tumor desmoplástico de células redondas pequenas Tumor rabdoide extra-renal maligno
---------------------------	---------	---

Fonte: Adaptado de Enzinger & Weiss, 2001.

### 3.2 Quimioterapia no câncer

Diversos protocolos são usados ao tratamento quimioterápico do câncer de mama, entre eles: FAC (Fluorouracil + Doxorrubicina + Ciclofosfamida) nas doses de 500/50/500 (mg/m<sup>2</sup>) a cada 21 dias por 6 ciclos; e AC (Doxorrubicina + Ciclofosfamida) nas doses de 60/600 (mg/m<sup>2</sup>), a cada 21 dias por quatro ciclos, seguido ou não de paclitaxel (Taxol) 80 mg/m<sup>2</sup> semanal por 12 ciclos (protocolo AC-T). O tratamento adjuvante, que consiste em quimioterapia após cirurgia, é orientado a todas as mulheres com risco elevado de recorrência neoplásica, todas com linfonodos axilares acometidos, pacientes com tumores maiores que 1cm de diâmetro, mesmo sem comprometimento linfonodal axilar; e, pacientes sem acometimento linfonodal, com qualquer diâmetro tumoral, mas com grau celular indiferenciado e idade inferior a 35 anos (GUIMARÃES, 2004; LYMAN et al., 2013).

O protocolo AC tem aplicação terapêutica no tratamento neoadjuvante, ou seja, antes da cirurgia para a redução do tumor, sendo considerado como padrão terapêutico em pacientes com câncer avançado (VRIENS et al., 2013), com efetividade para quimioterapia pós-operatória, com sobrevida de pacientes com câncer de mama primário operável (FISHER et al., 1990; VON MINCKWITZ, 2013). O protocolo AC-T é comumente usado em recidiva, detentores de linfonodos positivos de uma doença mais agressiva. Consiste na associação de 60 mg/m<sup>2</sup> de doxorrubicina e de 600 mg/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida, 80 mg/m<sup>2</sup> de taxol, semanalmente, durante 12 semanas. O taxol pode atuar em células que estão em divisão, bloqueando a despolimerização dos microtúbulos no ciclo celular. No final da mitose, pode resultar em efeitos clastogênicos ou aneugênicos, podendo ocasionar a formação de micronúcleos (SPARANO et al., 2018). Os agentes quimioterápicos induzem danos mutagênicos e clastogênicos ao DNA, incluindo adutos de DNA, erros de replicação, quebras e ligações cruzadas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; GUERREIRO et al., 2013).

É fato que os subtipos de câncer de mama têm prognósticos próprios com respostas à quimioprofilaxia e à quimioterapia distintas. Desvendar esses comportamentos, além de auxiliar na compreensão da etiologia do tumor, é fundamental para o desenvolvimento de

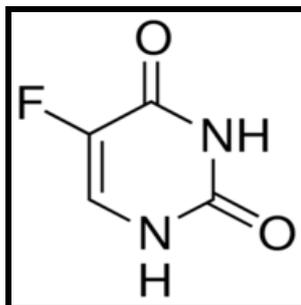
estratégias de prevenção (BARNARD; BOEKE; TAMIMI, 2015). A falta de especificidade e seletividade no tratamento do câncer resulta em efeitos prejudiciais ao paciente por inteiro. Esta situação induz a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens com ênfase na compreensão de alterações dos mecanismos envolvidos para síntese de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, potencialmente relacionados com o desenvolvimento do câncer. A monitorização bioquímica, também poderá ser uma importante ferramenta que leve a compreender melhor a biologia do câncer, resultando em diagnóstico precisos e sucesso nos tratamentos (ALMEIDA et al., 2005; ABRAMCZYK; BROZEK-PLUSKA, 2016).

Os quimioterápicos apresentam distintos mecanismos de ação e são classificados em: agentes análogos da pirimidina (citarabina, 5-fluorouracil, gencitabina, tegafur e 5-azatidina); antraciclinas (dactinomicina, doxorubicina, daunorrubicina e idarrubicina); agentes alquilantes (ciclofosfamida, clorambucila, melfalana e mecloretamina); nitrosureias (carmustina, lomustina, semustina e estreptozocina); triazenos (procarbazina e dacarbazina); derivados da platina (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina); antimetabólitos, como os antagonistas do ácido fólico (metotrexato, perimetrexato e raltitrexato), os análogos da purina (mercaptopurina, tioguanina e cladribina) e os antagonistas da adenosina (pentostatina e fludarabina); os agentes inibidores dos microtúbulos, como os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel); os antibióticos, e os inibidores das topoisomerasas (irinotecano, topotecano, etoposídeo e teniposídeo) (SILVA, 2006; CHEUNG-ONG, GIAEVER ; NISLOW, 2013).

### 3.2.1 Agente análogo sintético de purimidina - Fluorouracil (5-Fu)

O 5-Fu (**Figura 6**) é um antimetabólito inibidor da síntese de monofosfato de timidina - TMP (HEIDELBERGER et al., 1957), que induz citotoxicidade devido à ação de enzimas intracelulares 5-fluoro-uridina-5'-trifosfato (FUTP), 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) e 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-difosfato (FdUDP) (PARKER; CHENG, 1990; ZHAO et al., 2010). A FUTP causa danos ao RNA pela substituição da UTP a FdUDP após a ação de DNA polimerase, substitui a timidina-5'-trifosfato (TTP) e incorpora-se ao DNA, impedindo sua síntese (GREM, 1997; TOKUNAGA et al., 2000).

**Figura 6.** Estrutura química do 5- Fluorouracil.



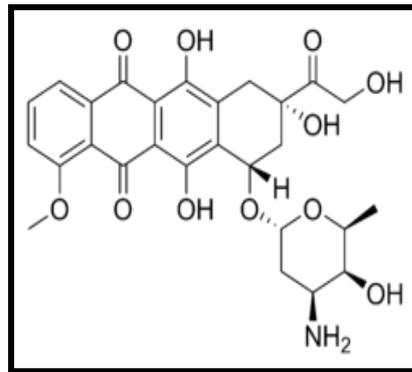
O 5-Fu vem sendo aplicado em terapias de cânceres gastrointestinal, mama, de próstata, cânceres de células escamosas do colo uterino, adenocarcinoma, e em tumores ginecológicos (LUJÁN et al., 2002; ZHAO et al., 2010; RAHANGDALE et al., 2014). Entretanto, estudos apontam que o antineoplásico induz cardiotoxicidade e inibição da produção de hemácias pela medula óssea (DE FORNI et al., 1992; MAHONEY et al., 2014).

### 3.2.2 Antraciclina- Doxorrubicina (DOX)

A DOX (**Figura 7**) isolada a partir de *Streptomyces peucetius* causa toxicidade pela geração de ERO's, utilizando dois mecanismos distintos: ciclagem redox, através do qual produz quinona e os radicais de oxigênio; e um tipo de reação de *Haber-Weiss*, catalisada pelo complexo de Fe-DOX, através do qual são gerados radicais •OH (KASAPOVIĆ et al., 2010).

Entretanto, estudos relatam que esta antraciclina impede a topoisomerase II de se religar às fitas de DNA, o que resulta em quebras duplas nesta molécula (MINOTTI et al., 2004; MARSH; LIU, 2009) que pode ser incorporado ao DNA e inibir síntese de proteínas (KIM et al., 2014). Sua ação sobre a topoisomerase II pode induzir eventos genotóxicos letais (KIM et al., 2017). Ao se intercalar com o DNA pode oxidar, metilar e alquilar esta molécula, resultando na formação de pontes entre as cadeias. Pode induzir estresse oxidativo e ativação da proteína *p53* (MINOTTI et al., 2004). Cabe relatar que a DOX é mutagênica, pois induz a formação de micronúcleos por efeitos clastogênicos (GUERREIRO et al., 2013).

**Figura 7.** Estrutura química da Doxorubicina.



Em síntese, as antraciclinas podem induzir: 1) intercalação ao DNA, proporcionando a inibição da síntese de macromoléculas; 2) geração de radicais livres, resultando em dano ao DNA ou peroxidação lipídica; 3) enovelamento do DNA e alquilação do mesmo; 4) ligação covalente entre as cadeias de DNA (*DNA crosslinks*); 5) interferência com o enovelamento do DNA, ou interferência na separação da fita do DNA e na atividade da helicase; 6) efeito direto na membrana celular; 7) indução de dano ao DNA por inibição da topoisomerase - II (*top2*); e 8) indução de apoptose por resposta da inibição da *top2* (GEWIRTZ, 1999).

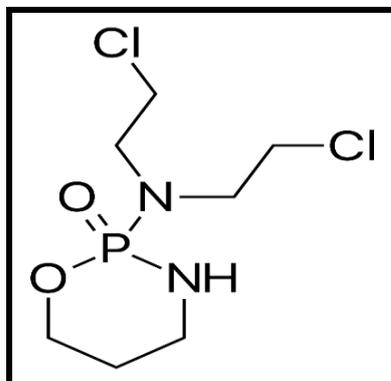
A DOX é indicada no tratamento de câncer de mama na pós-menopausa (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; MARSH; LIU, 2009) e em situações onde há resistência à terapia endócrina (KIM et al., 2014). No entanto, ocasiona efeitos colaterais (mielossupressão, náuseas, vômitos, perda de peso, arritmias e morbimortalidade); e crônicos (cardiomiopatia grave com desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva) (SINGAL; DEALLY; WEINBERG, 1987; OLSON et al., 2007; CAGEL et al., 2017) e cardiotoxicidade (HANNA et al., 2014).

### 3.2.3 Agente alquilante - Ciclofosfamida (CPA)

A CPA (**Figura 8**), derivado da mostarda nitrogenada, induz diferentes danos ao DNA, tais como: aberrações cromossômicas e mutações genéticas (VAGHEF et al., 1997; SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008). Tem predileção pelo ciclo celular, induzindo ligação cruzada, gerando fragmentação das hélices de DNA, interferindo em sua síntese e função, devido sua ação na indução de quebras de fitas simples de DNA (HENGSTLER et al., 1997), pode, ainda, formar ligações interfilamentares com o DNA que necessitam ser metabolizadas

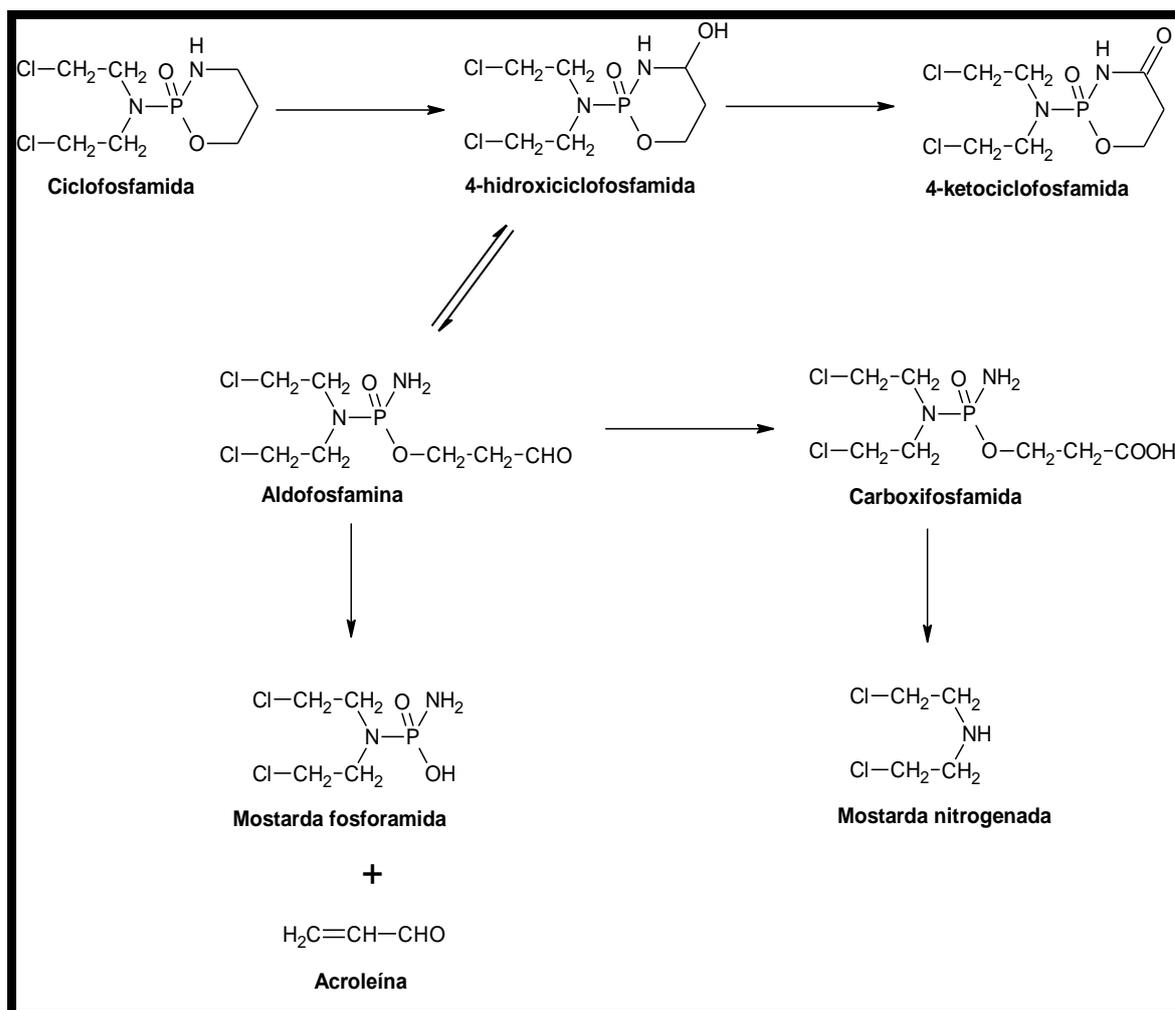
pelas fosfamidases (enzimas microsossomais hepáticas) (ALMEIDA et al., 2005), além de formar aductos de DNA e gerar ERO's (HAENEN, 1988).

**Figura 8.** Estrutura química da Ciclofosfamida.



A CPA não é metabolizada no interior das células cancerosas, mas sim por oxidases de função mista hepática (citocromo P450 2B1) e os seus metabólitos (**Figura 9**) são entregues nas células neoplásicas através da corrente sanguínea (TAKAMIZAWA et al., 1975; GRAHAM; RILEY; KERR, 1991). Seu potencial eletrofílico permite alterações no DNA por substituição de um átomo de hidrogênio por um grupo alquila em condições fisiológicas (HERZON, 2017). Pode induzir mielossupressão, nefrotoxicidade, bradicardia, câncer secundário de bexiga e estômago devido à falta de seletividade (BATISTA et al., 2015; TELES et al., 2017).

**Figura 9.** Ciclofosfamida e seus metabólitos.

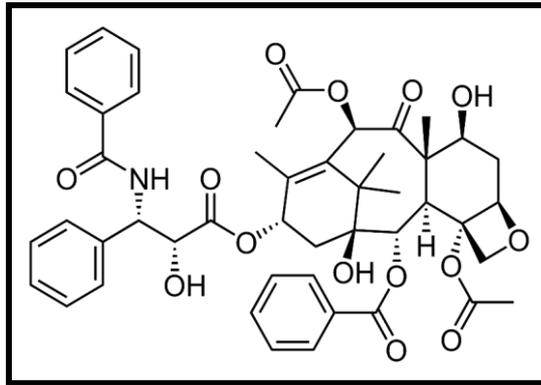


Fonte: Adaptada de Graham, Riley e Kerr (1991).

### 3.2.4 Agente inibidor dos microtúbulos - Taxol

O Taxol (**Figura 10**) é um diterpenoide, substância natural, isolado a partir da casca da árvore da espécie *Taxus brevifolia*, encontrada no Pacífico (ZOCHER et al., 1996), que atua em células que estão em divisão, bloqueando a despolimerização dos microtúbulos no ciclo celular e a progressão das células em fase G2 e M, podendo resultar em efeitos clastogênicos ou aneugênicos (CALABRESI; CHABNER, 1996; SALMON; SARTORELLI, 2003; TAME et al., 2017).

**Figura 10.** Estrutura molecular do Taxol.



O Taxol vem sendo utilizado para tratamento do câncer de mama, ovário e pulmão (VOROBIOF et al., 2004; MÜLLER et al., 2014), mas pode induzir toxicidade hematológica, cardiovascular e neuropatia periférica (DONATI; CASTRO, 2011). Entretanto, em conjunto com a CPA, no protocolo AC seguido de taxol (AC-T), são consideradas as drogas mais potentes na terapêutica do câncer de mama (VRIENS et al., 2013; EARL et al., 2014), especialmente, em terapia adjuvante para câncer de mama em estágio inicial (LYMAN et al., 2013).

### 3.3 Modelos de estudo em oncologia

O aparecimento de tumores espontâneos, induzidos por carcinogênicos e/ ou por vírus primários são alguns dos sistemas empregados na pesquisa do câncer. O uso destes modelos experimentais está sendo de grande relevância no descobrimento de novos fármacos antineoplásicos, como também no aperfeiçoamento dos métodos para prevenir, diagnosticar e tratar a doença em humanos (SILVA, 2014).

A descoberta de vários compostos usados no tratamento clínico de tumores tem acontecido graças ao desenvolvimento da oncologia experimental. A quimioterapia do câncer, seja em animais (em experimentos), ou em humanos, tem como intuito reduzir a quantidade de células neoplásicas viáveis, evitando recidivas (PESSOA et al., 2000; SILVA, 2014).

Os estudos *in vitro* e *in vivo* são importantes ferramentas utilizadas na pesquisa biológica, antes que estudos clínicos sejam realizados nos seres humanos. Nos últimos anos, vários esforços foram empregados para entender o processo de tumorigênese. A maioria do conhecimento, que se tem sobre a carcinogênese, decorre da análise *in vitro* de tecidos tumorais em estado avançados de desenvolvimento, extraídos a partir de pacientes. Essa

prática descobriu muitas questões sobre mudanças genômicas exibidas pelas células tumorais. Por outro lado, pouco colaborou na aquisição de informações sobre as causas que influenciam os estágios iniciais do seu desenvolvimento *in vivo*. Inúmeros modelos animais foram apresentados nos últimos anos, com o intuito de descobrir várias questões referentes ao câncer *in vivo*. Os camundongos são muito usados como instrumentos de estudos biológicos, sobretudo no campo da imunologia, oncologia e genética (PANTALEÃO; LUCHS, 2010).

### 3.3.1 Modelos *in vitro*

Para o estudo de medicamentos contra o câncer, indústrias farmacêuticas e pesquisadores realizam um conjunto de testes *in vivo* e *in vitro* para examinar a eficácia preliminar, toxicidade e farmacocinética de substâncias antes que se iniciem os estudos em humanos (JUNOD, 2013; MAK; EVANIEW; GHERT, 2014). No entanto, a utilização do modelo *in vivo*, por meio de experimentação em animais, é bastante limitado devido à viabilidade dos experimentos, disponibilidade de animais e preocupações éticas. Essas limitações levam muitos pesquisadores a escolherem os modelos *in vitro*. Esses modelos podem ser mais rigidamente controlados, são menos caros e consomem menos tempo do que os modelos animais. Além disso, podem ser usados para avaliar um grande número de diferentes combinações de parâmetros experimentais (NEWSAM et al., 2005; GRIFFITH; SWARTZ, 2006; ELLIOTT; YUAN, 2011).

Dentre os modelos *in vitro*, a cultura de células tem sido uma ferramenta importante para estudos relacionados à oncologia, permitindo o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese e a identificação de marcadores de diagnóstico e prognóstico úteis para a decisão terapêutica (FRESHNEY, 1987; GUZMAN; JORDAN, 2004). Existem inúmeros protocolos que se utilizam da cultura de células normais ou tumorais para o estudo de potenciais substâncias anticancerígenas (MAHER et al., 2017; CHEN et al., 2017(a); NASTKE et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018).

Para o estudo do câncer de mama, já foram realizados estudos com vários tipos de células, como células MDA-MB-231 e MCF-7 (YUE et al., 2016), MDA-MB-231, SK-BR-3, MDA-MB-468, MDA-MB-453 (SONG et al., 2005). Por meio da utilização da cultura desses diferentes tipos celulares do câncer de mama e diferentes tratamentos, com diversos objetivos, geralmente são realizados ensaios de viabilidade celular (MTT), PCR e RT-PCR, ensaio de invasão celular e Análise de Western blot (LIMA et al., 2014). Utilizando-se desses tipos celulares já foram realizados, por exemplo, o bloqueio da via de sinalização de Stat 3 por

moléculas peptídicas no câncer de mama (SONG et al., 2005), a demonstração de que o potássio aumenta os efeitos antitumorais do ácido ascórbico em linhagens de células de câncer de mama *in vitro* (FRAJESE et al., 2016), as vantagens de se utilizar a Hesperedina como agente de resistência preventiva em células resistentes à doxorrubicina (FEBRIANSAH et al., 2014), as propriedades antitumorais do Riluzol e sua ação independente do receptor de glutamato metabotrópico-1 (SPEYER et al., 2016), além de diversos outros estudos, demonstrando a importância da utilização dos modelos *in vitro* (HUGO et al., 2017; PRABHU et al., 2017).

No entanto, existem diversas limitações do modelo *in vitro* que ainda tornam essencial a utilização dos modelos animais. Entre elas, podemos citar a alteração das linhagens celulares na cultura de células (alteração genética e de mRNA); a falta da retenção da heterogeneidade tumoral presente no câncer primário; e a falta de componentes relevantes do microambiente tumoral (TVEIT; PIHL, 1981; ROSCHKE et al., 2003; MAK et al., 2014). Pesquisas de diferentes tipos de tumores, como de tumor de mama, já foram prejudicadas pelas limitações inerentes aos modelos experimentais de cultivo em monocamada ou bidimensional (2D) (KIM et al., 2004).

Buscando sanar essas limitações, novos modelos de cultura de células estão sendo produzidos e utilizados, como a cultura de células em 3D e a cocultura com representantes celulares adequados do microambiente do tumor. O objetivo dessas novas tecnologias é aproximar as condições da cultura celular *in vitro* da situação *in vivo* (MAK et al., 2014; BENTON, et al., 2014; FONG et al., 2016).

Existem inúmeros estudos se utilizando de células de sarcoma *in vitro*, demonstrando: a indução da morte celular programada pelo Trióxido de arsênio (CHIU et al., 2015), o papel da Mitramicina em induzir a atividade antiproliferativa de agentes quimioterápicos em células de sarcoma de Ewing (RAY et al., 2017), a potente atividade antitumoral do MLN0128, um inibidor de quinase de mTOR competitivo com ATP, como terapia potencial para o sarcoma de ossos e tecidos moles (SLOTKIN et al., 2015), a atividade antitumoral do Sitravatinib em células de sarcomas (PATWARDHAN et al., 2016), entre outros. Diante disso, podemos observar que os modelos de estudo *in vitro* são alternativas experimentais para a utilização de diversos tipos celulares (BENTON et al., 2015; GOLDBERG et al., 2015).

### 3.3.2 Modelos *in vivo*

O uso de animais na pesquisa experimental é citado desde o século V a.C. quando Hipócrates observou a similaridade anatômica de órgãos humanos doentes com os de animais (GRAGNANI; MORGAN; FERREIRA, 2003). Mesmo com a implantação de novas tecnologias de estudo *in vitro*, a utilização de animais ainda é essencial para o estudo de modelos oncológicos. As diferentes metodologias de modelos animais em oncologia, geralmente, apresentam os mesmos objetivos, a cultura de células e tecidos destinados à pesquisa *in vitro* ou/e a utilização de animais de laboratório destinados à pesquisa *in vivo* (LU et al., 2017; CARVALHO, SILVA; CARVALHO, 2017; PASCUAL et al., 2017; AERTS et al., 2018).

Segundo Thompson e Singh (2000), os modelos experimentais de neoplasias mamárias induzidas pela administração de cancerígenos químicos em roedores são ferramentas, extremamente, úteis para o estudo das múltiplas etapas da carcinogênese mamária. Em geral, as neoplasias mamárias induzidas quimicamente pelo DMBA são carcinomas agressivos hormônio-dependentes.

Dentre os modelos experimentais utilizados para estudo de carcinoma mamário, os aplicados em ratas são os mais fáceis de entender o mecanismo de desenvolvimento do câncer, sendo, por esse motivo, mais utilizados em pesquisa clínica. Alguns critérios observados na indução química de câncer de mama são: desenvolvimento acelerado do câncer de mama; desenvolvimento do tumor apenas no tecido mamário; semelhança nas características de crescimento com os tumores mamários humanos; o produto químico utilizado deverá causar pouca ou nenhuma toxicidade sistêmica no animal e as características histológicas devem ser semelhantes com os tumores encontrados em humanos (ESTELLER, 2007).

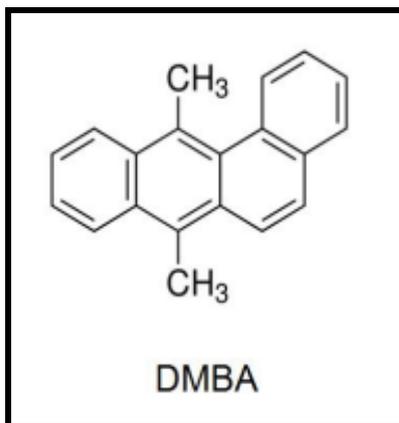
#### 3.3.2.1 7, 12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antraceno (DMBA)

Dentre as pesquisas que se utilizam de animais experimentais para o estudo *in vivo* no ramo da oncologia, podemos citar a indução de tumor por carcinógenos. A indução de câncer em roedores já se mostrou útil para o estudo de agentes de quimioprevenção, possibilitando a compreensão de processos de mutação, estresse oxidativo e inflamação, que ocorrem durante a carcinogênese. Além disso, possibilita a identificação de novos alvos moleculares para potencial quimioprevenção. Um desses modelos é a utilização do 7,12-dimetilbenz ( $\alpha$ )

antraceno (DMBA), um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) (TEICHER; FREI, 2000; SPORN; LIBY, 2005; TEICHER, 2006).

Os HPA's são poluentes atmosféricos dispersos abundantemente no ecossistema, encontrados no fumo do cigarro, charutos, combustão de combustíveis, carvão e até mesmo detectados em alimentos cozidos (RAVINDRA; SOKHI; GRIEKEN, 2008). Em meio às várias classes de HPAs, o 7, 12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antraceno (DMBA) é um carcinogênico e imunossupressor bem conhecido, usado em modelos de roedores para o estudo do câncer (CHATTERJEE et al., 2010; VEYRAND et al., 2013). O DMBA (**Figura 11**) é constituído por quatro anéis aromáticos organizados de forma angular e dois grupos metil. É um HPA de massa molecular 256,34 g/mol. Dentre os modelos que utilizam este composto, podemos citar os modelos de indução da carcinogênese na boca, fígado, glândula mamária e pele em roedores (SAHA; ROY; KHUDA-BUKHSH, 2012; MINARI; OKEKE, 2014; RIBEIRO et al., 2015).

**Figura 11.** Estrutura química 7, 12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antraceno (DMBA)



Fonte: SIGMA-ALDRICH; 2014.

Numerosos estudos mostraram que o DMBA pode ser usado para induzir carcinoma de mama experimental em ratos e que este processo envolve a interrupção do balanço redox do tecido. Por sua vez, isso sugere que as alterações bioquímicas e distúrbios fisiopatológicos podem resultar do dano oxidativo. A ativação do DMBA leva à produção de radicais cátions, radicais livres e metabólicos de oxigênio. Dessa forma, o estresse oxidativo gerado produz efeitos deletérios ao iniciar a peroxidação lipídica. Logo, o DMBA pode induzir a geração de substâncias oxidativas em vários órgãos, uma propriedade que lhe tornou uma boa alternativa para o estudo de modelos *in vivo* (DAVIS, KUTTAN, 2001; ANBUSELVAM; VIJAYAVEL;

BALASUBRAMANIAN, 2007; VINOITHINI, MURUGAN, NAGINI, et al., 2009; BENAKANAKERE et al., 2010; KRISHNAMOORTHY; SANKARAN, 2016)

O modelo de câncer de mama, que utiliza o DMBA, apresenta características relevantes como homogeneidade, reprodutibilidade e geração de tumores de forma rápida. O DMBA é considerado um pró-carcinógeno, que necessita ser convertido em seu metabólito secundário definitivo, o DMBA – 3,4-dihidrodiol-1,2-epóxido, em um processo que ocorre com a participação das enzimas microsossomais CYP-1 (MOON et al., 1996).

O DMBA quando administrado é biotransformado, rapidamente absorvido no trato gastrointestinal e acumulado no tecido adiposo. A glândula mamária apresenta como característica o acúmulo de tecido adiposo. Tendo isso em vista a mama é considerada um local de tropismo para o DMBA. Dessa forma, esta é mais uma evidência que o DMBA é uma substância apropriada para os estudos de carcinogênese na glândula mamária (TAMULSKI; MORREAL; DAO, 1973; COULDREY et al., 2002; VAYSSE et al., 2017).

### 3.3.2.2 Modelo murino de Sarcoma 180

O sarcoma de camundongos (Sarcoma 180) foi um dos primeiros tumores experimentais a serem transplantados em animais. Inicialmente este tumor, descoberto em 1914 como uma massa sólida na axila direita de um camundongo albino, foi denominado como Tumor de *Crocker*. Esse tumor foi, primariamente, classificado como carcinoma mamário; mas, após várias transplantações subcutâneas, observou-se que suas características morfológicas e seu comportamento eram característicos de um sarcoma e passou, então, a ser chamado de Sarcoma 180 (QI; XU, 2006, SILVA, 2014).

Em 1951, logo após a inoculação intraperitoneal do fluido leitoso do Sarcoma 180 (sólido) em camundongos *swiss*, o pesquisador Charlotte Friend apresentou a forma ascítica do tumor nos animais, na qual foi possível perceber que muitos tumores, depois da terceira semana de implante, desenvolvem necrose, levando os animais a óbito devido à desnutrição, toxemia e septicemia (SILVA, 2014).

Existem algumas condições que favorecem o uso de experimentos com tumores transplantáveis na forma ascítica, tais como a facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas; quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral, quando for o objetivo do estudo; possibilidade de realizar um estudo comparativo, utilizando dos mesmos métodos de pesquisa, na corrente sanguínea e nos fluidos corporais (NERY,

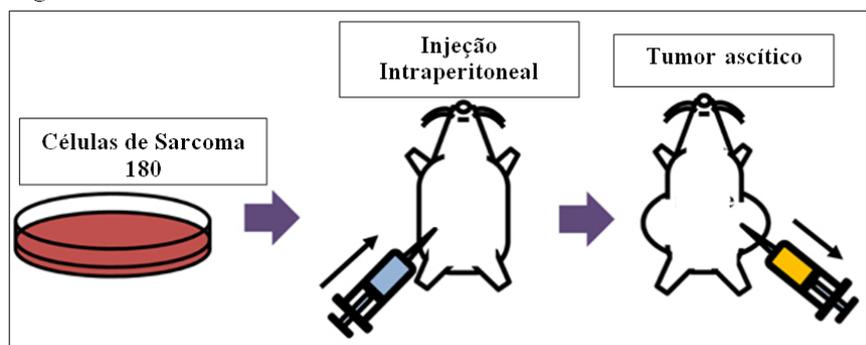
2004). O tumor na forma ascítica é intensamente utilizado em sistemas experimentais, uma vez que facilita a definição da quantidade de células que serão transplantadas, o que permite certo grau de controle. O tumor se desenvolve na forma sólida desde que seja inoculado por via subcutânea ou intramuscular em camundongos; e cresce na forma ascítica quando inoculado por via intraperitoneal (MATSUZAKI et al., 2004; BERGAMI-SANTOS; MARIANO; BARBUTO, 2004).

A identificação da progressão tumoral está sinalizando o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas tendo como alvo células presentes no microambiente tumoral. Desta forma, torna-se importante a elaboração de novas estratégias com o restabelecimento do controle do ciclo celular por meio de agentes, que atuem nos pontos de checagem, disponibilizando de estratégias viáveis na terapia anticâncer (CRAGG et al., 2018).

O entendimento da biologia molecular do câncer necessita de estudos in vivo, a exemplo dos modelos tumorais de Sarcoma. Segundo Quesada e Amaton (2012) esse tipo de câncer apresentam como características moleculares aberrações tais como mutações, deleção intergenes, ampliações de genes e translocações.. O transplante de células sarcomatosas pode ser realizado via inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, com crescimento em até 100% dos casos (WAL et al., 2002).

Existem diversos estudos demonstrando a utilização das células S180 para a pesquisa de novos antitumorais, bem como para avaliar o efeito do tumor e de metástases no tecido em um modelo murinho (**Figura 12**) (TARNOWSKI; MOUNTAIN; STOCK, 1973; JUNG et al., 2002; SUNG et al., 2007; YI et al., 2017). As células de S180 são uma linhagem maligna, heterogênea de células de tumor, desenvolvido naturalmente em camundongo, de origem mesodérmica e seu crescimento é observado em uma ampla gama de metástases (LEE et al., 2003; BRITTO et al., 2012).

**Figura 12.** Modelo murino de Sarcoma 180



Fonte: Adaptado de Sung et al., (2007).

Nos modelos animais, geralmente, essas células são injetadas por via subcutânea na virilha esquerda dos animais. Após a realização do transplante, assumem a forma de Sarcoma, mantendo-se inalterado para posterior tratamento de acordo com o estudo a ser realizado (WANG et al, 2012; YI et al., 2017). É um modelo clássico utilizado, um dos motivos é o seu rápido crescimento, uma vez que as células do Sarcoma 180 crescem rapidamente, podendo chegar após sete dias de inoculação a um tamanho de 15x11x8 mm (SUGIURA, STOCK, 1952).

### **3.4 Biomarcadores Citogenéticos**

A avaliação da toxicidade genética é de importância para identificar e caracterizar o papel de mutágenos e carcinógenos na saúde humana, na mensuração de danos primários, de mutações em genes, danos em cromossomos para avaliação de riscos de instabilidade genética e de efeitos carcinogênicos (ZEIGER et al., 2015). A genotoxicidade pode ser induzida por agentes químicos e/ou físicos que interagem com o DNA, bem como por outros caminhos celulares, podendo ocasionar adutos, quebras de fitas, mutações de ponto e alterações estruturais e numéricas aos cromossomos (BAUMSTARK-KHAN; HELLWEG; REITZ, 2010; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). Cabe enfatizar que essas alterações podem iniciar o desenvolvimento do câncer e também ocasionar impactos na fertilidade, contribuir para alterações hereditárias e prejudicar a saúde do ecossistema (BAUMSTARK-KHAN; HELLWEG; REITZ, 2010).

Essas alterações no material genético podem ser detectadas com aplicação de biomarcadores citogenéticos e/ou moleculares, em especial para o entendimento epidemiológico do câncer, pois fornecem informações sobre as diferenças individuais (COLLINS et al., 2014a). Estudos apontam que as alterações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico são associadas ao risco de câncer (KYRTOPOULOS et al., 2006; GOYAL et al., 2016). Diversas agências regulatórias de drogas, na Europa e nos Estados Unidos, recomendam testes em roedores para avaliação de fármacos quanto à genotoxicidade, em benefícios da saúde humana, como pré-requisito para sua liberação terapêutica (ABRAHAM; BALLINGER, 2012).

Assim, os biomarcadores citogenéticos, na avaliação de danos induzidos pelos fármacos ao DNA, são determinantes e quantificáveis de eventos biológicos que permitem a predição de anormalidades nucleares indicativas de neoplasias. A exemplo do teste de micronúcleos, que é capaz de evidenciar danos cromossômicos causados por agente

citotóxicos *in vivo*, e *ex vivo* (FENECH; MORLEY, 1985; LADEIRA et al., 2015). Para detecção de efeitos genotóxicos, a associação de bateria de testes rápidos deve ser considerada. Uma variedade de teste *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* tais como os testes de AMES, linfomas em ratos, teste de aberrações cromossômicas, micronúcleos para avaliação de toxicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade. Esses, também, são testes rotineiramente mais empregados na indústria farmacêutica (KIRKLAND et al., 2006; FEI et al., 2015).

Os carcinógenos são classificados em genotóxicos e não genotóxicos. Muitos carcinógenos genotóxicos têm sido reportados como causa de tumores. A avaliação de genotoxicidade de químicos, incluindo a identificação dos seus mecanismos de ação, são importantes para estabelecer as diferenças entre os carcinógenos em benefício da saúde humana, especialmente na indústria farmacêutica (SHARIF et al., 2016). O potencial genotóxico de carcinógenos é avaliado usando testes com bactérias, a exemplo do teste de mutação (AMES) (AMES; LEE; DURSTON, 1973). Para ser considerado carcinógenos, os compostos devem exibir genotoxicidade *in vivo* em roedores com o uso dos biomarcadores de micronúcleos e aberrações cromossômicas em mamíferos (GOLLAPUDI et al., 2011).

Para a farmacogenômica, ainda é necessário a influência do polimorfismo genético, variações na expressão dos genes em populações frente ao metabolismo de xenobióticos. Vários testes *in vivo* e *in vitro* são aplicados recentemente de forma associada com modelos computacionais (WOO et al., 2014). Os testes toxigenômicos podem apontar mecanismos moleculares que favorecem a entendimento dos modos e mecanismos de ação de compostos genotóxicos e carcinógenos e de carcinógenos não genotóxicos, com predição de riscos para a carcinogênese, por meio da seleção de genes que atuam em vias de sinalização celular, a exemplo do gene p53 (EICHNER et al., 2014).

Novos testes *in vitro* de toxicidade genética, com a identificação de genes associadas às respostas celulares de fármacos e/ou drogas (SUZUKI et al., 2014), devem ser incorporados de forma combinada em estudos toxicológicos com foco inicial para a identificação de mecanismos moleculares, que podem levar a perturbações com efeitos adversos (KELLER et al., 2012; BERG et al., 2011). As avaliações da diversidade de efeitos moleculares, incluindo os efeitos epigenéticos, são de importância em análises toxicológicas, especialmente com a aplicação de testes *in vitro*. Estas análises contribuem para a saúde humana, animal e ambiental (GUNDERT-REMY et al., 2015).

#### 3.4.1 Teste em *Saccharomyces cerevisiae*

A *S. cerevisiae* é um fungo unicelular que cresce tanto em condições anaeróbicas como aeróbicas. Esse organismo fermenta hexoses como a glicose e a frutose, sendo a glicose a principal fonte de carbono (JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS; 2017). A *S. cerevisiae* tem sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas em razão da sua notável semelhança às células de mamíferos no que se referem às macromoléculas, organelas e um grande número de proteínas com alta homologia com proteínas humanas. É utilizado em pesquisas sobre mutagênese, reparo de DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

Algumas das propriedades tornam a levedura, particularmente, apropriada para estudos biológicos de estresse oxidativo. Trata-se de um organismo provido de núcleo e de organelas com metabolismo semelhante a de eucariotos superiores. Além disso, apresenta crescimento rápido, segurança e possui um sistema genético bem definido. *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o genoma, completamente, sequenciado e depositado em bancos de dados especializados, permitindo a clonagem de diferentes genes, sua rápida identificação e caracterização, o que facilita a compreensão da sua função celular (JONES et al., 2008; PEÑA-CASTILLO; HUGHES, 2007).

*S. cerevisiae* possui uma variedade de mecanismos de defesas contra danos oxidativos tanto enzimáticos como não enzimáticos. O mecanismo enzimático é constituído de enzimas superóxido dismutases, redutases, catalases, peroxidoredoxinas, glutarredoxinas e glutathione transferases e é utilizado para manter o balanço redox nesse organismo (HERRERO et al., 2008). Quanto ao mecanismo não enzimático, cita-se a glutathione reduzida (GSH). Vários estudos têm demonstrado que a GSH é uma importante molécula antioxidante em leveduras. Além disso, em condições de restrição alimentar, a GSH também pode ser utilizada como fonte de nitrogênio e enxofre pela levedura (MEHDI e PENNINCKX, 1997). Outras moléculas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo em *S. cerevisiae* são: trealose, metalotioneína, tioredoxina e glutarredoxina (OHTAKE; SATOU; YABUUCHI, 1990; SUIZU et al., 1994; STEPHEN; JAMIESON, 1998).

A *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pombe* são importantes para mensurar os mecanismos de alterações na fidelidade de replicação, sensibilidade a lesões no DNA, bem como os mecanismos de respostas celulares a esses danos (SKONECZNA; KANIAK; SKONECZNY, 2015). Em estudos toxicogenéticos, o teste com leveduras é, também, um bom modelo de células eucarióticas com muitos genes funcionais e ortólogos aos dos

humanos e pode ser usado na identificação de genes susceptíveis à toxicidade (NORTH et al., 2011).

A levedura *S. cerevisiae* é importante para estudar respostas ao estresse oxidativo. Dentre as razões, pode-se destacar: a) a levedura apresenta um elevado grau de homologia com o genoma humano; b) existem muitas proteínas que são similares funcionalmente com as proteínas humanas; c) possui um sistema cuja manipulação genética é razoavelmente fácil e mais barato que outros modelos; d) as bases de dados são as mais completas de todos os modelos eucarióticos (DE LA TORRE-RUIZ; PUJOL; SUNDARAM, 2014); e, e) metabolismo de detoxificação semelhante ao dos eucariotos superiores o qual está ausente nas bactérias. *S. cerevisiae* consegue realizar todas as tarefas básicas que as células eucarióticas podem fazer.

#### 3.4.2 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa, conhecido como eletroforese em gel de célula única, (SCGE – *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) (HEUSER et al., 2008; TAKASAWA et al., 2015; ZAPATA et al., 2016), vem sendo reconhecido, internacionalmente, assim como o de micronúcleos *in vivo*, para avaliação do potencial genotóxico de químicos carcinógenos pela indução dos danos ao DNA e eficácia de reparo (KANG et al., 2013). Na sua versão alcalina (pH alcalino (>13), apresenta mais sensibilidade para identificação de agentes genotóxicos (NESSLANY et al., 2007; DHAWAN et al., 2009; VALVERDE; ROJAS, 2009; CORREDOR et al., 2016), por detectar diversos danos tais como: quebras de fita única e dupla, sítios álcali-lábeis e *crosslinks* (VILLELA et al., 2003; HEUSER et al., 2007; VALVERDE; ROJAS, 2009; SOLONESKI; NIKOLOFF; LARRAMENDY, 2016; ZHOU et al., 2016) e danos oxidativos (LU et al., 2017).

Entretanto, não tem efeitos na detecção de mecanismos aneugênicos e/ou clastogênicos, que são eventos associados à carcinogenicidade e mecanismos epigenéticos (COLLINS, 2004), com sensibilidade na identificação de lesões pré-mutagênicas, de reparo, utilizando qualquer tipo de células nucleadas e não exigindo que as mesmas se encontrem em divisão (LEAL et al., 2009). O Ensaio Cometa pode ser aplicado em estudos de monitoramento clínico, entendimento da patogênese do câncer e de doenças degenerativas, predição de tumores, radiações e quimioterapias e estudos de infertilidades, assim como avaliação de riscos ocupacionais e ambientais (STANG, 2010; TICE, 2015; GUNASEKARANA; GLADWIN; CHAND, 2015), além de monitoramento de exposição a

antineoplásicos (GOMES JÚNIOR et al., 2015). Diversas células podem ser usadas em estudos de biomonitoramento clínico, tais como: células mononucleares do sangue periférico, células do epitélio bucal, nasal, epitelial, espermatozoides, bem como biópsias de tecidos (LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009).

### 3.4.3 Teste de Micronúcleos

Os micronúcleos (MN) são fragmentos de DNA que são descritos como de alto risco para o aparecimento do câncer, em resposta a agentes genotóxicos e carcinogênicos. Trata-se de pequenos corpúsculos nucleares representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético (ASANO et al, 1998). Após a separação das cromátides, no processo mitótico, dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos cromossômicos. Mas, se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este pode constituir um pequeno núcleo individual.

Os MN podem se originar de fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastogênico) ou de cromossomos inteiros, que não completam a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico). O teste de micronúcleos é um teste citogenético que tem sido bastante usado para avaliar danos citogenéticos em várias populações do mundo (DERTINGER et al, 2011).

Os biomarcadores citogenéticos, a exemplos dos micronúcleos, têm atraído muita atenção em inúmeros artigos, pois são potenciais indicadores de efeitos biológicos, incluindo os riscos de aumento de instabilidade genética, preditivos de câncer. O teste de MN mensura quebras e perdas de cromossomos, sendo um marcador de danos ao DNA.

As agências reguladoras e a comunidade científica têm aceitado o Teste de Micronúcleos em medula óssea de camundongos como ferramenta apropriada para avaliar a segurança de um produto (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007). Vem sendo usado segundo a OECD - *Guidelines for the testing of Chemicals/section 4: Health Effects – Mammalian Erythrocytes. Micronúcleos Test*: Nº - 474 e a recomendação do Gene – *Tox program, Environmental Protection Agency – EPA/US*, como padrão de mutagenicidade cromossômica, que evidencia a ação mutagênica de agentes físicos *in vivo* e *in vitro* (FENECH et al., 1999; MARCON et al., 2017). Os micronúcleos são formados após exposição a agentes genotóxicos, que podem ocasionar após as mitoses fragmentos de

cromátides ou cromossomos acêntricos, que foram excluídos do núcleo principal (FENECH, 2002; NERSESYAN et al., 2014; FENECH et al., 2016; TOUAHRI et al., 2016). Esses eventos caracterizados por agentes clastogênicos e aneugênicos, que são preditivos de câncer (FENECH, 2000; PAZ et al., 2018), podem induzir ativação de proto-oncogenes e deleção de genes supressores de tumores (TAMURA, 2006; GOYAL et al., 2016).

O Teste de Micronúcleos fornece informação sobre a instabilidade genética ocasionada danos do DNA e morte celular (ROHR et al., 2013; BOLOGNESI; HOLLAND, 2016; NERSESYAN et al., 2016), sendo considerado como biomarcador de efeitos aneugênicos e clastogênicos. O entendimento das diferenças entre os efeitos clastogênicos e aneugênicos é de importância crucial na avaliação dos riscos de câncer. O modo de ação não linear dos aneugênicos é relacionado à desorganização da maquinaria mitótica com perda de cromossomo que leva à formação de micronúcleos e apresenta relação com a dose reposta do agente mutagênico (HERNÁNDEZ; VAN BENTHEM, 2013). Já os eventos os clastogênicos, podem induzir mutações devido a quebras de cromossomos, por deleções, adição ou reagrupamento de sequências nucleotídicas (ELHAJOUJI; TIBALDI; KIRSCH-VOLDERS, 1997).

#### 3.4.4 Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (CBMN)

Para avaliação de genotoxicidade de químicos *in vitro*, o Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese é recomendado (CBMN) (EL-ZEIN; VRAL; ETZEL, 2011; NERSESYAN et al., 2014). No que se refere à metodologia de MN com bloqueio de citocinese (CBMN), a mesma é desenvolvida com o uso da citocalasina B para identificar células que se dividem em cultura. A citocalasina B é um inibidor de polimerização de actina, a qual é requerida para a formação do anel que divide o citoplasma durante a citocinese. Desse modo, as células podem ser identificadas por suas aparências binucleadas (FENECH, 2007).

Os danos induzidos por agentes químicos e/ou físicos podem, dependendo do agente, induzir ou inibir necroses e ou apoptose. A indução de necrose pode resultar na liberação de enzimas degradativas, que podem causar a digestão parcial de DNA. Nesta perspectiva, o CMBN é, amplamente, usado como um ensaio *in vivo* bastante viável para avaliar a ocorrência de alterações cromossômicas, que é um dos principais pontos finais da mutagenicidade. O teste é utilizado não só para identificação de mutações, mas para a avaliação de riscos ao qual o organismo esteja susceptível (HAYASHI, 2016).

Como visto, é de grande importância a verificação da toxicidade genética e cromossômica causada por novas biomoléculas, de forma a assegurar a saúde humana e animal. Assim, alguns biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para a avaliação de efeitos agudos e crônicos de diversos agentes químicos, podendo predizer um perfil de segurança e eficácia de novas moléculas (MALUF; ERDITIMANN, 2003).

### **3.5 Biomarcadores Hematológicos e Bioquímicos**

A não seletividade dos antineoplásicos exige o monitoramento hematológico, devido aos efeitos da mielodepressão e leucopenia, presentes no paciente oncológico (SILVA; NASCIMENTO, 2010). As anemias e transtornos de coagulação são comuns em pacientes oncológicos (LEBRUN et al. (2017), bem como a Trombose Venosa Profunda (TVP) e Embolia Pulmonar (EP) (ZHU et al., 2017). O hemograma é o exame complementar no acompanhamento de quimioterapia e radioterapia, de importância para diagnósticos e controle evolutivo de doenças (ZHU et al., 2016).

O parâmetro hematológico estabelece aspectos qualitativos e quantitativos dos eritrócitos (eritrograma), leucócitos (leucograma) e das plaquetas (plaquetograma) no sangue. O eritrograma estuda as alterações nos eritrócitos ou hemácias (Hm), na hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), avaliação da morfologia eritrocitária e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). O leucograma é constituído da contagem global e diferencial da série branca. O plaquetograma envolve a contagem de plaquetas, avaliação da morfologia, determinação do volume plaquetário (VPM) e a variação entre os volumes plaquetários (PDW) (ROSENFELD, 2012).

Alterações bioquímicas, também, são presentes em pacientes oncológicos, tais como as alterações em creatinina observada em pacientes oncológicos com lesão renal (MAGRO; VATTIMO, 2007; DALTON, 2011); lactato desidrogenase (LDH), que se apresenta alterada em danos tissulares. A dosagem de creatinina exerce um papel fundamental no rastreamento de lesão renal aguda (LRA), observada, com frequência, em pacientes idosos e em neoplasias. Trata-se de uma condição caracterizada pela incapacidade de manutenção dos equilíbrios ácido-base e hidroeletrólítico (MAGRO; VATTIMO, 2007). Dalton (2011) relata que a manutenção da homeostase fisiológica está relacionada com uma função renal saudável. E a determinação plasmática da creatinina é o teste para avaliação da função renal mais seguro (WALLACH; KANNAAN, 2003).

### 3.6. *Neonothopanus gardneri*

#### 3.6.1 Taxonomia

Os fungos durante muitos anos ficaram inseridos no reino plantae, devido a algumas características semelhantes. Porém, por apresentarem distinção das plantas em diversos outros aspectos, foram separados em um reino próprio, o reino fungi (KIRK et al., 2008; BLACKWELL, 2011). Dentre suas características, estão: ausência de pigmentos fotossintetizantes; são heterotróficos (sua nutrição se dá por meio de absorção); são eucariotos; e possuem parede celular quitinosa, tendo o glicogênio como principal forma de armazenamento energético. Atualmente, o reino fungi é dividido em sete filos principais, sendo eles Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia e Neocallimastigomycota (STEENKAMP; WRIGTH; BALDAUF, 2006; HIBBETT et al., 2007; KIRK et al., 2008; BLACKWELL, 2011).

*Neonothopanus* é um gênero de duas espécies de fungos bioluminescentes da família *Marasmiaceae*. A espécie tipo *Neonothopanus nambi*, encontrada na Austrália, América do Sul, América Central e Malásia, (COMER et al, 1981) e a espécie *Neonothopanus gardneri* (**Figura 13**) encontrada na América do Sul (CAPELARI et al, 2011). O *N. gardneri*, conhecido popularmente como “flor-de-coco”, pertence à linhagem Omphalotus, do filo Basidiomycota, caracterizado por espécies capazes de formar estruturas denominadas basídios, nas quais ocorre cariogamia e meiose esporica, originando basidiósporos (BONONI, 1997; KIRK et al., 2008), exibindo, excepcionalmente, intensa luminescência tanto do micélio quanto nos basidiomas (CAPELARI et al., 2011). Além disso, apresentam micélio dicariótico e hifas septadas que podem formar ansas (alças de conexão), característica exclusiva dos fungos basidiomicetos (ALEXOPOULOS, MIMS, BLACKWELL, 1996).

O grande papel ecológico dos basidiomicetos é a ciclagem de nutrientes, interferindo principalmente no ciclo do carbono por serem degradadores de lignina. Contribuem ainda para a manutenção do ciclo de outros elementos como nitrogênio, fósforo e potássio (NA et al., 2016; AN et al., 2016). No Brasil, os representantes do filo Basidiomycota são encontrados em todas as regiões e nos mais variados ecossistemas. O *N. gardneri* é encontrado, principalmente, na região da caatinga (NEVES et al., 2013). Distribuído, também, ao longo da Mata dos Cocais brasileira nos estados do Maranhão, Tocantins, Goiás e Piauí, que é um bioma de transição entre a Floresta Amazônica e a Caatinga, com corpos de

frutificação que crescem nas bases de palmeiras (*Attalea humilis*, *A. funifera*, e *Orbignya phalerata*) (CAPELARI et al., 2011).

**Figura 13** - *Neonothopanus gardneri*



Fonte: VENTURA; SILVA; STEVANI, 2015.

### 3.6.2 Atividades biológicas

Os fungos são considerados uma fonte rica de novos produtos naturais com uma ampla gama de atividades biológicas, sendo utilizados há muitos séculos pela indústria farmacêutica para a produção de medicamentos, como a penicilina (BLUNT et al., 2006; SMETANINA et al., 2007; SAMUEL; PRINCE; PRABAKARAN, 2011). Do ponto de vista dietético e medicinal, os fungos podem proporcionar potenciais efeitos benéficos na saúde humana, quer, diretamente, como antioxidante; quer através da prevenção de alterações subjacentes a estados patológicos graves, tais como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e a síndrome metabólica (AZIZ; MEHMET; NAZIME, 2007).

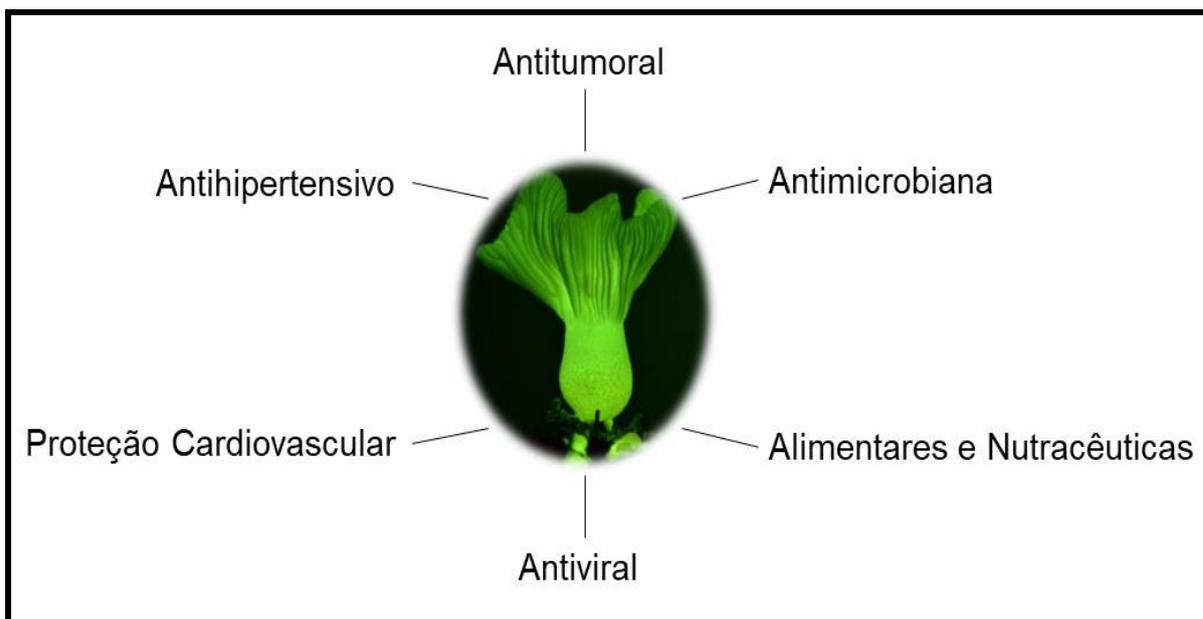
Uma variedade de cogumelos tem sido usada, tradicionalmente, para a manutenção da saúde, prevenção e tratamento de várias doenças. Acredita-se que um total de 126 funções medicinais sejam produzidas por cogumelos e fungos. Dentre as diversas propriedades farmacológicas e biológicas que já foram listadas a partir dos cogumelos, podemos citar efeitos antitumorais, imunomoduladores, antioxidantes, cardiovasculares, anti-hipercolesterolêmicos, antivirais, antibacterianos, antiparasitários, antifúngicos, desintoxicantes, hepatoprotetores, antidiabéticos e anti-inflamatórios (WASSER, WEIS, 1999; VAZ et al., 2011; CHANG; WASSER, 2012; SHARMA, SINGH; SINGH, 2017). Na medicina popular, vários extratos são usados, no Japão, na Coreia e na China, como

potenciais adjuvantes para tratamentos de radiação e quimioterapia (SULLIVAN; SMITH; ROWAN, 2006; BORCHERS et al., 2008).

No que se referem às atividades apresentadas pelos fungos basidiomicetos (**Figura 14**), destacam-se as atividades alimentares e nutracêuticas (CHANG; BUSWELL, 1996; LIN e LIN, 1997; RUBEL, 2006; FAN et al., 2006), antimicrobiana (POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006; FAN et al., 2006; IMITIAJ; LEE, 2007), antiviral (FAN et al., 2006) e potencial para controle de doenças de plantas causadas por micro-organismos (KOBAYASHI; HIRAMATSU; AKATSUKA, 1997; DI PIERO; PASCHOLATI, 2004). Estudos evidenciaram que algumas espécies de fungos do filo Basidiomycota apresentam, também, atividade antitumoral (MIZUNO et al., 1990; RODRIGUES et al., 2003; RUBEL, 2006; POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006, FAN et al., 2006; ZHENG et al., 2015; MEI et al., 2015) correlacionada com seus polissacarídeos. Estes que são capazes de impedir a oncogênese, podendo ser utilizados, diretamente, para inibir a atividade tumoral ou para impedir a metástase, sendo benéficos para serem utilizados em conjunto com a quimioterapia (WASSER, 2002; CHANG; WASSER, 2012; PLESZCZYŃSKA et al., 2016), além de efeito antihipertensivo e de proteção cardiovascular (EGUCHI et al., 2014; YAHAYA et al., 2014; SHIBU et al., 2017). Além de polissacarídeos, terpenoides, esteroides, alcaloides e compostos fenólicos estruturados que indicam atividades antioxidantes, antivirais, antibacterianas, anticolinesterase, antifúngicas, anti-inflamatórias, antimunomoduladoras e antitumorais de várias espécies de cogumelos (ISHIKAWA et al., 2001; NIEDERMEYER et al., 2005; MORADALI et al., 2007; SINANOGLU et al., 2015; MENG et al., 2016; ZHANG et al., 2017).

Estudos apontam algumas propriedades biológicas da espécie *Neonothopanus nambi*, como ação citotóxica contra larvas (*Meloidogyne incógnita*) que infectam as raízes de tomateiros (BUA-ART et al., 2010), bem como contra o agente etiológico da malária, *Plasmodium falciparum*, ação antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*, efeito citolítico contra linhagem de células cancerosas NCI-H187, dentre outras atividades (KANOKMEDHAKUL et al., 2012). A atividade antitumoral evidenciada pela espécie *Neonothopanus nambi* pode servir como subsídio para a investigação do potencial de *Neonothopanus gardneri* contra células cancerosas.

**Figura 14.** Atividades biológicas apresentadas pelos fungos basidiomicetos



### 3.6.3 Compostos bioativos isolados de cogumelos

As propriedades biológicas e farmacológicas dos cogumelos parecem estar, intimamente, relacionadas a seus metabólitos secundários. Já foram encontrados em cogumelos diversos componentes bioativos como proteínas, vitaminas (riboflavina, niacina, tiamina, ácido fólico e ácido ascórbico), minerais (cobre, fósforo, magnésio, potássio, sódio e zinco), ácidos graxos insaturados, fibras, ergosterol, lecitina, terpenoides e aminoácidos imunomoduladores, como a arginina e a glutamina (BUSWELL; CHANG, 1993; WANG; SAKODA, SUZUKI, 2001; NOVAES, 2007). Alguns cogumelos, também, possuem  $\beta$ -glucanas, lectinas, proteínas imunomoduladoras de fungos (Fips) e proteínas que são únicas e foram consideradas altamente bioativas nesses tipos de fungo (CHEUNG, 2010; MATTILA; MARNILA; PIHLANTO, 2018).

Os terpenoides encontrados nos cogumelos apresentam ampla variedade de atividades biológicas, como ação antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antiplasmodial, antimalárica, antiviral e citotóxica (DURU; CAYAN, 2015). Além disso, os fungos basidiomicetos podem produzir uma grande variedade de triterpenos. A maioria deles é do tipo lanostano, com muitas formas diferentes de atividade biológica, incluindo anticancerígenos e antiparasitários (NYONGBELA et al., 2013). Em geral, a maioria dos cogumelos possui polissacarídeos biologicamente ativos com atividade

antitumoral e imunoestimuladora, sendo eficazes no retardamento de vários tumores e de outras doenças através da estimulação do sistema imunitário, como também na redução dos efeitos colaterais dos tratamentos de quimioterapia e radiação (MIZUNO, et al., 1995; CHANG; MILES, 2004).

Os cogumelos medicinais também contêm enzimas como lactase, superóxido dismutase, glicose oxidase e peroxidase, capazes de desempenhar um papel importante no tratamento do câncer, prevenindo o estresse oxidativo e inibindo o crescimento celular (ZAIDMAN et al., 2005; WASSER, 2010). Estudos realizados com diferentes cogumelos já demonstraram o potencial antioxidante desses fungos, apresentando elevadas concentrações de compostos fenólicos e potente atividade sequestradora de radicais livres (AKATA; ERGÖNÜL; KALYONCU, 2012; REIS et al., 2012). Ácido benzoico, ácido hidrobenzoico, ácido galico, ácido protocatecuico, ácido gentísico, ácido vanílico, ácido hidroxicinâmico, ácido cinâmico, ácido cafeico, quercetina, rutina, hesperetina, caempeferol, ácido ferúlico, resveratrol, ácido elágico e ácido pirogálico são alguns dos compostos fenólicos e flavonoides que já foram encontrados em diversas espécies de cogumelos (KIM et al., 2005; VALENTÃO et al., 2005; PUTTARAJU et al., 2006; JAYAKUMAR; THOMAS; GERALDINE, 2009; FERREIRA; BARROS; ABREU, 2009).

Diversos estudos já demonstraram o efeito dos compostos fenólicos e flavonoides sobre o organismo que ultrapassam os seus efeitos antioxidantes. Como a quercetina, que é capaz de atuar sobre a inflamação, função imunológica (LI et al., 2016.), possuir ação vasodilatadora, atuar sobre a prevenção da formação de placa aterosclerótica, efeito antihipertensivo e anti-isquêmico (PIRIE et al., 2014), além de apresentar ação conjunta com o caempeferol, que possui grande potencial anti-inflamatório por modular a ação de componentes celulares envolvidos no mecanismo da inflamação, como por exemplo, a proliferação de linfócitos T, a produção de citocinas pró-inflamatórias como as TNF-a e IL-1, e a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, ações que promovem a agregação de plaquetas e redução à trombose (QUEIROZ et al.; 2014; TODOROVA; TRENDIFOLOVA, 2014).

Com relação aos compostos bioativos do gênero *Neonothopanus sp*, um dos principais compostos encontrados é a hispidina, composto ativo bioluminescente presente nos corpos de frutificação de cogumelos *N. gardneri*, que possui atividade antioxidante comprovada (EDWARDS, LEWIS, WILSON, 1961; KHUSHBAKTOVA et al., 1996; OBA et al., 2017).

Estudos apontam compostos bioativos extraídos de *Neonothopanus nambi* eficazes no controle de nematódeos (BUA-ART *et al.*, 2010).

Sesquiterpenoides antiplasmodiais, aurisina A e aurisina K, extraídos do *N. nambi*, mostraram atividade contra o *P. falciparum* e *Mycobacterium tuberculosis*, como, também, apresentam citotoxicidade contra linhagens celulares cancerígenas NCI-H187 e de colangiocarcinoma. Outros compostos bioativos foram extraídos desses fungos, como os sesquiterpenos nambinona A e C, epi- nambinona B e nambinona D, que, também, estariam ligados à atividade citotóxica desse fungo contra as células tumorais (KANOKMEDHAKUL *et al.*, 2012). Além de atividade contra células de diferentes linhagens celulares: de câncer de pulmão NCI-H187, câncer da cavidade oral KB, e câncer de mama MCF7 (BURAKORN; NGUEYN; PRAPHRUET, 2015). Outras substâncias isoladas desses fungos já foram descritas, também, como o nanbiscalarano, um novo sesterterpenoide, a Aurisina Z, trans - $\alpha$ -hidroxi- $\gamma$ -fenilbutirolactona, 4-butirilamobenzoato de metilo, bem como nambinonas A e C e esterol poli-hidroxilado (TSARKOVA *et al.*, 2016).

# *CAPÍTULO I*

---

**Bioativos de espécies do filo Basidiomycota e mecanismos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais**

## Bioativos de espécies do filo Basidiomycota e mecanismos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais

Débora Cássia Vieira Gomes, Antonielly Campinho dos Reis, Rosália Maria Torres Lima, José Victor de Oliveira Santos, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Hercília Maria Lins Rolim Santos, Joaquim Soares da Costa Júnior, Antônia Maria das Graças Lopes Citó, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Lina Clara Gayoso e Almendra Ibiapina Moreno, João Marcelo de Castro e Sousa, Muhammad Torequl Islam, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

### RESUMO

Os compostos bioativos de espécies do filo Basidiomycota apresentam atividades imunoestimulante, antiviral, anti-inflamatória, hipoglicemiante, antioxidante, hipocolesterolêmica, fungicida e antitumoral. Esta revisão pontuou alguns bioativos em espécies do filo Basidiomycota com mecanismos de ação envolvidos nas atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. A busca foi conduzida em periódicos científicos publicados no período de 2013-2016 nas plataformas *PubMed*, *Science Direct*, *Web of Science* e *Scopus*, utilizando os indexadores '*mushroom*', '*bioluminescent mushrooms*', '*mushroom and biological activities*', '*mushroom and secondary metabolites*' e '*mushroom and antitumoral activity*'. Dados duplicados e não relacionados ao tema foram excluídos. De 9.048 artigos, apenas quatrocentos e vinte e seis (426) publicações foram selecionadas após exclusão de informações duplicadas e não relacionadas ao tema e apenas noventa e dois (92) artigos não clínicos foram incluídos neste estudo. Os compostos químicos de extratos, metabólitos e polissacarídeos isolados das espécies *Agaricus murrill*, *Boletus edulis*, *Clavaria fragilis*, *Catathelasma ventricosum*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Hypsizygyus tessulatus*, *Lentinula edodes*, *Lentinus tigrinus*, *Meripilus giganteus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamour*, *Pleurocybella porrigens*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonarius*, *Ramaria botrytis*, *Ramaria stricta* e *Tylopilus ballouii* apresentaram propriedades antioxidantes com mecanismos de ação envolvidos na eliminação e captura de radicais livres, controle do  $Fe^{3+}$  e redução de peroxidação lipídica. Em *Cordyceps militaris*, *Gloeostereum incarnatum*, *G. lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Inonotus obliquus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Trametes orientalis*, *Tylopilus ballouii* alguns bioativos foram responsáveis por efeitos anti-inflamatórios por meio do aumento da expressão de anticorpos e interleucinas, redução de edemas, controle dos níveis de mieloperoxidases e expressão de COX-2 e TNF $\alpha$ . Nas espécies *Antrodia camphorate*, *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula-judae*, *Astraeus odoratus*, *Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, *Cordyceps militaris*, *Cerrena unicolor*, *Fusarium moniliforme*, outros bioativos apresentaram efeitos tóxicos/citotóxicos, bem como atividade antitumoral em diferentes linhagens tumorais por meio de parada do ciclo celular, colapso do potencial de membrana, ativação de caspases, clivagem de PARP, expressão de Bax e Bcl2, indução de necrose, apoptose, expressão de p21, p27, p300, p73, fosforilação de Rb e E2F1, Bax/Bcl2, caspases 7, indução dos fatores IFN-4, COX-2, indução de peroxidação lipídica, atenuação da expressão das proteínas NFK $\beta$  e  $\beta$  caderinas e quinases, regulação negativa de ciclinas B e E, regulação positiva de p53 e PARP, indução de radicais livres, aumento de proteínas quinases e de AMPc, TGF $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL2. Assim, as espécies do filo Basidiomycota são fontes abundantes de agentes bioativos para formulações farmacêuticas antitumorais.

**Palavras-chave:** Basidiomycota. *N. gardneri*. Antioxidante. Anti-inflamatório. Antitumoral.

## Bioactives of species of the phylum Basidiomycota and antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor mechanisms

### ABSTRACT

Bioactive compounds in species of the phylum Basidiomycota present activities immunostimulating, antiviral, anti-inflammatory, hypoglycemic, antioxidant, hypocholesterolemic, fungicidal and antitumor. This review punctuated some of the bioactive compounds in species of the phylum Basidiomycota with mechanisms of action involved in the antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities. An extensive search was conducted in journals published in the period 2013-2016 on the *PubMed*, *Science Direct*, *Web of Science* and *Scopus* platforms using the 'mushroom', 'bioluminescent mushrooms', 'mushroom and biological activities', 'mushroom and secondary metabolites' and 'mushroom and antitumoral activity'. Only non-clinical evidence data were included in this study. Duplicate and non-subject data were deleted. Of 9,048 articles, only four hundred and twenty-six (426) publications were selected after deletion of duplicate and non-subject information. Then, after eligibility analysis, only ninety-two (92) non-clinical articles were included in this study. Chemical compounds of extracts, metabolites and polysaccharides isolated from the species *Agaricus murrill*, *Boletus edulis*, *Clavaria fragilis*, *Catathelasma ventricosum*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Hypsizygus tessulatus*, *Lentinula edodes*, *Lentinus tigrinus*, *Meripilus giganteus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamour*, *Pleurocybella porrigens*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonarius*, *Ramaria botrytis*, *Ramaria stricta* and *Tylopilus balloui* presented antioxidant properties with mechanisms of action involved in elimination and capture of free radicals, Fe<sup>3+</sup> + control and reduction of lipid peroxidation. In *Cordyceps militaris*, *Gloeostereum incarnatum*, *G. lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Inonotus obliquus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Trametes orientalis*, *Tylopilus ballouii* some bioactives were responsible for anti-inflammatory effects through increased expression of antibodies and interleukins, edema reduction, control of myeloperoxidase levels and expression of COX-2 and TNF $\alpha$ . In the species *Antrodia camphorate*, *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula-judae*, *Astraeus odoratus*, *Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, *Cordyceps militaris*, *Cerrena unicolor*, *Fusarium moniliforme*, *G. lucidum*, *Grifola frondosa*, *Ganoderma tsugae*, *I. obliquus*, *L. edodes*, *Lactarius rufus*, *L. vulpinum*, *M. esculenta*, *G. lucidumem*, *G. applanatum*, *P. nameko*, *P. eryngii*, *P. igniarius*, *de P. linteus*, *P. ostreatus*, *P. abalonus*, *P. sajor-caju*, *P. sp.*, *R. lépida*, *S. commune* and *T. versicolor* other bioactives showed toxic/cytotoxic effects as well as antitumor activity in different tumor cell lines through cell cycle arrest, membrane potential collapse, caspase activation, cleavage of PARP, Bax and Bcl2 expression, induction of necrosis, apoptosis, expression of p21, p27, p300, p73, phosphorylation of Rb and E2F1, Bax / Bcl2, caspases 7, induction of IFN-4, COX-2, induction of lipid peroxidation, attenuation of NFK $\beta$  and  $\beta$ -cadherin protein expression and kinases, negative regulation of cyclins B and E, positive regulation of p53 and PARP, induction of free radicals, increase of protein kinases and of cAMP, TGF $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL2. Thus, species of the phylum Basidiomycota are abundant sources of bioactive agents for antitumor pharmaceutical formulations.

**Key-words:** Basidiomycota. *N. gardneri*. Antioxidant. Anti-inflammatory. Antitumoral

## 1 INTRODUÇÃO

Bray e Møller (2006) publicaram projeções globais para a incidência de câncer em 2020. Eles projetaram que a incidência total de câncer subiria de 11 milhões de novos casos em 2002 para 16,5 milhões em 2020. MATHERS et al., 2006 projetaram a incidência global para todos os tipos de câncer em 15,5 milhões de casos em 2020, 6% abaixo da estimativa de Bray e Møller. Estima-se, para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto entre os mais incidentes, entretanto ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago (INCA, 2017).

Os derivados de produtos naturais têm sido fontes promissoras para agentes terapêuticos (DEY et al., 2016). Diversos estudos com fitoquímicos apontam para atividades antitumorais, por indução de apoptoses e inibição de proliferação celular (BEEVI et al., 2010). O desenvolvimento dos fármacos ainda se constitui como um desafio para a terapia do câncer devido a diversos aspectos, incluindo o fato da heterogeneidade genética do câncer que leva a muitas resistências às terapias (SAMADI et al., 2015).

Os Basidiomycotas são considerados uma fonte rica de novos produtos naturais com uma ampla gama de atividades biológicas, sendo utilizados, frequentemente, pela indústria farmacêutica para a produção de medicamentos, como a penicilina (BLUNT et al., 2006; SMETANINA et al., 2007; SAMUEL; PRINCE, PRABAKARAN, 2011). Já foram reladas mais de 97 mil espécies de fungos; dentre as quais, a maioria se encontra entre os Ascomycetos e Basidiomicetos (KIRK et al., 2008, BLACKWELL, 2011). São fontes de metabólitos secundários bioativos para o desenvolvimento de nutracêuticos e fármacos (DURU e ÇAYAN, 2015). Algumas evidências apontaram que estes metabólitos apresentam atividades farmacológicas como imunoestimulante (KATYA et al., 2016), anti-inflamatória (DORE et al., 2014; NGUYEN et al., 2016; ZHANG et al., 2017), antiviral (SONG et al., 2016), hipoglicemiante (WAHAB et al., 2014; MIHAILOVIC et al., 2015), antioxidante (SOUILEM et al., 2017), hipocolesterolêmica (YEH et al., 2014), fungicida (NOWACKA et al., 2014) e antitumoral (WASSER, 2002; MORADALI et al., 2007; BARROS et al., 2007; JEFF et al., 2016; ZHAO et al., 2017; YUAN et al., 2017).

De importância para a medicina moderna, em especial no contexto oncológico, esses produtos bioativos representam uma fonte abundante de compostos que são possíveis

moduladores do crescimento de células tumorais (COSTA FORTES et al., 2010; CFR FERREIRA et al., 2010; MAO et al., 2015). Estudos apontam que lectina isolada da espécie *Russula lépida*, tem atividade antiproliferativa contra células de hepatoma (Hep G2) e células MCF-7 de câncer de mama humano (ZHANG et al., 2010). Registros indicam que o polissacarídeo, obtido do micélio de *Phellinus linteus*, tem ação antitumoral em células de Sarcoma 180 (S-180), por mecanismos associados com a indução de apoptose (MEI et al., 2015). Assim, este estudo objetivou apontar alguns dos compostos bioativos isolados das espécies do filo Basidiomycota, em especial para a espécie *N. gardneri*, e seus mecanismos de ações, compatíveis para atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais, com base em periódicos científicos.

## 2 ESTRATÉGIA METODOLÓGICA

Para esta revisão foram utilizadas as plataformas *PubMed*, *Science Direct*, *Web of Science* e *Scopus* com os seguintes termos indexadores “*mushroom*”, “*bioluminescent mushrooms*”, “*mushroom*” AND “*biological activities*”, “*mushroom*” AND “*secondary metabolites*”, “*mushroom*” AND “*antitumoral activity*”. A pesquisa foi realizada em artigos dos últimos cinco anos; e os termos de busca foram observados nos títulos dos artigos publicados em inglês, bem como nas palavras-chave. Foram incluídos nas análises os artigos de estudos experimentais *in vitro*, *in vivo* com basidiomicetos e seus metabólitos, relacionados a mecanismos indicativos de atividades antioxidantes, anti-inflamatória e antitumoral. Foram excluídos dados duplicados entre as diferentes plataformas e artigos com títulos ou resumos incompatíveis com os critérios de inclusão, bem como artigos de revisão não relevantes em relação aos objetivos do estudo.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Obtenção de dados para análises

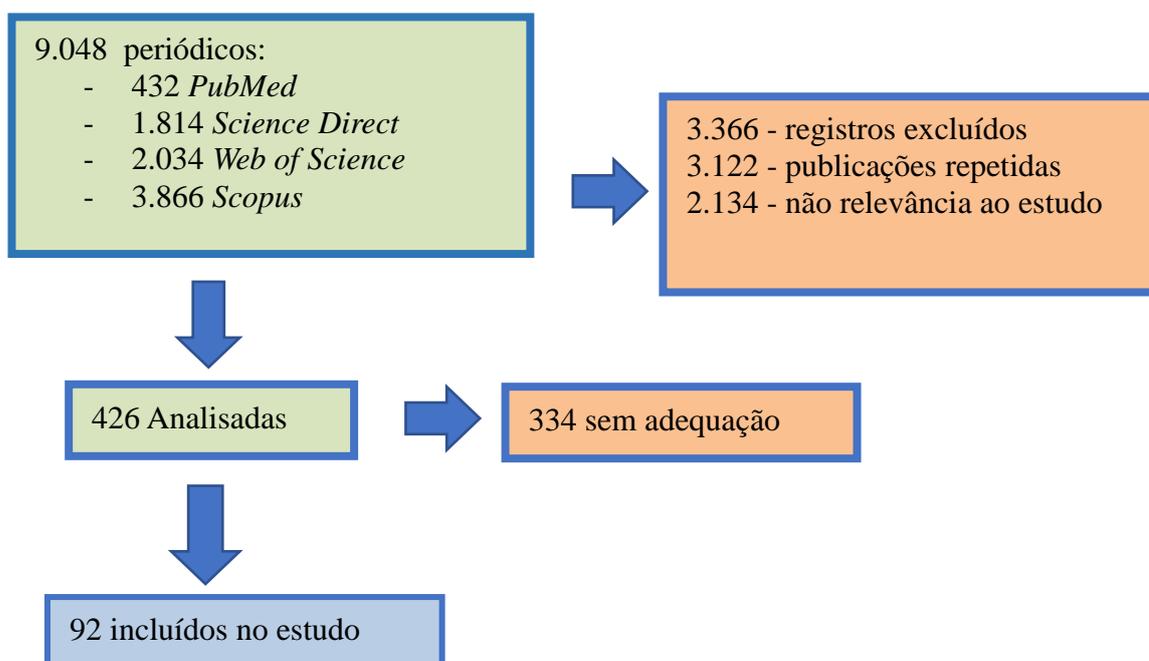
A busca nas bases de dados relacionados a cogumelos revelou 9.048 registros, com 426 estudos preenchendo os critérios de inclusão. O número de publicações encontradas nas plataformas a partir dos indexadores usados está apresentado na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Levantamento quantitativo das publicações relacionadas às atividades biológicas/farmacológicas de basidiomicetos nas bases de dados pesquisadas.

Descritores	Pubmed	Web of Science	Science Direct	Scopus	TOTAL
“mushrooms”	397	2525	1734	3428	8084
“bioluminescent mushrooms”	04	10	02	09	25
”mushroom” AND “biological activities”	15	131	47	249	442
“mushroom” AND ”secondary metabolites”	14	90	17	110	231
”mushroom’ AND “antitumor activity”	02	178	14	72	266
<b>Total</b>	<b>432</b>	<b>2934</b>	<b>1814</b>	<b>3868</b>	<b>9048</b>

Em síntese, das 9.048 publicações encontradas nos bancos de dados, 3.366 foram excluídos por tratar-se de revisão ou com títulos que fugiam do interesse biológico; 3.122 publicações repetidas; e 2.134 não traziam assuntos relevantes ao estudo, a partir da análise do resumo. Quatrocentos e vinte e seis (426) foram analisadas integralmente. Destas, apenas 92 artigos estavam adequados à proposta da pesquisa (**Figura 1**).

**Figura 1.** Fluxograma da análise e elegibilidade das publicações encontradas nesta pesquisa



### 3.2 Aspectos gerais dos Basidiomycotas e da espécie *Neonothopanus gardneri*

O reino *Fungi* é dividido em sete filos principais, sendo eles Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia e Neocallimastigomycota (STEENKAMP; WRIGTH; BALDAUF, 2006; HIBBETT et al., 2007; KIRK et al., 2008; BLACKWELL, 2011). Os Basidiomycotas formam estruturas de reprodução macroscópicas e são conhecidos, popularmente, por cogumelos ou orelhas de pau. São em sua maioria saprófitas e participam da decomposição de folhas, galhos e troncos, sendo encontrados em uma grande variedade de substratos e em diferentes biomas (GIMENES, 2010).

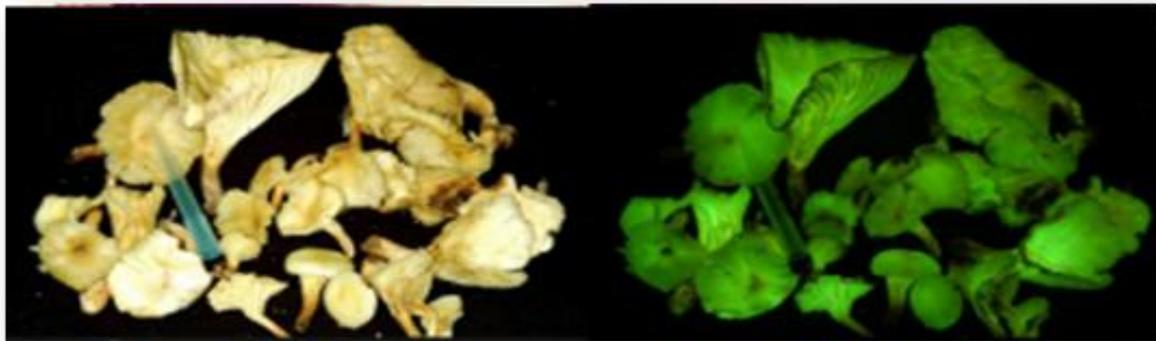
O papel ecológico dos Basidiomycotas é a ciclagem de nutrientes, interferindo, principalmente, no ciclo do carbono por serem degradadores de lignina. Além disso, também contribuem para a manutenção do ciclo de outros elementos como nitrogênio, fósforo e potássio (NA et al., 2016, AN et al., 2016) e são fonte ilimitada de agentes biologicamente ativos com utilização terapêutica (BLUNT et al., 2006; SMETANINA et al., 2007; SHIRMILA; RADHAMANY, 2012; SAMUEL; PRINCE, PRABAKARAN, 2017), especialmente, como antitumorais (MIZUNO et al., 1995; RODRIGUES et al., 2003; RUBEL, 2006; POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006; FAN et al., 2006; ZHANG et al., 2010; MEI et al., 2015).

No Brasil, os representantes do filo Basidiomycota são encontrados em todas as regiões e nos mais variados ecossistemas (NEVES et al., 2013). Na caatinga, é possível encontrar, principalmente, as espécies *Bovista plubea*, *Tulostoma excentricum* e a espécie *Neonothopanus gardneri*. O *N. gardneri* foi encontrado no Piauí, Tocantins, Goiás e Maranhão (OLIVEIRA et al., 2013). O *N. gardneri* difere de *N. nambi* na estatura do basidioma, na pigmentação e no tamanho dos basidiósporos. *Neonothopanus nambi* forma basidiomas reduzidos, excêntricos, com colorações brancas a cinzentos claros e basidiósporos elipsoides com 4-6,5 x 2,8-4 µm. Já o *N. gardneri* forma basidiomas amarelos com uma estrutura bem desenvolvida e excêntrica com 9,5-12 x 9-11 µm (PETERSEN; KRISAI-GREILHUBER, 1999).

Na caatinga, é possível encontrar os Basidiomycotas das espécies *Bovista plubea*, *Tulostoma excentricum* e *N. gardneri*. O *Neonothopanus* é o gênero de duas espécies de fungos da família Marasmiaceae. A espécie *Neonothopanus nambi* é encontrada na Austrália, América do Sul, América Central e Malásia, (COMER, 1981); enquanto que *N. gardneri* é

encontrado na América do Sul. O *N. gardneri* ('Flor de coco') (**Figura 2**) pertence à linhagem Omphalotus e exibe, excepcionalmente, intensa luminescência tanto do micélio quanto de basidiomas. Este fungo é distribuído ao longo da Mata dos Cocais brasileira nos estados do Maranhão, Tocantins, Goiás e Piauí, que é um bioma de transição entre a Floresta Amazônica e a Caatinga. Corpos de frutificação podem crescer na base de palmeiras (*Attalea humilis*, *Attalea funifera* e *Orbignya phalerata*) (CAPELARI et al., 2011).

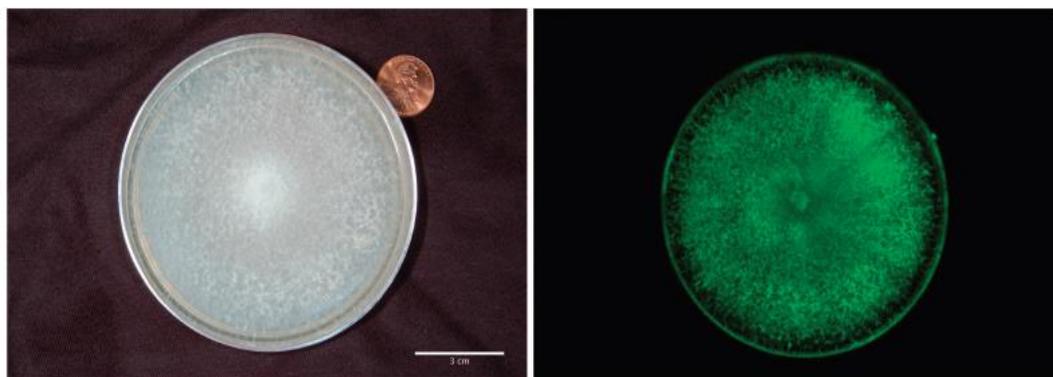
**Figura 2.** Espécie *Neonothopanus gardneri*



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2013).

A emissão de luz por cogumelos *N. gardneri*, encontrados em florestas brasileiras, é controlada por um relógio circadiano e serve para atrair insetos para dispersão de esporos (OLIVEIRA et al., 2015). Esse basidiomiceto é o maior fungo bioluminescente do Brasil (**Figura 3**) e um dos maiores do mundo (CAPELARI et al., 2011; VENTURA et al., 2015).

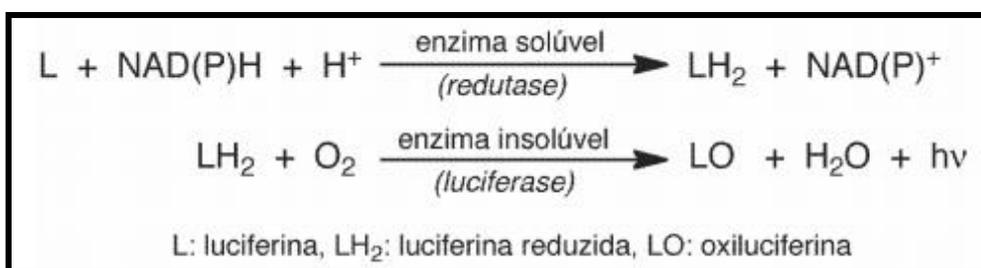
**Figura 3.** *N. gardneri* em luz natural (à esquerda) e no escuro (à direita)



Adaptada de VENTURA et al. (2015).

Os sistemas bioluminescentes produzem luz através da oxigenação de um substrato, genericamente chamado luciferina (do latim Lúifer, portador da luz); e uma enzima, luciferase (KAHLKE; UMBERS, 2016). De acordo com Oliveira e Stevani (2009), a emissão de luz pode ser obtida *in vitro* por mistura do extrato quente (fonte de luciferina) e do extrato frio (fonte de redutase / luciferase) e, finalmente, pela adição de NADPH para desencadear a reação (AIRTH; FOERSTER, 1960; OLIVEIRA et al, 2013), que pode ser observada na **Figura 4**.

**Figura 4.** Mecanismo de emissão de luz em fungos.



Adaptada de OLIVEIRA et al. (2013).

### 3.3. Atividades biológicas de bioativos isolados em espécies do filo *Basidiomycota*

O filo *Basidiomycota* vem sendo descrito como de importância alimentar e nutracêutica (CHANG; BUSWELL, 1996; LIN e LIN, 1997; RUBEL, 2006; FAN et al., 2006). Vários bioativos foram identificados com atividades antimicrobiana (POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006; IMITIAJ; LEE, 2007), antiviral (FAN et al., 2006), antioxidante, anticancerígena, redutora de colesterol, imunoestimuladora (BARROS et al, 2007, 2008; FERREIRA et al, 2007; OYETAYO, 2009), cardiovascular, antibacteriana, antiparasitária, anti-inflamatória, antidiabética (IWALOKUN et al, 2007; SHARMA, GAUTAM, 2017; CHOU et al., 2016; LEE et al., 2016; SILVEIRA, et al., 2014); controle de pragas em plantas (KOBAYASHI; HIRAMATSU; AKATSUKA, 1997; DI PIERO; PASCHOLATI, 2004), e também antitumoral (WASSER, 2002; CHANG; WASSER, 2012; PLESZCZYŃSKA et al., 2016).

A espécie *Flammulina velutipes* (cogumelos enoki), um dos principais cogumelos comestíveis no mercado, é reconhecida por seu alto valor nutricional. Além disso, possui também atividades antitumoral e anticancerígena, antiaterosclerótica, anti-hipertensiva e antioxidante, melhora da memória e cognição, anti-inflamatória, imunomoduladora e

antibacteriana atribuídas aos seus constituintes bioativos como carboidratos, proteínas, lipídios, glicoproteínas, fenóis e sesquiterpenos em diferentes partes do cogumelo (TANG et al., 2016).

As atividades biológicas do filo *Basidiomycota* estão relacionadas aos seus metabólitos secundários, tais como ácidos orgânicos, alcaloides, terpenoides esteroides e compostos fenólicos (JAYAKUMAR et al., 2011). Os compostos ácido benzoico, ácido hidrogenbenzoico, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido gentísico, ácido vanílico, ácido hidroxicinâmico, ácido cinâmico, ácido cafeico, quercetina, rutina, hesperetina, caempferol, ácido ferúlico, resveratrol, ácido elágico e ácido pirogálico são alguns dos compostos fenólicos e flavonoides que já foram encontrados em diversas espécies de cogumelos (VALENTÃO et al., 2005; PUTTARAJU et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006; BARROS et al., 2008(a); JAYAKUMAR; THOMAS; GERALDINE, 2009; FERREIRA et al., 2009(b)).

Em várias espécies de cogumelos, os polissacarídeos, terpenoides, esteroides, alcaloides e compostos fenólicos estruturados demonstraram atividades antioxidante, antiviral, antibacteriana, anticolinesterase, antifúngica, anti-inflamatória, imunomoduladora e antitumoral (GAN et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2001; NIEDERMEYER et al., 2005; MORADALI et al., 2007; TONG et al., 2009; TEL, 2015). Os polissacarídeos isolados de extratos aquoso e etanólico de *Boletus edulis* apresentaram atividade antitumoral em estudos com células tumorais MCF-7 de câncer de mama (NOVAKOVIC et al., 2017). Na realidade, há muitos anos a atividade antitumoral de polissacarídeos de cogumelos tem sido demonstrada, como relatado por Gregory et al. (1966), que isolou diversos polissacarídeos com efeitos citotóxicos em células de Sarcoma S-180, adenocarcinoma 755 e leucemia L-1210 (ZHANG et al., 2007; INTARAUDOM et al., 2013).

Além disso, os terpenoides foram correlacionados com as atividades antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antiplasmodial, antimalárica, antiviral e citotóxica (DURU; CAYAN, 2015). Estudos evidenciaram, em basidiomicetos, proteínas, vitaminas (riboflavina, niacina, tiamina, ácido fólico e ácido ascórbico), minerais (cobre, fósforo, magnésio, potássio, sódio e zinco), ácidos graxos insaturados, fibras, ergosterol, lecitina, terpenoides e aminoácidos imunomoduladores, como a arginina e a glutamina (BUSWELL; CHANG, 1993; WANG; SAKODA, SUZUKI, 2001; NOVAES, 2007). Os sesquiterpenos nambinona A e C, epi-nambinona B e nambinona D estão ligados à atividade citotóxica dos basidiomicetos contra as células tumorais citadas anteriormente (KANOKMEDHAKUL et al., 2012). Ainda, outros estudos apontam que o

sesquiterpeno 2,6,10,14-tetrametilpentadecano, isolado do basidiomiceto *Agaricus sylvaticus*, não induz toxicidade em animais (FORTES et al., 2006), no entanto, apresentam efeitos citotóxicos em diferentes células neoplásicas (GHANTOUS et al., 2010).

Em síntese, os compostos químicos de várias espécies de cogumelos do filo *Basidiomycota*, que incluem polissacarídeos, terpenoides, esteroides, alcaloides e compostos fenólicos estão relacionados com as atividades antioxidante, antiviral, antibacteriana, anticolinesterásica, antifúngica, anti-inflamatória, imunomoduladora e antitumoral (ISHIKAWA et al., 2001; NIEDERMEYER et al., 2005; MORADALI et al., 2007; TONG et al., 2009; TEL, 2015).

### **3.4. Atividades antioxidante, imunológicas e antitumorais do filo Basidiomycota: compostos bioativos e mecanismos de ação**

#### 3.4.1 Atividades antioxidantes de compostos químicos isolados do filo Basidiomycota

Como relatado, o filo Basidiomycota apresenta valor nutricional devido seus baixos níveis energéticos e grandes quantidades de minerais, aminoácidos fibras e vitaminas, bem como por suas atividades antioxidantes atribuídas a misturas complexas de compostos químicos em extratos obtidos do Basidiomycota, como também polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos, terpenos e esteroides (TURKOGLU et al., 2007; FIRENZUOLI et al., 2008; VAZ et al., 2011). Compostos químicos isolados das espécies *Ramaria botrytis*; *Clavaria fragilis*; *R. stricta*; *Ramaria botrytis*; *Boletus edulis*; *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatu*, *P. pulmonarius*, *G. lucidum* e *Agaricus bisporus* foram considerados antioxidantes via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (MILOVANOVIĆ et al., 2014; NOVAKOVIC et al., 2017; SHARMA; GAUTAM, 2017). Os compostos químicos, presentes em extratos, podem ter atividades antioxidantes por mecanismos associados a: eliminação de radicais livres (LIU et al., 2013a; KUNJADIA et al., 2014; PAROLA et al., 2017; DULAY et al., 2017; NONAKOVIC et al., 2017); captura de radicais livres (HAKIME-SIVA et al., 2013; STOJKOVIC et al., 2017); eliminação de ERO's (SHARMA;GUTAN, 2017) e diminuição dos níveis de Fe<sup>3+</sup> (KHALILI et al., 2015).

Existem relatos de que os polissacarídeos TLH-1, TLH-2 e TLH-3, extraídos de *Tricholoma lobayense*; os extratos acetone e hexano, extraídos de *Lentinus tigrinus* e *Pleurotus djamour*; *exo-polifenóis* (EPC) e *endo-polifenóis* (IPC), extraídos de *Inonotus obliquus*, também apresentaram atividades antioxidantes no teste com DPPH (XU et al.,

2015(a); CHEN et al., 2017; DULAY et al., 2017). Resultados similares foram encontrados a partir da produção de nanopartículas de polissacarídeos de *Ganoderma lucidum* e *Momordica charantia* que além da melhor atividade em relação ao DPPH, também apresentaram maior potencial na remoção do radical hidroxil e ânion superóxido em comparação com os polissacarídeos bioativos (QUIM et al., 2018). Além da capacidade sequestradora de DPPH, já foi evidenciado, nas espécies *Tricholoma lobayense*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus djamour*, *Boletus edulis* e *T. versicolor*, capacidade na doação de átomos de hidrogênio, eliminação de radicais hidroxila e superóxido e papel antioxidante redutor de ferro (CHEN et al., 2017, DULAY et al., 2017, NOVAKOVIC et al., 2017, WANG et al., 2017).

Estudos também apontaram que os polissacarídeos heteroglicanos, isolados de *Pleurotus cystidiosus* e de *Entoloma lividoalbum* na alteração dos níveis de GSH na sua forma reduzida e oxidada (MAITY et al., 2014; PANDA et al., 2017), e os isolados das espécies *C. ventricosum*, *Pleurotus cystidiosus*, foram responsáveis, como antioxidantes, por agirem nos níveis de Malondialdeído (MDA), catalase (CAT) e superóxido dismutase (MAITY et al., 2014; LIU et al., 2016; PANDA et al., 2017). As enzimas antioxidantes capazes de manter o equilíbrio redox do organismo, podemos citar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (GSH) (BAYIR, et al., 2006). A glutatona é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) presente no organismo na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A GSH age como um antioxidante enzimático, atuando sobre a remoção de hidroperóxidos e reduzindo as EROs (MEISTER, ANDERSON, 1983; LU, 2000; NATALE, 2005).

Os polissacarídeos obtidos do Basidiomycota atuam como antioxidantes por mecanismos associados à remoção do radical hidroxil e ânion superóxido (CHEN et al., 2017; QIM et al., 2018), influenciam sobre a GSH e peroxidação lipídica (PANDA et al., 2017), eliminação (WANG et al., 2013; MAITY et al., 2014; LI. WANG; WANG, 2017; ZHANG et al., 2018) e captura (XU et al., 2015(b)) de radicais livre. Em síntese, alguns dos mecanismos antioxidantes dos Basidiomycotas atribuídos aos seus compostos químicos dos extratos, dos polissacarídeos, metabólitos, proteínas e fenólicos estão apresentados na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Extratos e constituintes químicos isolados do filo Basidiomycota e mecanismos antioxidantes, em diferentes estudos não clínicos

Extratos/Constituintes químicos	Modelo de estudo	Mecanismo de ação	Referências
Extrato de <i>Hghdfj Ganoderma Lucidum</i> em 100 mg / kg.	Modelo de isquemia/reperfusão I/R em coelho	Diminuição na complacência da bexiga e nas respostas contráteis causada por I/R	LEVIN et al., 2017
Extrato aquoso <i>Lentinula edodes</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i>	DPPH e ABTS	Eliminação de radicais livres DPPH e ABTS	PAROLA et al., 2017
Extrato etanólico do Corpo frutífero de <i>G. lucidum</i> .	Células HeLa, HepG2), MCF-7 e NCI-H46 DPPH e atividade antitirosinase	Inibição da tirosinase atividade e eliminação do radical de DPPH Inibindo da produção de NO	TAOFIQ et al., 2017
Extrato acetoneitrila e hexano extraídos dos corpos de frutificação de <i>L. tigrinus</i> e <i>P. djamour</i> em 500 mg / L.	Ensaio de DPPH.	Eliminação de radicais livre.	DULAY et al., 2017
Extratos aquosos e etanólicos brutos de <i>Boletus edulis</i> .	DPPH, óxido nítrico, ânion superóxido, radicais hidroxila e redução de ferro	Anti-radical DPPH, anti-hidroxila, antinítrica atividade do radical aniônico anti-superóxido e poder antioxidante redutor de ferro	NOVAKOVIC et al., 2017
Extrato metanólico de <i>Meripilus giganteus</i> Karst. 0,025-0,4 mg /mL.	TBARS MTT e Ensaio de toxicidade de zebrafish <i>in vivo</i>	Captura de radicais livres; Induziu processo de apoptose e inibiu a migração celular <i>in vitro</i> .	STOJKOVIĆ et al., 2017
Extratos secos com $\beta$ -caroteno, licopeno, ácidos ascórbicos, antocianidinas e quantidade de tocoferol. das <i>Ramaria botrytis</i> ; <i>Clavaria fragilis</i> ; <i>R. stricta</i> ; <i>Ramaria botrytis</i> ; <i>Clavaria fragilis</i> .	DPPH e ABTS	Eliminação de espécies reativas de oxigênio	SHARMA; GAUTAM, 2017
Extratos de Micélio fúngico <i>Pleurotus ostreatus</i> em 0,02; 0,04; 0,06; 0,08mg/mL.	Radical hidroxil	Eliminação de radical hidroxil	KUNJADIA et al., 2014
Extrato metanólico <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Hypsizigus tessulatus</i> .	Radical radical 1, 1-difenil, -2-picrilhidrazil (DPPH).	Eliminação de radicais livres	CHOWDHURY et al., 2015
Extrato aquoso por decocção e extrato aquoso obtido por maceração de <i>Agaricus blazei</i> Murrill.	Inibição da atividade de HRP (horseradish peroxidase) e MPO (mieloperoxidase); medida por quimioluminescência.	Inibição de processos oxidativos enzimáticos, com 100% de inibição da HRP e MPO (mieloperoxidase); Inibição do estresse oxidativo celular, com 80% de inibição nos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) Ação direta sobre espécies reativas, com 62% e 87% de supressão do HOCl e ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ );	HAKIME-SILVA et al., 2013
Extrato metanólico de <i>Pleurotus porrigens</i> .	Avaliação da atividade quelante de $Fe^{+}$ em camundongos com sobrecarga de ferro	Diminuição dramática no conteúdo plasmático de $Fe^{3+}$ + Diminuição da quantidade de ferro depositado no fígado	KHALILI et al, 2015
Extrato aquoso e etanólico de <i>Inonotus obliquus</i> .	Radicais hidroxila; DPPH; eliminação de $H_2O_2$	Eliminação de radicais superóxido e hidroxila. Aumentou a atividade das enzimas antioxidantes em	LIU et al., 2013

		camundongos.	
MycPo, produto natural da <i>Pleurotus ostreatus</i> .	Redutor de íons férricos (FRAP)	Redução de íons férricos	VAMANU et al., 2018
Metabólitos secundários de <i>Ganoderma leucocontextum</i> 25; 50; 100 e 200 µm.	Células PC12 frente ao dano induzido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Inibição de radicais livres induzidos pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CHENG, 2018
Ergosterol e compostos fenólicos de Corpos frutíferos e micélios de <i>P. eryngii</i> e <i>S. belinii</i> .	DPPH, potencial redutor, TBARS	Captura de radicais livres	SOULIEM et al, 2017.
Polissacarídeos de <i>Ganoderma lucidum</i> e <i>Momordica charantia</i> em 30-2000 µg/mL.	DPPH, radical hidroxil e ânion superóxido	Remoção do radical hidroxil e ânion superóxido	QIN et al., 2018
Polissacarídeo heteroglicano (PCPS) de Extratos de <i>L. edodes</i> e <i>P. Ostreatus</i> em 10, 25, 50, 100, 200, 400µg / mL.	MDA Dosagem enzimática	Diminuição de GSH Aumento de GSSH Diminuição da peroxidação lipídica	PANDA et al., 2017
Polissacarídeos dos corpos de frutificação de <i>H. Serotina</i> em 2, 4, 8, 12, 16 e 20 mg/mL.	ABTS e pelo método de reação de Fenton.	Eliminação sobre os radicais ABTS e hidroxila Doação de átomos de hidrogênio ou elétrons	LI; WANG; WANG, 2017
Polissacarídeos de micélios de <i>T. Versicolor</i> .	Radical hidroxil	Capacidade doadora de átomos de hidrogênio	WANG et al., 2017
Polissacarídeos TLH-1, TLH-2 e TLH-3 extraídos do corpo de frutificação de <i>T. Lobayense</i> em 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg / mL.	DPPH	Eliminação do superóxido e hidroxila e capacidade antioxidante total	CHEN et al., 2017 (b)
Polissacarídeo CVP-1S extraído de <i>C. ventricosum</i> .	DPPH , ABTS e MDS	Diminuição dos níveis de glicose Diminuição dos níveis de insulina Aumento de GSH-Px, SOD e Catalase Diminuição de MDA.	LIU et al., 2016
Polissacarídeos de extratos etanólicos dos corpos frutíferos e micélios de <i>Hypsizygus ulmarius</i> .	DPPH	Eliminação de radicais livres.	GREESHMA et al., 2016
Heteroglicano solúvel em água (PS-II) extraído de <i>E. Lividoalbum</i> em 50, 100, 200, 400µg/ml..	Linfócitos humanos, determinação de GSH, GSSG, MDA, ensaio de liberação de óxido nítrico	Diminuição de GSH; Aumento de GSSH Manutenção de MDA.	MAITY et al., 2014
Polissacarídeos micelianos <i>Flammulina velutipes</i> ( FvP-2 (polissacarídeos brutos) e FvP-3.	DPPH e do radical hidroxilo	Eliminação de radicais livres.	ZHAO et al., 2013
Polissacarídeos de <i>G. incarnatum</i> (GIPS) de <i>G. incarnatum</i> em doses de 0,1, 0,3 e 0,9 g / kg.	Camundongos BALB induzidos por ciclofosfamida monodrato (CTX),	Aumento dos níveis de superóxido dismutase no soro e no baço; e o nível reduzido de espécies reativas de oxigênio no baço.	WANG et al, 2018
Exo-polifenóis (EPC) e endo-polifenóis (IPC) extraídos de micélios de <i>I. Obliquus</i> em 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 mg/L.	DPPH	Captura de radicais livres.	XU et al., 2015 (b)
Fenóis e flavonoides Extratos miceliais <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>P. ostreatus</i> e <i>P. Pulmonarius</i> em 0,5; 1;2;4;8;16 e 32mg/mL.	DPPH	Eliminação dos radicais DPPH.	MILOVANOVIĆ et al., 2014
Corpos frutíferos e micélios de	DPPH; FRAP e	Eliminação de radicais livres.	GHAHREMANI-MAJD;

<i>Agaricus bisporus.</i>	ABTS		DASHTI, 2015
Fucogalactomanano (FGM), polissacarídeo não sulfatado isolado do cogumelo <i>T. ballouii</i> . em 1,25 e 1,6 mg / mL, 30, 50 e 70 mg /Kg.	Edema na pata e atividade contra radicais superóxido e hidroxila	Inibição de radicais superóxido e hidroxila. Redução o edema em 32,8%, 42,0% e 56%.	LIMA et al., 2016
Selênio-polissacarídeo da <i>Catathelasma ventricosum</i> .	Camundongos diabéticos induzidos por STZ	Diminuição do colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C). Aumento da atividade de enzimas antioxidantes no fígado e nos rins e no colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL-C)	LIU et al., 2013b

### 3.4.2 Compostos químicos dos Basidiomycota e mecanismos anti-inflamatórios

Algumas espécies do filo Basidiomycota são descritas na literatura como moduladoras do sistema imunológico, os quais agem combatendo o estabelecimento de infecções virais e bacterianas. Além disso, também reduzem a resposta inflamatória, ajudam a equilibrar os níveis de glicose, são benéficos para a função cardiovascular, possuem atividade antioxidante e diminuem o risco de câncer (BARROS et al., 2008 (b); MENG et al., 2016). Bernardshaw et al. (2005) estudaram o efeito de *A. blazei* na proteção contra infecção sistêmica por *Streptococcus pneumoniae* e observaram um aumento nas concentrações de citocinas MIP-2 (proteína inflamatória de macrófagos 2) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) no soro dos camundongos que receberam o extrato. Foi verificado que *A. blazei* atua na resposta nociceptiva e na inflamação aguda, possivelmente reduzindo mediadores da inflamação em fase aguda (CARVALHO et al., 2011).

Outros estudos também relataram atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Agaricus blazei* Murill em ratos Wistar, através do teste de formalina modificada. Chadwick et al. (2013) destacaram o papel das lactonas sesquiterpênicas, produzidas por plantas, e explorou os mecanismos pelos quais elas interagem nos consumidores dessas plantas. Chegaram a propor alguns mecanismos para atuar na redução da inflamação e tumorigênese em níveis potencialmente alcançáveis em seres humanos. Além da resposta anti-inflamatória, as lactonas sesquiterpênicas podem sensibilizar as células tumorais para tratamentos de drogas convencionais.

Os polissacarídeos atuam como anti-inflamatório por mecanismos associados ao aumento de anticorpos IgA e interleucinas IL2, IL3 (SMIDERLE et al., 2014; ZHENG et al., 2015; WANG et al., 2018a), redução de edema (LIMA et al., 2016), estimulação de COX2,

TNF (SMIDERLE et al., 2014; WANG et al., 2015). As proteínas e os diterpenoides também atuam na redução de interleucinas (LEE et al., 2014). Alguns dos estudos sobre atividades anti-inflamatórias dos Basidiomycotas estão apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Extratos e constituintes químicos isolados do filo Basidiomycota e mecanismos de atividades anti-inflamatórias em modelos de estudos não clínicos

Extratos/Constituintes químicos	Modelo de estudo	Mecanismo de ação	Referências
Polissacarídeos de <i>G. incarnatum</i> (GIPS) em doses de 0,1, 0,3 e 0,9 g / kg.	Camundongos BALB induzidos por ciclofosfamida monoidrato (CTX).	Aumento de imunoglobulina IgA e IgG. Produção de interleucinas IL-2, IL-3 e IL-6, interferons, incluindo interferon (IFN) - $\alpha$ e IFN- $\gamma$ e proteína quimiotática de monócitos 1 no baço, que resultou na recuperação acelerada da imunossupressão.	WANG et al., 2018
Polissacarídeos de <i>T. orientalis</i> (TOP-2) em 50, 100 e 200 mg / kg.	Células LLC (carcinoma pulmonar de Lewis).	Propriedades imunomoduladoras; Estimulou a função fagocitótica de macrófagos e promoveu notavelmente a expressão de citocinas séricas ( IL-2, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ).	ZHENG et al., 2015
Fucogalactomanano (FGM), polissacarídeo não sulfatado isolado do cogumelo <i>T. ballouii</i> . em 1,25 e 1,6 mg / ml e dose 30, 50 e 70 mg /Kg.	Edema na pata e atividade contra radicais superóxido e hidroxila.	Redução do efeito inflamatório no edema.	LIMA et al., 2016
$\beta$ -D-glucano foi isolado de <i>P. sajor-caju</i> em 1,3 e 10 mg/kg.	Camundongos swiss- peritonite, nocicepção pela indução intraplantar de formalina, quantificação total de leucócitos e MPO.	Inibição da fase inflamatória de nocicepção induzida por formalina; Reduziu o número de leucócitos totais e níveis de mieloperoxidase induzida por LPS.	SILVEIRA, et al., 2014
$\beta$ -D-Glucano isolado de corpos de frutificação de <i>C. Militaris</i> em ,10,30 mg/kg.	Camundongos swiss-, nocicepção pela indução intraplantar de formalina, quantificação total de leucócitos e MPO.	Estimulação da expressão de macrófagos de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e COX-2 por THP-1. Inibição da expressão dos genes pró-inflamatórios. Inibição da fase inflamatória da resposta nociceptiva induzida pela formalina. Redução da migração de leucócitos totais.	SMIDERLE et al., 2014
MGB – beta glucano de <i>Ganoderma lucidum</i> em 50 $\mu$ L.	Carcinoma pulmonar de Lewis (LLC1).	Aumento da expressão de IFN- $\gamma$ mRNA. Redução da expressão de COX-2 no modelo de tumor pulmonar. Redução da produção de TGF- $\beta$ no soro. Aumento da expressão de mRNA de IL-12 e IFN- $\gamma$ e diminuição de mRNA de IL-6, IL-10, COX-2 e TGF- $\beta$ .	WANG et al., 2015
Fração polissacarídea de baixo peso molecular 10-100 kDa (LIOP), extraída do corpo de frutificação <i>I. obliquus</i> (IO) em 100 kDa.	Camundongos C57BL / 6 com dieta rica em gordura (HDF) e diabetes induzida	Diminuição da expressão de TGF- $\beta$ e NF- $\kappa$ B no córtex renal; Aumento da sensibilidade à glicose (menor tolerância à insulina); Redução dos níveis de triglicérides,	CHOU et al., 2016

	por 50 mg/kg de STZ.	elevação da relação HDL / LDL Diminuição da razão albumina / creatinina (ACR).	
Proteína bioativa (PEP) isolada de <i>P. eryngii</i> ,	Resposta inflamatória estimulada por LPS em macrófagos.	Inibição da superprodução de mediadores pró-inflamatórios, incluindo óxido nítrico (NO), citocina IL-1 $\beta$ e IL-6.	YUAN et al., 2017
Diterpenoide isolado do micélio, erinacina da <i>Hericium erinaceus</i> e seu derivado Erinacina A em 50mg/kg e 300 mg/kg; Dose de: 1mg/kg e 5mg/kg.	Modelos de AVC isquêmico global se utilizando de Ratos.	Redução dos volumes totais infartados Ericina A- redução dos níveis de interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6 e fator de necrose tumoral, supressão de espécies reativas de nitrogênio e na regulação negativa da NO sintase indutível (iNOS), p38 MAPK e CHOP.	LEE et al., 2014

### 3.4.3 Compostos químicos isolados do filo Basidiomycota e mecanismos de toxicidade/citotoxicidade

Os metabólicos secundários oriundos de Basidiomycota podem induzir toxicidade e ocasionar alterações de atividades biológicas em humanos, e conseqüentemente, são considerados com potenciais para fármacos (BUA-ART et al., 2010; BUA-ART et al., 2011; BURAKORN et al., 2015). Estudos apontam que a espécie *N. gardneri* é uma boa opção para realizar ensaios toxicológicos, quando comparado com o fungo *G. viridilucens* (VENTURA et al., 2015). No *Neonothopanus*, gênero do *N. gardneri*, a hispidina (precursora da luciferina) é um dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante (PERRIN; TOWERS, 1973; OBA et al., 2017). Os compostos nambinona C, aurisina A e aurisina K, isolados do *N. nambi*, são responsáveis pela citotoxicidade em linhagens celulares de câncer NCI-H187 e de colangiocarcinoma (KANOKMEDHAKUL et al., 2012).

Os compostos químicos dos Basidiomycotas vêm sendo relatados como citotóxicos em diferentes tipos celulares, demonstrando potencial para terapia do câncer (LAGUNES-CASTRO et al., 2016; WANG et al., 2018; FINIMUNDY et al., 2018; LI et al., 2018; MATUSZEWSKA et al., 2018), como antitumorais devido ao seu potencial citotóxico (LUCAS et al., 1957). A calvacina isolada de *Calvatia gigantea* também apresentou ação antitumoral frente a adenocarcinoma mamário 755, leucemia L-1210 e linhas celulares HeLa, bem como em Sarcoma S-180 (LUCAS et al., 1958). As axinisonas A e B, isoladas da espécie *Bacillus cereus*, apresentaram citotoxicidade contra MCF-7, KB, NCI-H187. Nambinona C e aurisinas A e K mostraram citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer NCI-H187.

Aurisin A e K apresentaram citotoxicidade contra as linhagens celulares de colangiocarcinoma (KANOKMEDHAKUL et al., 2012).

Os derivados de sulfatado de (1,3) - $\beta$ -D-glucano (GS), obtidos de *Ganoderma lucidum*, apresentaram citotoxicidade em células humanas com câncer de próstata (PN2TA) (WAN-MOHTAR et al., 2016), assim como A  $\beta$ -glucana, obtida do micélio de *Antrodia cinnamomea*, em hiperplasia benigna da próstata (PENG et al., 2015). Citotoxicidade de químicos isolados da espécie *Morchella esculenta* foi observada em linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão humano. Efeitos citotóxicos também foram observados na mesma espécie relacionados aos compostos derivados do ergosterol e do ácido octadecanóico por indução de apoptoses em linhagens celulares de adenocarcinoma do pulmão humano A549, H1264, H1299 e Calu-6 (LEE et al., 2018).

Os extratos obtidos de espécies do filo Basidiomycota apresentam mecanismos que apontam para toxicidade e/ou citotoxicidade associados a seus compostos químicos, tais como aumento de GSH, BAX, BCL-2 e CACO 2 (ELKAHTEEB et al., 2018), expressão de p53 e regulação de caspases e parada do ciclo celular (MORRIS, 2014), produção de citocinas (LAGUNES-CASTRO et al., 2015). Os polissacarídeos também induzem toxicidades por parada do ciclo celular e indução de apoptoses, autofagia, aumento das proteínas BAX e caspases 3, diminuição do BCL2 (ZHAO et al., 2017), além de aumento da liberação de citocromo e diminuição de ATP (PIRES et al., 2017), necrose por produção de óxido nítrico (MAO et al., 2015), ativação de TNT e de interleucinas e INOS (WANG et al., 2013). Em síntese, alguns dos mecanismos de indução de toxicidade/citotoxicidade estão apresentados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Alguns mecanismos de toxicidade/citotoxicidade de compostos químicos isolados de espécies do filo Basidiomycota compatíveis para ações antitumorais, em modelos de estudos não clínicos

Extratos/Constituintes químicos	Modelo de estudo	Mecanismo de ação	Referências
Extratos de proteína nano de <i>G. lucidum</i> e <i>P. ostreatus</i> .	Citotoxicidade em macrófagos e células ósseas saudáveis.	Supressão significativamente da proliferação de macrófagos. Inibição no crescimento de células osteoblásticas humanas saudáveis.	ZHANG et al., 2017.
Extratos aquosos e etanólicos brutos de <i>Boletus edulis</i> .	Ensaio antiproliferativos de MTT (células cancerígenas MCF-7 de mama humana.	Não identificado.	NOVAKOVIC et al., 2017
Extrato total metanólico <i>Ganoderma applanatum</i> em	Células CACO-2. Concentração de	Aumento de GSH. Aumento da relação BAX/BCL-2	ELKHATEEB et al., 2018

80, 160 e 200 µg / mL.	Camundongos <i>Swiss</i> transplantados com tumor de <i>Ehrlich</i> ).	em CACO-2. Diminuição da massa tumoral de tumor de <i>Ehrlich</i> Via apoptótica dependente de p53 Aumento de p53 e <i>up-regulation</i> de Caspase-3.	
Extrato etanólico <i>Auricularia auricula-judae</i> (AA), <i>Pleurotus abalonus</i> (PA) e <i>Pleurotus sajor-caju</i> (PS) PA (0,5 mg / mL) e AA (0,25-0,5 mg / mL).	Células de leucemia U937.	Não identificado	PANTHONG et al., 2016
Extrato metanólico dos corpos frutíferos o de <i>F. moniliforme</i> em 2,4,8,10 e 15µg/mL	Células Vero, MG-63, HBL-100, SW 1573, WiDr, HeLa e U937	Diminuição da viabilidade celular. Estimulação de óxido nítrico Produção de citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α. Promoveu a parada do ciclo celular. Induziu a apoptose.	LAGUNES-CASTRO et al., 2015
Extrato aquoso, ciclohexano, diclorometano e metanólico do fungo <i>F. fomentarius</i> (L.) 200, 100, 50, 25 e 12,5 g / ml	Células Hela.	Não identificado.	KOLUNDŽIĆ et al., 2016
Extrato metanólico de <i>Morchella esculenta</i>	Linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão humano.	Citotoxicidades independentes do status da p53.	LEE et al., 2018
<i>Extrato aquoso do</i> Micélio de <i>Pleurotus sp.</i> em 100 e 200 µg / mL	Células de leucemia humana NB4. Avaliação por citometria de fluxo da viabilidade celular, ciclo celular e apoptose	Aumento da Apoptose; Extrato levou a interrupção do ciclo celular na fase G2/M.	MORRIS, 2014
Triterpenos e sesquiterpenos extraídos do corpo de frutificação de <i>R. lepida</i> em 50 µM	Linhagens celulares de câncer humano, Huh-7 (hepatoma) e EJ-1 (bexiga)	Não identificado.	LEE et al., 2016
<i>Phellinus</i> Triterpenoides e ergosteróis isolados de corpos frutíferos de <i>P. Rhabarbarinus</i> em 0,0625, 0,32,93 1,6, 8 e 40 µM	Linhagens celulares de câncer humano SK-BR-3, MMC-7721, HL-60, PANC-1, A-549	Danos oxidativos.	FENG et al., 2016
Micélio e isolado Ácido triterpeno de <i>Ganoderma lingzhi</i> .	Cultura de SMMC-7721 e SW620 Sarcoma 180	Não identificado.	WANG et al., 2016
Astraodorol, um triterpeno extraído <i>Astraeus odoratus</i> em 50 mL/mL.	Carcinoma epidermoide humano (KB), câncer de pulmão de pequenas células humano (NCIH187), e célula de câncer de mama humana (MCF-7)..	Não identificado.	NASOMJAI, et al., 2013
Polissacarídeos de <i>Grifola frondosa</i> .	Cultura de células de hepatocarcinoma humano SMMC-7721 e células HepG2.	Parada do ciclo celular na fase G2 / M. Induziu apoptose e autofagia em células SMMC-7721 e HepG2. Aumento das proteínas BAX e caspase-3, e diminuição de Bcl-2 e ativação de marcadores de proteína poli- (ADP-ribose) - polimerase] e autofagia (aumento da expressão 1 e proteína 1A / 1B	ZHAO et al., 2017.

		associada a microtubulos de cadeia leve-3).	
Mannogalactoglucano <i>Agaricus bisporus</i> .	Ensaio de liberação de MTT e lactato desidrogenase (50, 100, 200, 400, 600 and 800 µg mL <sup>-1</sup> ).	Aumento da liberação de citocromo c e diminuição do teor de ATP.	PIRES et al., 2017.
Manogalactoglucano <i>Lentinus edodes</i> em 100 mg / kg de peso corporal dos polissacarídeos durante 10 dias).	Sarcoma 180 (S-180) em ratos.	Aumento na produção de óxido de nitrito (NO) em macrófagos peritoneais Aumento da fagocitose de macrófagos. Aumento da proliferação de linfócitos no baço.	JEFF et al., 2016
Polissacarídeo GP11 <i>Grifola frondosa</i> em 216, 108, 54 e 27 mg / kg.	Células HepG-2 Células tumorais HEPS.	Aumento do timo e do baço; Aumento dos níveis séricos de fator de necrose tumoral e interleucina-2. Produção de óxido nítrico (NO), TNF-α e interleucina-1β e a expressão proteica da iNOS.	MAO et al., 2015
Polissacarídeos miceliais de <i>P. ostreatus</i> 2 (POMP2) nas seguintes doses: 50, 100 e 200 mg / kg.	Células de câncer gástrico (BGC-823); Ensaio de migração celular e formação de colônias BALB / c (nu / nu) foram utilizados para proliferar um xenoinxerto BGC-823. Foi administrado POMP2 por via oral.	Não identificado.	CAO et al., 2015
Nanopartículas de prata sintetizadas por <i>Schizophyllum commune</i> em 10 e 100 µg/ml.	Carcinoma Epidermoide Humano da Laringe (HEP -2).	Não identificado.	ARUN; EYINI GUNASEKARAN, 2014
β- D- glucanos <i>Agaricus bisporus</i> e <i>Lactarius rufus</i> em 200 µg mL <sup>-1</sup>	Cultura de células HepG2.	Aumento da liberação de Citocromo C. Diminuição do teor de ATP Apoptose.	PIRES et al., 2013
Polissacarídeo (PEPw) dos corpos frutíferos <i>Pleurotus eryngii</i> em 50, 100 e 200 mg / kg	Animais com tumor Renca.	Aumentou significativamente os índices relativos de timo e baço. Promoveu a proliferação de linfócitos no baço induzida por ConA ou LPS. Elevou as atividades de células NK e CTL no baço. Aumentou a concentração sérica de TNF-α e IL-2 em ratos com tumor de Renca.	YANG et al., 2013
Duas frações polissacarídicas (PSAN e PSAA) <i>Sarcodon aspratus</i>	Cultura de células Hela.	Não identificado.	CHEN et al., 2013
Sulfatado de (1,3) -β-D- glucano (GS) produzido <i>Ganoderma lucidum</i> em 60 µg/mL.	Células da próstata humana (PN2TA) e células humanas de linfoma histiocítico caucasianos (U937).	Não identificado.	WAN-MOHTAR et al., 2016

#### 3.4.4 Atividades oxidativas e genotóxicas de compostos químicos isolados de espécies do filo Basidiomycota

Compostos químicos obtidos de espécies do filo Basidiomycota podem induzir genotoxicidade devido aos sesquiterpenos (AMORIM et al., 2013). Os isolados de basidiomicetos,  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas reagem rapidamente com cisteína para formar aductos no material genético estáveis; ao passo que as lactonas,  $\alpha$ -insaturadas- $\gamma$ , endocíclicas reagem lentamente com cisteína para formar aductos instáveis (KUPCHAN; EAKIN; THOMAS, 1971).

A 3-hydroxihipidina é luciferina fúngica considerada como produto da oxidação da hispidina. Quando misturada com uma fração de luciferase de *N. nambi* e *N. gardineri*, o novo composto produz luz de forma dose-dependente, independente de NADPH. (TSARKOVA et al., 2016).

O mecanismo de bioluminescência foi explicado pela hidrólise catalisada pela enzima oxiluciferina que produz ácido cafeico, reciclado na biossíntese de hispidina através da via de estilipirona (KASKOVA et al., 2017). Cabe enfatizar que esse processo ocorre sob condições de estresse oxidativo (BONDAR et al., 2013; MOGIL'NAYA; RONZHIN; BONDAR, 2018), devido à produção de peróxido de hidrogênio (PURTOV et al., 2015), com defesas antioxidantes observadas pela ação das enzimas peroxidases e catalases (MOGIL'NAYA et al., 2015).

#### 3.4.5 Compostos químicos isolados de espécies do filo Basidiomycota e seus mecanismos antitumorais em estudos não clínicos

O extrato etanólico obtido da espécie *Phellinus igniarius*, em MTT e DAPI, apresentou atividades antitumorais em linhagens humanas de HepG-2, AGS, SGC-7901, HeLa e A-549, por mecanismos associados ao bloqueio do ciclo células de SGC-7901 em  $G_0 / G_1$ ; colapso no potencial de membrana, indução de apoptoses por caspase-9, -3 e clivagem de PARP. Entretanto, tanto *in vitro* como *in vivo* (camundongos) induziu apoptose pelo aumento da expressão dos genes Bax / Bcl-2 em SGC-7901 (WANG et al., 2018). Em linhagens de adenocarcinoma do pulmão humano A549, H1264, H1299 e Calu-6, o extrato metanólico de *M. esculenta* também teve ação antitumoral por induzir citotoxicidade e apoptoses atribuídas aos compostos ergosterol e do ácido octadenoico (LEE et al., 2018). Extratos de *P. igniarius* nas concentrações de 40, 80, 160, 320 e 640  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram atividades tumorais em

células HepG-2, AGS, SGC-7901, Hela e A549 por meio do teste de MTT, atribuídas ao aumento relação BAX/BCL2 (WANG et al., 2018).

Atividades antitumorais de compostos obtidos de *Phellinus igniarius* foram evidenciadas em células tumorais humanas de HepG-2, AGS, SGC-7901, Hela e A-549 por mecanismos associados a bloqueio do ciclo celular de SGC-7901 em G0/G1 e colapso notável do potencial de membrana mitocondrial em células SGC-7901, além de induzir a apoptose dependente de mitocôndrias por desencadear a ativação de caspase-9, -3 e clivagem de PARP (WANG et al., 2018). Na espécie *Cerrena unicolor*, as subfrações de baixo peso molecular III exibiram a atividade inibitória em relação às células de carcinoma de mama MDA-MB-231, células de carcinoma prostático PC3 e células de câncer de mama MCF7 (MATUSZEWSKA et al., 2018) ensaio MTT para determinar a atividade inibidora do crescimento celular *in vitro* contra as linhas celulares de câncer humano (MCF7, MDA-MB-231 e PC3).

Os extratos são misturas complexas de compostos químicos. Diversos estudos evidenciaram que os extratos obtidos de espécies do filo Basidiomycota apresenta atividades antitumorais por mecanismos associados à parada do ciclo celular, colapso em potencial de membrana, ativação de caspases, clivagem de PARP e expressão de Bax e Bcl2 (WANG et al., 2018), indução de necrose (CHEN et al., 2015), apoptoses (LEE et al., 2015; LEE et al., 2018), expressão de p21, p27, p300, p73, fosforilação de Rb e E2F1 (LEE et al., 2015), indução de peroxidação lipídica (REIS et al., 2013), atenuação da expressão das proteínas NFK $\beta$  e  $\beta$  caderinas e quinases (PARK, 2015). Cabe também enfatizar que proteínas obtidas de espécies do filo Basidiomycota apresentaram efeitos antitumorais por indução de apoptoses, parada do ciclo celular (WANG et al., 2015), por regulação negativa de ciclinas B e E, regulação positiva de p53 e PARP (ZHANG et al., 2014(a); WANG et al., 2017; YUAN et al., 2017), expressão de BAX/BCI2 (LI et al., 2018).

Os polissacarídeos apresentam atividades antitumorais por indução de apoptoses (CAO et al., 2015; MEI et al., 2015, LI et al., 2016; LI et al., 2018), expressão de caspases 7 e de BAX/BCI2 (LI et al., 2018), indução dos fatores IFN-4, COX-2 (WANG et al., 2015), TGF $\beta$  e indução de ERO's (PENG et al., 2015), aumento de proteínas quinases e de AMPc (ZHANG et al., 2014 (a)), e aumento de TNF- $\alpha$  e IL2 (YANG et al., 2013). Algumas espécies de fungos do filo Basidiomycota apresentam também atividade antitumoral (MIZUNO et al., 1990; RODRIGUES et al., 2003; POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006; FAN et al., 2006; ZHANG et al, 2010; MEI et al, 2015), como exemplo a espécie *Russula lepida*, na qual foi

isolada uma lectina com atividade antiproliferativa contra células de hepatoma (Hep G2) e células MCF-7 de câncer de mama humano (ZHANG et al., 2010).

De maneira análoga, um polissacarídeo obtido do micélio de *Phellinus linteus* indicou atividade antitumoral contra células de Sarcoma 180 (S-180) através da indução de apoptose (MEI et al., 2015). Diversos polissacarídeos obtidos de Lentinan extraídos dos corpos de frutificação de *L. edodes* apresentaram atividades antitumorais em células MCF-71000 por autofagia tumoral (LI et al., 2018). O ergosterol isolado da fração lipídica de *A. blazei*, apresentou atividade de regressão tumoral em Sarcoma em camundongos, de forma relacionada à inibição direta da angiogênese, resultando na morte de células tumorais (TAKAKU et al., 2001). Na **Tabela 5** estão apresentados os compostos químicos bioativos de espécies do filo Basidiomycota e seus mecanismos antitumorais.

**Tabela 5.** Extratos e constituintes químicos isolados de espécies do filo Basidiomycota e alguns mecanismos antitumorais, em modelos não clínicos

Extratos/Constituintes químicos	Modelo de estudo	Mecanismo de ação	Referências
Extrato etanólico de <i>P. igniarius</i> .	MTT e DAPI em células de câncer gástrico SGC-7901  Modelo de xenoinxerto	Parada do ciclo celular em G <sub>0</sub> / G <sub>1</sub> Colapso do potencial de membrana mitocondrial. Apoptose por ativação de caspase-9, -3 e clivagem de PARP. Expressão de Bax / Bcl-2.	WANG et al., 2018
Extratos aquoso de <i>Ganoderma tsugae</i> .	Cultura de células C-6, Hep 3B, HL-60	Redução da viabilidade das células cancerígenas; Indução de necrose, apoptose ou diferenciação.	CHIEN et al., 2015
Extrato metanólico de <i>M. esculenta</i> .	Adenocarcinoma do pulmão humano A549, H1264, H1299 e Calu-6	Citotoxicidade do ergosterol e do ácido octadecanoico e indução de apoptose	LEE et al., 2018
Extratos aquosos e etanólicos brutos de <i>Boletus edulis</i> .	MTT em células cancerígenas MCF-7 de mama humana.	Não identificado.	NOVAKOVIC et al., 2017
Extrato fenólico <i>Leccinum vulpinum</i> .	Adenocarcinoma da mama (MCF-7)	Diminuiu a proliferação celular e induziu a apoptose. Aumento de danos ao DNA celular	REIS et al., 2016
Extrato etanólico de <i>I. obliquus</i> em 2,5 - 10 µg/mL.	Células de câncer de cólon humano HT-29	Síntese de DNA Maior porcentagem de células na fase G <sub>1</sub> , Diminuíram a expressão proteica de CDK2, CDK4 e ciclina D1. Aumentaram a expressão de p21, p27, e p53 e inibiram a fosforilação da expressão de Rb e E2F1.	LEE et al., 2015
Extrato acetato de etila de <i>P. linteus</i> .	Culturas de células pulmonar	Indução de apoptose. Atenuou a expressão das proteínas NF-κB	PARK, 2015

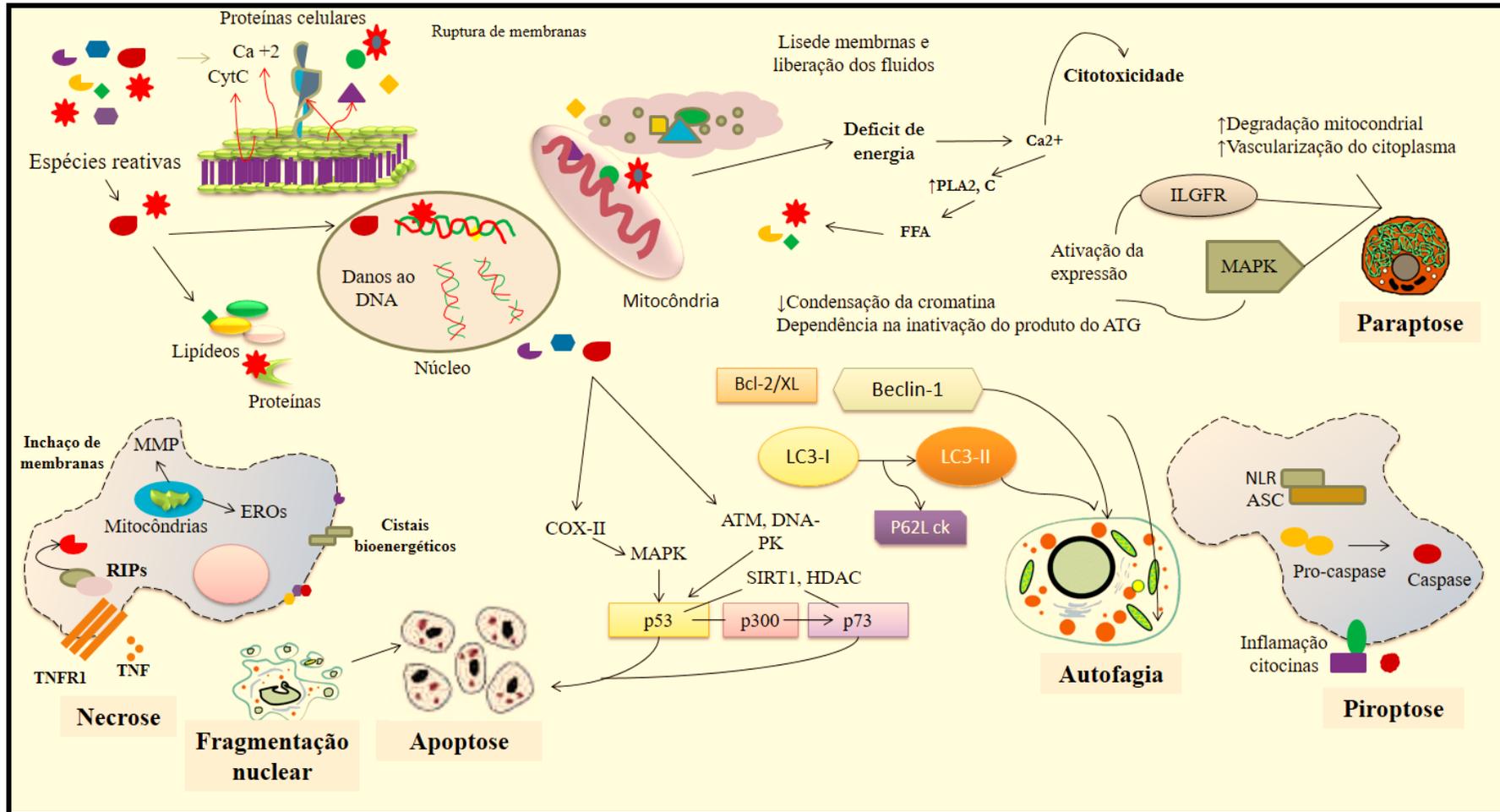
		, $\beta$ -catenina e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).	
Extrato metanólico de <i>C. militaris</i> .	Carcinoma humano MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão não pequenas células), HCT-15 (côlon) e HeLa (cervical): DPPH, TBARS. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica.	Reduziu a peroxidação lipídica.	REIS et al., 2013
Metabólitos secundários da <i>Cerrena unicolor</i> em 300, 150, 15, 1,5 e 0,15 $\mu\text{g} / \text{mL}$ .	MTT em câncer humano (MCF7, MDA-MB-231 e PC3).	Não identificado.	MATUSZEWSKA et al., 2018
Antrocina de <i>Antrodia camphorate</i> em 10mg / kg durante um período por 4 semanas.	Ensaio SBR (sulforrodamina B) nas células H1975 e H441.	Indução de morte celular por apoptose Aumento da ativação da caspase-3/7. Inibição da expressão da proteína Bcl-2 dos genes antiapoptóticos; Aumento da expressão de Bax e p53 promotores de apoptose. Inibição da via de sinalização JAK / STAT3.	YEH et al., 2013
Proteína de <i>Pleurotus eryngii</i> em 12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}$ mL e 200 mg de PEP por kg de peso corporal em dias alternados.	Células cancerígenas do cólon HCT116 e MC38.  Xenoinxerto de células de câncer de cólon em camundongos.	Supressão da proliferação de células HCT116 e MC38 de câncer de cólon humano e murino de uma forma dose-dependente. Parada do ciclo celular e extensa apoptose Regulação negativa de ciclina B, ciclina E e cdc-2, e a regulação positiva de p53 e c-PARP.	YUAN et al., 2017
Proteína de <i>P. nameko</i> .	Cultura de células MCF7 e HeLa.	Alterações morfológicas apoptóticas, como condensação da cromatina, acúmulo na fase G1 e alteração da permeabilidade mitocondrial $\rightarrow$ apoptose $\rightarrow$ perda de potencial de membrana mitocondrial resultou na liberação de citocromo C, ativação de caspase-9 e caspase-3.	ZHANG et al., 2014 (b)
Polissacarídeo de <i>Trametes versicolor</i> em 400g/mL.	Células HeLa.	Indução da apoptose e proliferação celular.	WANG et al., 2017
Polissacarídeo obtido da <i>Lentinula edodes</i> por 3 semanas com 5, 10 ou 20mg / kg.	Xenoinxerto em camundongos com injeção de células MCF-7.	Indução de apoptose; Aumento da expressão de caspase 7. Aumento da relação BAX/BCL2.	LI et al., 2018
$\beta$ -glucano extraído de <i>A. cinnamomea</i> em 10 e 30 mg/kg via oral da oitava a décima sexta semana.	Hiperplasia benigna de próstata (BPH) em ratos SD.	Alívio da hiperplasia epitelial prostática e a deposição de colágeno. Aumento da biossíntese e a conversão de colesterol total em HDL diminuição de LDL e ROS. Regulação positiva de IL -1, COX-2 e CD68. Regulação negativa de N-caderina e a vimentina.	PENG et al., 2015
Polissacarídeos obtidos de <i>Phellinus igniarius</i> em 10, 30, 50, 70 e 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e incubadas por 24 h.	MTT em células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HGC (carcinoma gástrico)	Não identificado.	LI et al., 2015

	e SW480 (cancer de colon)		
Polissacarídeos miceliais de <i>P. ostreatus</i> em 50, 100 e 200 mg / kg.	Células de câncer gástrico (BGC-823); Ensaio de migração celular e formação de colônias IBALB / c (nu / nu) foram utilizados para proliferar um xenoinxerto BGC-823.	Apoptose.	CAO et al., 2015
Polissacarídeos PLPS-1 e PLPS-2 do micélios <i>Phellinus linteus</i> .	In vitro = culturas de células de sarcoma 180.	Efeito antiproliferativo. Apoptose.	MEI et al., 2015
Polissacarídios de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	Cultura de células de tumor de Erlich (ET) r Sarcoma 180.	Não identificado.	FACCHINI et al., 2014
PSG-1 extraído de <i>Ganoderma atrum</i> em 100 e 200 mg / kg.	Células CT26 Murinas no Tumor de CT26. CT26.	Induziu apoptose em células. Aumentou os níveis de AMP cíclico intracelular (cAMP) e a atividade da proteína quinase A (PKA). PSG-1 aumenta a resposta imune antitumoral. Aumentou a fagocitose de macrófagos e a proliferação de linfócitos no baço. Aumentou concentrações séricas de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-2.	ZHANG et al., 2014(a)
Polissacarídeo (PEPw) dos corpos frutíferos <i>Pleurotus eryngii</i> em 50, 100 e 200 mg / kg.	Animais com tumor Renca.	Proliferação de linfócitos no baço induzida por ConA ou LPS. Elevou as atividades de células NK e CTL no baço e aumentou a concentração sérica de TNF- $\alpha$ e IL-2 em ratos com tumor de Renca.	YANG et al., 2013
Corpos de frutificação <i>Phellinus igniarius</i> em 40, 80, 160, 320 e 640 $\mu$ g/mL e nas doses 200, 400, 800 mg / kg.	Células HepG-2, AGS, SGC-7901, Hela e A549 por meio do teste de MTT.	Formação de corpos apoptóticos. Bloqueio do ciclo celular. Ativação de caspase 9, 3 e clivagem de PARP. Aumento da relação BAX/BCL2.	WANG et al., 2018
Peróxido de ergosterol do <i>Ganoderma lucidum</i> nas concentrações 11, 23, 35, 46 e 58 $\mu$ M.	Carcinoma hepatocelular humano HepG2, JHH-1 e SNU-449.	Induziu morte celular. Inibiu a migração celular, a progressão do ciclo celular. Aumentou a expressão Foxo3 e proteína em HepG2. pAKT e c-Myc diminuídas. Puma e Bax aumentadas.	LI et al., 2016

Alguns dos mecanismos antitumorais envolvidos com os compostos bioativos isolados ou extraídos do filo Basidiomycota estão apresentados na **Figura 5**.



**Figura 5.** Propostas de mecanismos antitumorais do filo Basidiomycota que podem ser considerados como fontes de bioativos para agentes antitumorais.



## 4 CONCLUSÃO

Extratos e compostos químicos isolados de espécies do filo Basidiomycota são fontes de metabólitos secundários, proteínas, polissacarídeos, terpenos que podem ser considerados como bioprodutos naturais para opções de novos fármacos para terapia do câncer. Não foram encontrados estudos que identifiquem os metabólitos ativos de *N. gardneri*, nem estudos que caracterizem as capacidades antitumorais, genotóxicas, mutagênicas e/ou antioxidantes da espécie. Assim, novas pesquisas devem ser desenvolvidas. Entretanto, diversos mecanismos antitumorais são comuns para os compostos bioativos do filo Basidiomycota, tais como envolvimento em apoptoses (via caspases, via estresse oxidativo), alterações de ciclo celular, aumento de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, inibição de supressores de tumores (p53 e AKt) e de fatores imunológicos, transcricionais, antimetastático e antiangiogênico, bem como indução de citotoxicidade, genotoxicidade, estresse mitocondrial e mutagenicidade.

## REFERÊNCIAS

- AIRTH, R.L; FOERSTER, G.E. Some aspects of fungal bioluminescence. **Journal of cellular and comparative physiology**, v. 56, p.173-182,1960.
- AMORIM, M. H. R.; GIL DA COSTA, R. M.; LOPES, C.; BASTOS, M. M. Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. **Critical reviews in toxicology**, v.43, n.7, p.559-579, 2013.
- AN, Q.; HAN, M.L.; WU, X.J.; SI, J.; CUI, B.K.; DAI, Y.C. Laccase production among medicinal mushrooms from the Genus *Flammulina* (Agaricomycetes) under different treatments in submerged fermentation. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, p.1049-1059, 2016.
- ARUN, G.; EYINI, M.; GUNASEKARAN, P. Green synthesis of silver nanoparticles using the mushroom fungus *Schizophyllum commune* and its biomedical applications. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.19, p. 1083–1090, 2014.
- BARROS, L. Total phenols, ascorbic acid, -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v.103, p.413-419, 2007.
- BARROS, L.; FALCÃO, S.; BAPTISTA, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I,C,F,R. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chemistry**,v.111, p.61-66, 2008 (a).

- BARROS, L.; VENTURINI, B.A.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L.M.; FERREIRA, I.C. Chemical Composition and Biological Properties of Portuguese Wild Mushrooms: A comprehensive study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.3856-3862, 2008(b).
- BAYIR, Y.; ODABASOGLU, C.A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, v. 13, p.584–590, 2006.
- BEEVI, S. S.; NARASU, M. L.; GOWDA, B. B. Polyphenolics profile, antioxidant and radical scavenging activity of leaves and stem of *Raphanus sativus* L. *Plant foods for human nutrition*, v.65, p. 8-17, 2010.
- BERNARDSHAW, S.; JOHNSON, E.; HETLAND, G. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill administered orally protects against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.62, p.393-398, 2005.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, p. 426–438, 2011.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 23, p.26-78, 2006.
- BONDAR, V. S.; RODICHEVA, E. K.; MEDVEDEVA, S. E.; TYULKOVA, N. A.; TYAGLIK, A. B.; SHPAK, B. A.; GITELSON, J. I. On the mechanism of luminescence of the fungus *Neonothopanus nambi*. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 449, n. 1, p.80-83, 2013.
- BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; KAEN, K.; HIRANSALEE, A.; KANOKMEDHAKUL, S. Effect of bioactive compound from luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi* Speg.) on Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood) and Non-Target organism. **KKU Research Journal**, v.16, p.331-334, 2011.
- BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; KANOKMEDHAKUL, S.; HIRANSALEE, A.; LEKPHROM, R. Extraction of bioactive compounds from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi* and its effect on Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*). **KKU Research Journal**, v.15, p.726-37, 2010.
- BURAKORN, J.; NGUEYN, T. B.; PRAPHRUET, R. Biological activities of a Thai luminescent mushroom. **Walailak Journal of Science and Technology**, v.12, p.505-514, 2015.
- BUSWELL, J.A.; CHANG, S.T. Edible Mushrooms: attributes and applications. In: *Genetics and Breeding of Edible Mushroom*. **Gordon and Breach Science Publishers Publisher**, v.1, p. 297–306, 1993.
- BÜYÜKAVCU, A.; ALBAYRAK, Y.E.; GÖKER, N. A fuzzy information-based approach for breast cancer risk factors assessment. **Applied Soft Computing**, v. 38, p. 437-452, 2016.

CAO, X. Y.; LIU, J. L.; YANG, W.; HOU, X.; LI, Q. J. Antitumor activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus ostreatus* mycelia against gastric cancer in vitro and in vivo. **Molecular medicine reports**, v.12, n.2, p.2383-2389, 2015.

CAPELARI, M.; DESJARDIN, D.E.; PERRY, B.A.; ASAI, T.; STEVANI, C.V. *Neonothopanus gardneri*: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. **Mycologia**. v.103, p.1433–40. 2011.

CARVALHO, C.D.; ALVES, N.C.; MONTEIRO, A.C.; PELÓGIA, N.C.C. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Agaricus blazei* Murill in rats submitted to the modified formalin test. **Revista Dor**, v.12, p.35-38, 2011.

CFR FERREIRA, I. A.; VAZ, J.; VASCONCELOS, M.H.; MARTINS, A. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v.10, p.424-436, 2010.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WAGSTAFF, C. Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. **International journal of molecular sciences**, v.14, p.12780-12805, 2013.

CHANG, S. T.; WASSER, S. P. The Role of Culinary-Medicinal Mushrooms on Human Welfare with a Pyramid Model for Human Health. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, p. 95–134, 2012.

CHANG, S.T.; BUSWEL, J.A. Mushrooms nutraceuticals. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, p.473-476, 1996.

CHEN, M.; ZHOU, B.; ZHONG, P.; RAJAMANICKAM, V.; DAI, X.; KARVANNAN, K.; ZHOU, H.; ZHANG, X.; LIANG, G. Increased Intracellular Reactive Oxygen Species Mediates the Anti-Cancer Effects of WZ35 via Activating Mitochondrial Apoptosis Pathway in Prostate Cancer Cells. **The Prostate**, v.77, p.489-504, 2017 (a).

CHEN, Y.; HU, M.; WANG, C.; YANG, Y.; CHEN, J.; DING, J.; GUO, W. Characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from the mycelium of *Sarcodon aspratus*. **International journal of biological macromolecules**, v.52, p.52-58, 2013.

CHEN, Y.; LI, X.H.; ZHOU L.Y.; LIU,L.; WANG, D.; ZANG, W.; HUSSAIN, S.; TIAN, X.; LU, Y.M. Structural elucidation of three antioxidative polysaccharides from *Tricholoma lobayense*. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p.484-492, 2017(b).

CHEN, Y.L.; CHUEH, F.S.; YANG, J.S.; HSUEH, S.C.; LU, C.C.; CHIANG, J.H.; LEE, C.S. Antitumor effects with apoptotic death in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and suppression of leukemia xenograft tumor growth by irinotecan HCl. **Environmental Toxicology**, v. 30, n.7, p. 803-815, 2015.

CHENG, H.; ZHANG, J.; REN, J.; WANG, W.; XIONG, W.; ZHANG, Y.; BAO, L.; LIU, H. Triterpenes and Meroterpenes with Neuroprotective Effects from *Ganoderma leucocontextum*. **Chemistry & Biodiversity**, v.15, p. 1-10, 2018.

CHIEN, R.C., TSAI, S.Y., LAI, E.I. AND MAU, J.L. Antiproliferative activities of hot water extracts from culinary-medicinal mushrooms, *Ganoderma tsugae* and *Agrocybe cylindracea* (higher basidiomycetes) on cancer cells. **International journal of medicinal mushrooms**, 17(5), 2015.

CHOU, Y.J., KAN, W.C.; CHANG, C.M.; PENG, Y.J.; WANG, H.Y.; YU, W.C.; CHENG, Y.H.; CHENG, Y.H.; JHANG, Y.R.; LIU, H.W.; CHUU, J.J. Renal Protective Effects of Low Molecular Weight of Inonotus obliquus Polysaccharide (LIOP) on HFD/STZ-Induced Nephropathy in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 7, p1-17, 2016.

CHOWDHURY, M.M.H.; KUBRA, K.; AHMED, S.R. Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v.14, p.8-15, 2015.

COMER E. J. H. **The Agaric Genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus*, with Particular Reference to Malaysian Species**. 1981.

COSTA FORTES, R.; LACORTE RECÔVA, V.; LIMA MELO, A.; CARVALHO GARBI NOVAES, M.R. Life quality of postsurgical patients with colorectal cancer after supplemented diet with *Agaricus sylvaticus* fungus. **Nutricion hospitalaria**, v. 25, p.1-10, 2010.

DEY, I.; SHAH, K.; BRADBURY, N.A. Natural Compounds as Therapeutic Agents in the Treatment Cystic Fibrosis. **Journal of genetic syndromes & gene therapy**, v. 7, p. 284-288, 2016.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Induction of resistance in cucumber plants against *Colletotrichum lagenarium* by applying extracts of basidiocarps from *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**.v. 30, p.243-250, 2004.

DORE, C.M.P.G.; ALVES, M.G.D.C.F.; SANTOS, M.D.G.L.; DE SOUZA, L.A.R.; BASEIA, I.G.; LEITE, E.L. Antioxidant and anti-inflammatory properties of an extract rich in polysaccharides of the mushroom *Polyporus dermatopus*. **Antioxidants**, v.3, p.730-744, 2014.

DULAY, R.M.R.; et al. Antioxidant and antibacterial activities of acetonitrile and hexane extracts of *Lentinus tigrinus* and *Pleurotus djamour*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**,v.9, p.141-144, 2017.

DURU, M.E.; ÇAYAN, G.T. Biologically active terpenoids from mushroom origin: a review. **Records of Natural Products**, v. 9, p.456–483, 2015.

ELKHATEEB, W. A.; ZAGHLOL, G.M.; EL-GARAWANI, I. M.; AHMED, E. F.; RATEB, M.E.; MONEIM, A. E. A. *Ganoderma applanatum* secondary metabolites induced apoptosis through different pathways: In vivo and in vitro anticancer studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.101, p.264-277, 2018.

FACCHINI, J. M.; ALVES, E. P.; AGUILERA, C.; GERN, R. M.; SILVEIRA, M. L.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide

fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma180, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.68, p.72-77, 2014.

FAN, L.; PAN, H.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Advances in mushroom research in the last decade. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 303-311, 2006.

FENG, T.; CAI, J. L.; LI, X. M.; ZHOU, Z. Y.; LI, Z. H.; LIU, J. K. Chemical constituents and their bioactivities of mushroom *Phellinus rhabarbarinus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 9, p. 1945-1949, 2016.

FERREIRA, I.C.; BARROS, L.; ABREU, R. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p.1543-1560, 2009.

FERREIRA, I.C.F.R.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Freeradical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v.100, p.1511-1516, 2007.

FINIMUNDY, T.C.; ABREU, R.M.V.; BONETTO, N.; SCARIOT, F.J.; DILLON, A.J.P.; ECHEVERRIGARAY, S.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R.; HENRIQUES, J.A.P.; ROESCH-ELY, M. Apoptosis induction by *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer extracts on colorectal cancer cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v.112, p. 383-392, 2018.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v.5, p.3–15, 2008.

FORTES, R.C., TAVEIRA, V.C. AND NOVAES, M.R.C.G. The immunomodulator role of  $\beta$ -D-glucans as co-adjutant for cancer therapy. **Rev Bras Nutr Clin**, 21(2), pp.163-8, 2006.

GAN, L.; ZHANG, S.H.; YANG, X.L.; XU, H.B. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide–protein complex from *Lycium barbarum*. **International Immunopharmacology**, v.4, p.563-569, 2004.

GHAHREMANI-MAJD, H; DASHTI, F. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Horticulture, Environment and Biotechnology**, v. 56, p.376-382, 2015.

GHANTOUS, A., GALI-MUHTASIB, H., VUORELA, H., SALIBA, N.A. AND DARWICHE, N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?. **Drug discovery today**, v. 15, p.668-678, 2010.

GIMENES, L. J. Fungos basidiomicetos: Técnicas de coleta, isolamentos e subsídios para processos biotecnológicos. Curso de capacitação de Monitores e Educadores. **Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente**. Instituto de Botânica-IBt, 2010.

GIMENES, L. J. **Biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares**. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2011.

GREESHMA, P.; RAVIKUMAR, K.S.; NEETHU, M.N.; PANDEY, M.; ZUHARA, K.F.; JANARDHANAN, K.K.. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of cultured mycelia and fruiting bodies of the elm oyster mushroom, *Hypsizygus ulmarius* (Agaricomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v.18, p. 1-10, 2016.

GREGORY, F. J. et al. Studies on antitumor substances produced by Basidiomycetes. **Mycologia**, v. 58, n. 1, p. 80-90, 1966.

HAKIME-SILVA, R.A.; VELLOSA, J.C.; KHALIL, N.M.; KHALIL, O.A.; BRUNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M. Chemical, enzymatic and cellular antioxidant activity studies of *Agaricus blazei* Murrill. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v.85, p.1073-1082, 2013.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; LUMBSCHE, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAI, Y.C. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509–547, 2007.

IMITIAJ, A; LEE, T. S. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. **World Journal of Agricultural Sciences**. v.3, n.3, p. 316-321, 2007.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Disponível em <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>>. Acesso em: 4 Jan. 2019.

INTARAUDOM, C.; BOONYUEN, N.; SUPOTHINA, S.; TOBWOR, P.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; PITTAYAKHAJONWUT, P. Novel spiro-sesquiterpene from the mushroom *Anthracoephyllum* sp. BCC18695. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p.345-349, 2013.

ISHIKAWA, N.K.; CATARINA, M.; KASUYA, M.; VANETTI, M.C.D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **British Microbiology Research Journal**, v. 32, p. 206–210, 2001.

IWALOKUN, B.A., USEN, U.A., OTUNBA, A.A. AND OLUKOYA, D.K. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1-15, 2007.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P.A.. SHEU, J.R.; GERALDINE, P. In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Food research international**, v.44, p.851-861, 2011.

JEFF, I. B.; FAN, E.; TIAN, M.; SONG, C.; YAN, J.; ZHOU, Y. In vivo anticancer and immunomodulating activities of mannogalactoglucan-type polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berkeley) Singer. **Central-European journal of immunology**, v.41, n.1, p.47, 2016.

KAHLKE, T.; UMBERS, K.D. Bioluminescence. **Current biology**, v.1, p. 1-10, 2016.

KANOKMEDHAKUL, S.; LEKPHROM, R.; KANOKMEDHAKUL, K.; HAHNVAJANAWONG, C.; BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; PRABPAI, S.; KONGSAERE, P. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. **Tetrahedron**. v. 68, p.8261- 8266. 2012.

KASKOVA, Z. M.; DÖRR, F.A.; PETUSHKOV, V. N.; PURTOV, K. V.; TSARKOVA, A. S.; RODIONOVA, N. S.; MINEEV, K. S.; GUGLYA, E. B.; KOTLOBAY, A.; BALEEVA, N. S.; BARANOV, M. S. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. **Science advances**, v. 3, n. 4, p.1602847, 2017.

KATYA, K.; YUN, Y.H.; YUN, H.; LEE, J.Y.; BAI, S.C. Effects of dietary fermented by-product of mushroom, *Pleurotus ostreatus*, as an additive on growth, serological characteristics and nonspecific immune responses in juvenile Amur catfish, *Silurus asotus*. **Aquaculture research**, v.47, p.1622-1630, 2016.

KHALILI, M.; EBRAHIMZADEH, M.A.; KOSARYAN, M. In Vivo Iron-Chelating Activity and Phenolic Profiles of the Angel's Wings Mushroom, *Pleurotus porrigens* (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushroom**, v.17, p. 847-56, 2015.

KIRK, P. M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**, 10th ed. CABI, Wallingford, UK., 2008.

KOBAYASHI, N.; HIRAMATSU, A.; AKATSUKA, T. Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes*. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 51, p. 883-890, 1987.

KOLUNDŽIĆ, M.; GROZDANIĆ, N.D.; DODEVSKA, M.; MARINAMILENKOVIĆ, M.; SISTO, F.; MIANI, A.; FARRONATO, G.; KUNDAKOVIĆ, T. Antibacterial and cytotoxic activities of wild mushroom *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Polyporaceae*. **Industrial Crops and products**, v.19, p.110-115, 2016.

KUNJADIA, P.D. Medicinal and antimicrobial role of the oyster culinary-medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (higher Basidiomycetes) cultivated on banana agrowastes in India. **International Journal of Medicinal Mushrooms**,v.16, p. 227-238, 2014.

KUPCHAN, S. MORRIS; EAKIN, M. A.; THOMAS, A. M. Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relations among the sesquiterpene lactones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 12, p. 1147-1152, 1971.

LAGUNES-CASTRO, M.L.S.; TRIGOS, Á.; LÓPEZ-MONTEON, A.; MENDOZA, G.; RAMOS-LIGONIO, A. Cytotoxic activity and induction of inflammatory mediators of the methanol: chloroform extract of *Fusarium moniliforme*. **Revista iberoamericana de micología**, v. 32, n. 4, p.235-241, 2015.

LEE K. F., CHEN J. H., TENG C. C., et al. Protective effects of *Hericium erinaceus* mycelium and its isolated erinacine A against ischemia-injury-induced neuronal cell death via the inhibition of iNOS/p38 MAPK and nitrotyrosine. **International Journal of Molecular Sciences**. 2014;15(9):15073–15089. doi: 10.3390/ijms150915073

LEE, H. S.; KIM, E. J.; KIM, S. H. Ethanol extract of *Innotus obliquus* (Chaga mushroom) induces G1 cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. **Nutrition research and practice**, v.9, n.2, p.111-116, 2015

LEE, J. S.; DELFLY, W. M.; ABDJUL, B.; YAMAZAKI, H.; TAKAHASHI, O.; KIRIKOSHI, R.; KANNO, S.; NAMIKOSHI, M. Structures and biological activities of triterpenes and sesquiterpenes obtained from *Russula lepida*. **Phytochemistry**. v.127, p.63-88, 2016.

LEE, S.R.; ROH, H.S.; LEE, S.; PARK, H.B.; JANG, T.S.; KO, Y.J.; BAEK, K.H.; HYUNKIMA, K. Bioactivity-guided isolation and chemical characterization of antiproliferative constituents from morel mushroom (*Morchella esculenta*) in human lung adenocarcinoma cells. **Journal of Functional Foods**, v.40, p.249-260, 2018.

LEE, Y.L.; et al. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Exp Anim.**, v.52, p. 371–375, 2003.

LEVIN, R.M.; XIA, L.; WEI, W.; SCHULER, C.; LEGGETT, R.E.; LIN, A.D. Effects of *Ganoderma Lucidum* shell-broken spore on oxidative stress of the rabbit urinary bladder using an in vivo model of ischemia/reperfusion. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 435, p.25-35, 2017.

LI, S. C.; YANG, X. M.; MA, H. L.; YAN, J. K; GUO, D. Z. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides extracted from *Phellinus igniarius* mycelia. **Carbohydrate polymers**, v.133, p.24-30, 2015.

LI, W.; WANG, J.; HU, H.; LI, Q.; LIU, Y.; WANG, K. Functional polysaccharide Lentinan suppresses human breast cancer growth via inducing autophagy and caspase-7-mediated apoptosis. **Journal of Functional Foods**, v.45, p.75-85, 2018.

LI, X.; WU, Q.; BU, M.; HU, L.; DU, W. W.; JIAO, C.; PAN, H.; SDIRI, M.; WU, N.; XIE, N.; YANG, B. B. Ergosterol peroxide activates Foxo3-mediated cell death signaling by inhibiting AKT and c-Myc in human hepatocellular carcinoma cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 33948- 33959., 2016.

LI, X.; WANG, L.; WANG, Z. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Hohenbuehelia serotina*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.98, p.59-66, 2017.

LIMA, A.T.; SANTOS, M.N.; DE SOUZA, L.A.; PINHEIRO, T.S.; PAIVA, A.A.; DORE, C.M.; COSTA, M.S.S.P.; SANTOS, N.D.; BASEIA, Y.G.; ARAÚJO, R.M.; LEITE, E.L. Chemical characteristics of a heteropolysaccharide from *Tylopilus ballouii* mushroom and its antioxidant and anti-inflammatory activities. **Carbohydrate polymers**, v. 44, pp.400-409, 2016.

LIN, Z.; LIN, Z. Juncao technology: fungi cultivation with juncao. **Fujian Agricultural University Jun-Cao Research Center: Fuzhou**. p.130, 1997.

LIU, C., ZHAO, C., PAN, H.H., KANG, J., YU, X.T., WANG, H.Q., LI, B.M., XIE, Y.Z. AND CHEN, R.Y. Chemical constituents from *Inonotus obliquus* and their biological activities. **Journal of natural products**, 77(1), pp.35-41, 2013 (a).

LIU, Y.; SUN, J.; RAO, S.; SU, Y.; LI, J.; LI, C.; XU, S.; YANG, Y. Antidiabetic activity of mycelia selenium-polysaccharide from *Catathelasma ventricosum* in STZ-induced diabetic mice. **Food and chemical toxicology**, v.62, p.285-291, 2013 (b).

LIU, Y.; CLARKE, D.A.; LUCAS, E.H.; RINGLER, R.L.; STEVENS, J.A.; STOCK, C.C. Structural characterization and antidiabetic activity of a glucopyranose-rich heteropolysaccharide from *Catathelasma ventricosum*. **Carbohydrate Polymers**, v.149, p.399-407, 2016.

LUCAS, E. H.; BYERRUM, R.U.; CLARKE, D.A.; REILLY, H.C.; STEVENS, J.A.; STOCK, C.C. Production of oncostatic principles in vivo and in vitro by species of the genus *Calvatia*. **Antibiotics annual**, v. 6, p. 493-496, 1958.

LUCAS, E. H.; CLARKE, D.A.; LUCAS, E.H.; RINGLER, R.L.; STEVENS, J.A.; STOCK, C.C. Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other *Holobasidiomycetes*. **Antibiotics and Chemotherapy**, v. 7, p.1-10, 1957.

MAITY, P.; NANDI, A.K.; SEN, I.K.; PATTANAYAK, M.; CHATTOPADHYAY, S.; DASH, S.K. Heteroglycan of an edible mushroom *Entoloma lividoalbum*: structural characterization and study of its protective role for human lymphocytes. **Carbohydrate Polymers**, v.19, p.157-65, 2014.

MAO, G. H.; REN, Y.; FENG, W. W.; LI, Q.; WU, H. Y.; ZHAO, T.; XU, C. Q.; YANG, L.Q.; WU, X. Y. Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide from *Grifola frondosa*. **Carbohydrate polymers**, v.134, p.406-412, 2015.

MATUSZEWSKA, A.; JASZEK, M.; STEFANIUK, D.; CISZEWSKI, T.; MATUSZEWSKI, L. Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. **Plos one** v.13, p.1-14, 2018.

MATHERS, Colin D.; LONCAR, Dejan. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS medicine**, v. 3, n. 11, p. e442, 2006.

MEI, Y.; ZHU, H.; HU, Q.; LIU, Y.; ZHAO, S.; PENG, N. A novel polysaccharide from mycelia of cultured *Phellinus linteus* displays antitumor activity through apoptosis. **Carbohydrate Polymers**. v.124, p.90-97, 2015.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual review of biochemistry**, v.52, p.711-760, 1983.

MENG, X.; LIANG, H.; LUO, L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. **Carbohydrate research**, v.424, p.30-41, 2016.

MIHAILOVIĆ, M.; ARAMBAŠIĆ JOVANOVIĆ, J.; USKOKOVIĆ, A.; GRDOVIĆ, N.; DINIĆ, S.; VIDOVIĆ, S. et al. Protective effects of the mushroom *Lactarius deterrimus* extract on systemic oxidative stress and pancreatic islets in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of diabetes research**, v.2015, p 1-10, 2015.

MILOVANOVIĆ, I. Antioxidant, antifungal and anticancer activities of se-enriched pleurotus spp. mycelium extracts. **Archives of Biological Sciences**, v. 66, p.1379-1388, 2014.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990.

MIZUNO, T.; SAITO, H.; NISHITOBA, T.; KAWAGISHI, H. Antitumour-active substances from mushrooms. **Food Reviews International**, v.11, p.23-61,1995.

MOGIL'NAYA, O. A.; RONZHIN, N. O.; BONDAR, V. S. Extracellular Peroxidase Activity and Light Emission of the Mycelium of the Basidiomycete *Neonothopanus nambi* in the Presence of  $\beta$ -Glucosidase. **Biophysics**, v.63, p.93-99, 2018.

MOGIL'NAYA, O. A.; RONZHIN, N. O.; MEDVEDEVA, S.E.; BONDAR, V. S. Total Peroxidase and Catalase Activity of Luminous Basidiomycetes *Armillaria borealis* and *Neonothopanus nambi* in Comparison with the Level of Light Emission. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, p. 395-401, 2015.

MORADALI, M.F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G.A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International immunopharmacology**, v. 7, p.701-724, 2007.

MORRIS, H.J. In vitro anti-proliferative effects on NB4 human leukemia cells and physicochemical screening of *Pleurotus* sp. (higher Basidiomycetes) mycelia from Cuba. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.16, p. 239-245, 2014.

NA, Q.; XIANGYANG, S.; XINHUI, Q.; ZHOU, Y. Effects of Peat and Mushroom Residues on Removing Ammonia-Nitrogen and Total Phosphorus in Wastewater. **Nature Environ. Pollution Technol.**, v.15, p.1373-1380, 2016.

NASOMJAI, P.; ARPHA, K.; SODNGAM, S.; BRANDT, S. D. Potential antimalarial derivatives from astraodorol. **Archives of Pharmacal Research**, v.12, p. 1538-1545, 2014.

NEVES, L. **Taxonomia de criptógmas fungos: filo basidiomycota**. Belo Horizonte, 2013.

NGUYEN, T.K.; IM, K.H.; CHOI, J.; SHIN, P.G.; LEE, T.S. Evaluation of antioxidant, anti-cholinesterase, and anti-inflammatory effects of culinary mushroom *Pleurotus pulmonarius*. **Mycobiology**, v. 44, p.291-301, 2016.

NIEDERMEYER, T.H.; LINDEQUIST, U.; MENDEL, R.; GÖRDES, D.; SCHMIDT, E.; THUROW, K.; LACK, M. Antiviral Terpenoid Constituents of *Ganoderma pfeifferi*. **Journal of natural products**, v. 68, p.1728-1731, 2005.

NOVAES M.R.C.G. GARCEZ, L.C.; MELO, A.L.; RECÔVA, V.L. Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo. *Agaricus sylvaticus*. **Ciências Saúde**, v.18, p.227-236, 2007.

NOVAKOVIC, A. Antioxidant and antiproliferative potential of fruiting bodies of the wild-growing king bolete mushroom, *Boletus edulis* (Agaricomycetes), from Western Serbia. **International journal of medicinal mushrooms**, v.19, p. 1-9, 2017.

NOWACKA, N.; NOWAK, R.; DROZD, M.; OLECH, M.; LOS, R. Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, p.689-694, 2014.

OBA, Y.; SUZUKI, Y.; MARTINS, G.N.R.; CARVALHO R.P.; PEREIRA, T.A.; WALDENMAIER, H.E.; NAITO, M.; OLIVEIRA, A.G.; DÖRR, F.A.; PINTO, E.; YAMPOLSKY, I.V.; STEVANI, C.V. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.16,p.1435-1445, 2017.

OLIVEIRA, A. G.; CARVALHOII, R.P.; WALDENMAIERII, H.E.; STEVANI, C.V. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. **Química Nova**. v.36, p. 1-10, 2013.

OLIVEIRA, A.G. AND STEVANI, C.V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 8(10), pp.1416-1421, 2009.

OLIVEIRA, A.G.; STEVANI, C.V.; WALDENMAIER, H.E.; VIVIANI, V.; EMERSON, J.M.; LOROS, J.J. Circadian control sheds light on fungal bioluminescence. **Current Biology**, v. 25, p.964-968, 2015.

OYETAYO, V.O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p.380-386, 2009.

PANDA, B.C.; MAITY, P.; NANDI, A.K.; PATTANAYAK, M.; MANNA, D.K.; MONDAL, S. Heteroglycan of an edible mushroom *Pleurotus cystidiosus*: Structural characterization and study of biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.95, p.833-842, 2017.

PANTHONG S.; BOONSATHORN, N.; CHUCHAWANKUL, S. Antioxidant activity, anti-proliferative activity, and amino acid profiles of ethanolic extracts of edible mushrooms. **Genetics and Molecular Research**, v.15, 2016.

PARK, H. J. *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice Suppress metastasis and Induce Apoptosis of Colon Cancer Cells by suppressing NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathways. **Journal of Functional Foods**, v.14, p.289-298, 2015.

PAROLA, S.; CHIODAROLI, L.; ORLANDI, V.; VANNIN, C.; PANNO, L. *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*: functional food with antioxidant - antimicrobial activity and an important source of Vitamin D and medicinal compounds. **Functional Foods in Health & Disease**. v.2, p. 773-794, 2017.

PENG, C. C.; LIN, Y. T.; CHEN, K. C.; CHYAU, C. C.; PENG, R. Y. Antrodan, A  $\beta$ -glucan obtained from *Antrodia cinnamomea* mycelia, is beneficial to benign prostate hyperplasia. **Food & function**, v.6, n.2, p.635-645, 2015.

PERRIN, P. W.; TOWERS, G. H. N., Hispidin biosynthesis in cultures of *Polyporus hispidus*, **Phytochemistry**, v.12, p.589–592, 1973.

PETERSEN, R.H.; KRISAI-GREILHUBER, I. Type specimen studies in *Pleurotus*. **Persoonia**, v. 17, p.201-219, 1999.

PIRES, A. D. R. A.; RUTHES, A. C.; CADENA, S. M. S. C.; ACCO, A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Cytotoxic effect of *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*  $\beta$ -D-glucans on HepG2 cells. **International journal of biological macromolecules**, v.58, p.95-103, 2013.

PIRES, A.D.R.A.; RUTHES, A.C.; CADENA, S.M.S.C.; IACOMINI, M. Cytotoxic effect of a mannogalactoglucan extracted from *Agaricus bisporus* on HepG2 cells. **Carbohydrate polymers**, v.170, p.33-42, 2017.

PLESZCZYŃSKA, M.; WIATER, A.; SIWULSKI, M.; LEMIESZEK, M.K.; KUNASZEWSKA, J.; KACZOR, J. Cultivation and utility of *Piptoporus betulinus* fruiting bodies as a source of anticancer agents. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p.1-9, 2016.

POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. **Cryptogamie, Mycologie**. v. 27, n. 4, p. 311-333, 2006.

PURTOV, K. V.; PETUNIN, A. I.; RODICHEVA, E. K.; BONDAR, V. S.; GITELSON, J. I. Components of the luminescent system of the luminous fungus *Neonothopanus nambi*. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v.461, n.1, p. 65-68, 2015.

PUTTARAJU, N.G.; VENKATESHAIHAH, S.U.; DHARMESH, S.M.; SHASHIREKHA MYSORE NANJARAJ URS, S.M.N.; SOMASUNDARAM, R. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 9764-9772, 2006.

QIN, Y.; XIONG, L.; LI, M.; LIU, J.; WU, H.; QIU, H. Preparation of Bioactive Polysaccharide Nanoparticles with Enhanced Radical Scavenging Activity and Antimicrobial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, p. 4373-4383, 2018.

REIS, F. S.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; ĆIRIĆ, A.; VAN GRIENSVEN, L. J.; SOKOVIĆ, M.; FERREIRA, I. C. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. **Food and chemical toxicology**, v.62, p.91-98, 2013.

REIS, F. S.; SOUSA, D.; BARROS, L.; MARTINS, A.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C.; VASCONCELOS, M. H. *Leccinum vulpinum* Watling induces DNA damage, decreases cell proliferation and induces apoptosis on the human MCF-7 breast cancer cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v.90, p.45-54, 2016.

RIBEIRO, B.; RANGEL, J.; VALENTÃO, P.; BAPTISTA, P.; SEABRA, R.M.; ANDRADE, P.B. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried portuguese wild edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.8530-8537, 2006.

RODRIGUES, S. B.; JABOR, I. A. S.; MARQUES-SILVA, G. G.; DE ROCHA, C. L. Detection of antimutagenic potential of sun mushroom (*Agaricus blazei*) in mehtG1 system in *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v.25, n.2, p.513-517, 2003.

RUBEL, R. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica**. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, UFPR, Curitiba, 2006.

SAMADI, A.K.; BILSLAND, A.; GEORGAKILAS, A.G.; AMEDEI, A.; AMIN, A.; BISHAYEE, A. A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. In **Seminars in cancer biology**, v. 35, p. 151-184, 2015.

SHARMA, S.K.; GAUTAM, N. Chemical composition and antioxidant and antibacterial activities of cultured mycelia of four clavicipitaceous mushrooms (Ascomycetes) from the Indian Himalayas. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 19, p.1-10, 2017.

SHIRMILA, J.G.; RADHAMANY, P.M. Identification and determination of antioxidant constituents of bioluminescent mushroom. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p.386-391. 2012.

SILVEIRA, M.L.; SMIDERLE, F.R.; MORAES, C.P.; BORATO, D.G.; BAGGIO, C.H.; RUTHES, A.C.; WISBECK, E. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear  $\beta$ -D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**, v.113, p. 588-596, 2014.

SMETANINA, O.F. Indole alkaloids produced by a marine fungus isolate of *Penicillium janthinellum* Biourge. **Journal of Natural Products**, v. 70, p.906-909, 2007.

SMIDERLE, F.R.; BAGGIO, C.B.; BORATO, D.G.; SANTANA-FILHO, A.P.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M. Anti-Inflammatory Properties of the Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris* Might Be Related to Its Linear (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glucan. **PLoS ONE**, v.9, p.1-11, 2014.

SONG, H.Y.; CHOI, H.-J.; JEONG, H.; CHOI, D.; KIM, D.-H.; KIM, J.-M. Viral Effects of a dsRNA Mycovirus (PoV-ASI2792) on the Vegetative Growth of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Mycobiology**, v.44, p. 283–290, 2016.

SOUILEM, F.; FERNANDES, Â.; CALHELHA, R.C.; BARREIRA, J.C.; BARROS, L.; SKHIRI, F. Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. **Food Chemistry**, v. 230, p.40-48, 2017.

STEENKAMP, E.T; WRIGTH, J.; BALDAUF, S.L. The prokaryotic origins of animals and fungi. **Molecular Biology and Evolution**, v.23, p.93-106, 2006.

- STOJKOVIĆ, D.S.; KOVAČEVIĆ-GRUJIČIĆ, N.; REIS, F.S.; DAVIDOVIĆ, S.; BARROS, L.; POPOVIĆ, J. Chemical composition of the mushroom *Meripilus giganteus* Karst. and bioactive properties of its methanolic extract. **LWT-Food Science and Technology**, v. 79, p.454-462, 2017.
- TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murill and Its Mechanism of Action. **Journal of Nutrition**. v.131, n. 5, p.1409-1413, 2001.
- TANG, C.; HOO, P.C.X.; TAN, L.T.H.; PUSPARAJAH, P.; KHAN, T.M.; LEE, L.H. Golden needle mushroom: a culinary medicine with evidenced-based biological activities and health promoting properties. **Frontiers in pharmacology**, v.7, p.474- 478, 2016.
- TAOFIQ, O.; HELENO, S.A.; CALHELHA, R.C.; ALVES, M.J.; BARROS, L. The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. **Food and Chemical Toxicology**, v.108, p.139-147, 2017.
- TEL, Gulsen et al. Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 6, p. 824-830, 2015.
- TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p.1682-1686, 2009.
- TSARKOVA, A. S.; DUBINNYI, M. A.; BARANOV, M. S.; OGUIENKO, A. D.; YAMPOLSKY, I. V. Nambiscalarane, a novel sesterterpenoid comprising a furan ring, and other secondary metabolites from bioluminescent fungus *Neonothopanus nambi*. **Mendeleev Communications**, v.26, n.3, 191-192, 2016.
- TURKOGLU, A.; DURU, M.E.; MERCAN, N.; KIVRAK, I.; GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, v.101, p.267-273, 2007.
- VAIDYA, A.M.; CHETLEN, A.L.; SCHETTER, S.E. Does a High-Risk Recommendation in Mammography Reports Increase Attendance at a Breast Cancer Risk Assessment Clinic?. **Journal of the American College of Radiology**, v. 12, p. 923-929, 2015.
- VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; RANGEL, J.; RIBEIRO, B.; SILVA, B.M.; BAPTISTA, P.; SEABRA, R.M. Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4925-4931, 2005.
- VAMANU, E.; PELINESCU, D.; AVRAM, I. Antioxidative Effects of Phenolic Compounds of Mushroom Mycelia in Simulated Regions of the Human Colon, In Vitro Study. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.68, p.83-90, 2018.
- VAZ, J.A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; BUELGA, S.C.; VASCONCELOS, M.H.; FERREIRA, I.C.F.R. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. **Food Chemistry**, v. 126, p. 610–616, 2011.

VENTURA, F.F.; SILVA, R.T.; STEVANI, C.V. História do Fungo Bioluminescente Flor-de-Coco (*Neonothopanus gardneri*) e Efeitos das Condições de Cultura Sobre a Emissão de Luz. **Revista Virtual de Química**, v. 7, p. 41-55, 2015.

WAHAB, N.A.A.; ABDULLAH, N.; AMINUDIN, N. Characterisation of potential antidiabetic-related proteins from *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél.(grey oyster mushroom) by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

WANG, D.; LI, Q.; QU, Y., WANG, M.; LI, L.; LIU, Y.; LI, Y. The investigation of immunomodulatory activities of *Gloeostereum incaratum* polysaccharides in cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. **Experimental and therapeutic medicine**, v.15, p.3633-3638, 2018 (a).

WANG, D.; SAKODA A.; SUZUKI, M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Technology**, v.78, p.293-300, 2001.

WANG, F.F.; SHI, C.; YANG, Y.; FANG, Y.; SHENG, L.; LI, N. Medicinal mushroom *Phellinus igniarius* induced cell apoptosis in gastric cancer SGC-7901 through a mitochondria-dependent pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.102, p.18-25, 2018 (b).

WANG, K.F; SUI, K. Y.; CHENGUO, C.; CHUN-ZHAOLIU, C. Z. Quorum sensing molecule-farnesol increased the production and biological activities of extracellular polysaccharide from *Trametes versicolor*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.104, p.377-383, 2017.

WANG, S.; BAO, L.; ZHAO, F.; WANG, Q.; LI, S.; REN, J.; LI, L.; WEN, H.; GUO, L. LIU, H. Isolation, identification, and bioactivity of monoterpenoids and sesquiterpenoids from the mycelia of edible mushroom *Pleurotus cornucopiae*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.61, n.21, p.5122-5129, 2013.

WANG, W. J.; WU, Y. S.; CHEN, S.; LIU, C. F.; CHEN, S. N. Mushroom  $\beta$ -glucan may immunomodulate the tumor-associated macrophages in the Lewis lung carcinoma. **Biomed research international**, 2015.

WANG, X. L.; DING, Z. Y.; LIU, G. Q.; HAILONG YANG, H.; ZHOU, G. Y. Improved production and antitumor properties of triterpene acids from submerged culture of *Ganoderma lingzhi*. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1395, 2016.

WAN-MOHTAR, W. A.; IMAD, W. A. A. Q.; YOUNG, L.; ABBOTT, G. M.; CLEMENTS, C.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Antimicrobial Properties and Cytotoxicity of Sulfated (1,3)- $\beta$ -D-Glucan from the Mycelium of the Mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 999-1010, 2016.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 13-32, 2002.

XU, X.; SHEN, M.; QUAN, L.. Stimulatory agents simultaneously improving the production and antioxidant activity of polyphenols from *Inonotus obliquus* by submerged fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.176, p.1237-1250, 2015(b).

XU, X.; QUAN, L.; SHEN, M. Effect of chemicals on production, composition and antioxidant activity of polysaccharides of *Inonotus obliquus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77,p143-50, 2015 (a).

YANG, Z.; XU, J.; FU, Q.; FU, X.; SHU, T.; BI, Y.; SONG, B. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. **Carbohydrate polymers**, v. 95, n. 2, p.615-620, 2013.

YEH, C.T.; HUANG, W. C.; RAO, Y. K.; YE, M.; LEE, W.H.; WANG, L. S.; TZENG, D. T.; WU, C.H.; SHIEH, Y.S.; HUANG, C.Y.F.; CHEN, Y. J. A sesquiterpene lactone antrocin from *Antrodia camphorata* negatively modulates JAK2/STAT3 signaling via microRNA let-7c and induces apoptosis in lung cancer cells. **Carcinogenesis**, v.34, n.12, p.2918-2928, 2013.

YEH, M.Y., KO, W.C. AND LIN, L.Y., 2014. Hypolipidemic and antioxidant activity of enoki mushrooms (*Flammulina velutipes*). **BioMed research international**, 2014.

YUAN, B.; MA, N.; ZHAO, L.; ZHAO, E.; GAO, Z.; WANG, W.; SONG, M.; ZHANG, G., HU, Q. AND XIAO, H.. In vitro and in vivo inhibitory effects of a *Pleurotus eryngii* protein on colon cancer cells. **Food & function**, p. 8, n.10, p.3553-3562, 2017.

ZHANG, G.; SUN, J.; WANG, H.; NG, T.B. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. **Phytomedicine**, v.17, p.775-781, 2010.

ZHANG, J.; SUN, L.; ZAPATA, P.A.; ARIAS, M.; ATEHORTUAC, L.; WEBSTER, T.J. Anti-Inflammatory Bone Protective Effects of Nano-Protein Extracts from Mushroom Species: *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.17, p.5884-5889, 2017.

ZHANG, S.; NIE S.; HUANG, D.; HUANG, J.; FENG, Y.; XIE, M. A polysaccharide from *Ganoderma atrum* inhibits tumor growth by induction of apoptosis and activation of immune response in CT26-bearing mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 38, p. 9296-9304, 2014 (a).

ZHANG, Y.; LIU, Z.; NG, T. B.; CHEN, Z.; QIAO, W.; LIU, F. Purification and characterization of a novel antitumor protein with antioxidant and deoxyribonuclease activity from edible mushroom *Pholiota nameko*. **Biochimie**, v.99, p.28-37, 2014 (b).

ZHANG, Hui et al. Effects of noble metal nanoparticles on the hydroxyl radical scavenging ability of dietary antioxidants. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 36, n. 2, p. 84-97, 2018.

ZHAO, C.; ZHAO, K.; LIU, X.; HUANG, Y.F.; LIU, B.. In vitro antioxidant and antitumor activities of polysaccharides extracted from the mycelia of liquid-cultured *Flammulina velutipes*. **Food Science and Technology Research**, v.19, p.661-667, 2013.

ZHAO, F.; ZHAO, J.; SONG, L.; ZHANG, Y.Q.; GUO, Z.; YANG, K.H. The induction of apoptosis and autophagy in human hepatoma SMMC-7721 cells by combined treatment with vitamin C and polysaccharides extracted from *Grifola frondosa*. **Apoptosis**, v. 22, n. 11, p.1461-1472, 2017.

ZHENG, Y.; WANG, W.D.; LI, Y. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Trametes orientalis*. **Carbohydrate polymers**, v.131, p.248-254, 2015.

# *CAPÍTULO II*

---

**Efeitos oxidantes/antioxidantes em *S. cerevisiae* e antitumorais em células de Sarcoma  
180 de extratos do *Neonothopanus gardneri***

**Efeitos oxidantes/antioxidantes em *S. cerevisiae* e antitumorais em células de Sarcoma 180 de extratos do *Neonothopanus gardneri***

Débora Cássia Vieira Gomes, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, José Victor de Oliveira Santos, Antonielly Campinho dos Reis, Rosália Maria Torres de Lima, José Roberto Ferreira, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, José Arimatéia Dantas Lopes, Antonia Maria das Graças Lopes Citó, Keylla da Conceição Machado, Maria das Dores Alves de Oliveira, Neicyano Souza Machado, Benedito Borges da Silva, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Joaquim Soares da Costa Júnior, João Marcelo de Castro e Sousa, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

**RESUMO**

O câncer é um problema de saúde pública ocupando a segunda causa de morte no mundo. Os Basidiomycotas são fontes ilimitadas para produção de novos fármacos, especialmente antitumorais. São raros os relatos sobre os bioativos e propriedades biológicas do *Neonothopanus gardneri*. O estudo teve por objetivo avaliar a ação antitumoral e oxidante/antioxidante de extratos metanólicos e acetato de etila do *N. gardneri* em células de Sarcoma 180 e em *Saccharomyces cerevisiae*, com aplicação de marcadores citogenéticos, com isolamento e identificação dos metabólitos por técnicas espectroscópicas e espectropométrica. Os fungos foram coletados e os extratos preparados e testados em 500, 1000, 1500 e 2000 µg/mL. Células de Sarcoma 180 foram tratadas com os extratos e avaliadas quanto à citotoxicidade no teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese; e quanto aos possíveis mecanismos citogenéticos indicativos de danos ao DNA, apoptoses e necrose com o Ensaio Cometa. No extrato metanólico foi identificado a presença de alcaloides, açúcares redutores, proteínas, catequinas, taninos e depsídeos; enquanto na fração acetato de etila, apenas alcaloides e açúcares redutores. Foram isoladas duas amidas inéditas 7,8-Di-hidroxi-13-oxo-heneicosina-9,11-dienamida e 7,8-Di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida isolados dos extratos metanólico de *N. gardneri*. Todas as concentrações testadas foram citotóxicas em células tumorais de Sarcoma 180 na coloração Tripán, como também pelos índices de divisão nuclear sem e com apoptoses e necroses. Os extratos causam danos ao DNA, com similaridade, nas maiores concentrações, à doxorubicina (2 µg/mL), possivelmente por danos oxidativos, como o peróxido de hidrogênio (10 mM). Mecanismos citogenéticos envolvidos na formação de micronúcleos, brotos, pontes, bem como apoptose e necrose foram induzidos pelos extratos. Nas maiores concentrações, os extratos apresentaram danos oxidativos em *S. cerevisiae*; mas, nas duas menores, foram antioxidantes frente aos danos do peróxido de hidrogênio. Os dados apontam que os extratos de *N. gardneri* podem ser considerados como fonte de produtos naturais antitumorais, associados a mecanismos citogenéticos; e que as amidas isoladas podem ser consideradas como promissores agentes antitumorais.

**Palavras-Chave:** *Neonothopanus gardneri*. Mecanismos citogenéticos. Apoptose. Necrose

**Oxidative / antioxidant effects on *S. cerevisiae* and antitumor on Sarcoma 180 cells from *Neonothopanus gardneri* extracts**

**ABSTRACT**

Cancer is a public health problem occupying the second leading cause of death. Sarcomas comprise less than 10% of all types of cancer; but are considered mortality rates. Basidiomycotas are unlimited sources for the production of new drugs, especially antitumor drugs. There are few reports on the bioactive and biological properties of *Neonothopanus gardneri*. The aim of the study was to evaluate the antitumor and oxidant / antioxidant action of methanolic extracts and ethyl acetate of *N. gardneri* on Sarcoma 180 and *Saccharomyces cerevisiae* cells, with the application of cytogenetic markers, with identification of phytochemicals and major magnetic resonance and electrospray ionization mass spectra. The fungi were collected and the extracts prepared and tested at 500, 1000, 1500 and 2000 µg / ml. Sarcoma 180 cells were treated with the extracts and evaluated for cytotoxicity in the MTT and micronucleus tests with cytokinesis blockade. And regarding the possible cytogenetic mechanisms indicative of DNA damage, apoptosis and necrosis with the comet assay and micronucleus test with block of cytokinesis. In the methanolic extract was identified the presence of alkaloids, reducing sugars, proteins, catechins, tannins and depsidones; while in the ethyl acetate fraction only alkaloids and reducing sugars. Two novel amides 7,8-Dihydroxy-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamide and 7,8-Dihydroxy-13-oxo-octadeca-9,11-dienamide isolated from the methanolic and ethyl acetate. All concentrations tested were cytotoxic in tumor cells from sarcoma 180 in Tripán staining, as well as by nuclear division indices with and without apoptosis and necrosis. Extracts cause damage to the DNA, with similarity, at higher concentrations, to doxorubicin (2 µg/mL), possibly due to oxidative damages, such as hydrogen peroxide (10 mM). Cytogenetic mechanisms involved in the formation of micronuclei, shoots, bridges as well as apoptosis and necrosis were induced by the extracts. In the highest concentrations, the extracts presented oxidative damages in *S. cerevisiae*; but in the two smaller ones, they were antioxidants against the damage of hydrogen peroxide. The data indicate that extracts of *N. gardneri* can be considered as source of natural antitumor products, associated with cytogenetic mechanisms; and that the isolated amides may be considered as promising antitumor agents.

**Key words:** *Neonothopanus gardneri*. Cytogenetic mechanisms. Apoptosis. Necrosis.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública que tem alta mortalidade, sem diferenças entre os países (ARAN et al., 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016; BÜYÜKAVCU; ALBAYRAK; GÖKER, 2016; SALEH et al., 2017). Os dados da *American Cancer Society* para sarcoma de partes moles, nos Estados Unidos, para 2016, foram de 12.310 novos casos (6.980 em homens e 5.330 em mulheres) (STILLER et al., 2013; ARIFI et al., 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). No Brasil, em 2017, foi de 6,67 casos por milhão para a faixa de 0 a 14 anos; e de 7,54 casos por milhão para a faixa de 0 a 19 anos (INCA, 2017). Os sarcomas são tumores malignos heterogêneos de origem mesenquimal, caracterizados por mais de 100 subtipos distintos (BRENNAN; ANTONESCU; MAKI, 2013; D'ANGELO et al., 2014; KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016), com prevalência de localização em 5% dos casos em cabeça e pescoço; 4,7% na região do tórax; 14,7% no abdome; 3,3% nas costas; 15% nos membros superiores; 36,5% nos membros inferiores; 6,4% na pélvis e no períneo (PASSOS et al., 2018).

Cabe relatar que os mecanismos citogenéticos são subjacentes à sarcomagênese (JAIN; KAPOOR, 2010; TAYLOR et al., 2011), como demonstrado por cariótipos de maioria diploides simples, com poucos rearranjos cromossômicos, e mutações oriundas da instabilidade genética (HELMAN; MELTZER, 2003). A cirurgia (STEEN; STEPHENSON, 2008) e a radioterapia (CAHLON et al., 2012; BEANE et al., 2014) são as principais estratégias de terapias. Entretanto, a quimioterapia sistêmica com doxorubicina e ifosfamida vem sendo aplicada (GU et al., 2007), mas ainda produz severos efeitos colaterais, como os induzidos pela doxorubicina (KATSUTA et al., 2017).

Assim, novas abordagens são necessárias para a doença metastática (SHENG; MOVVA, 2016). Os produtos naturais têm sido fontes promissoras para agentes terapêuticos (DEY; SHAH; BRADBURY, 2016). Os fungos são fontes de bioativos com atividades biológicas para a produção de medicamentos, como a penicilina (BLUNT et al., 2006; SMETANINA et al., 2007; SAMUEL; PRINCE; PRABAKARAN, 2017). Os Basidiomycotas são fontes de bioativos (DURU; ÇAYAN, 2015), com atividades imunoestimulante (KATYA et al., 2014), anti-inflamatórias (DORE et al., 2014; NGUYEN et al., 2016), antiviral (SONG et al., 2016), hipoglicemiante (ABDEL-WAHAB et al., 2014), antioxidante (YAP et al., 2014), hipocolesterolêmicos (YU et al., 2016) e antitumorais (WASSER, 2002; MORADALI et al., 2007; BARROS et al., 2007; YAP et al., 2014).

O *Neonothopanus gardneri* é um *Basidiomycota* (*Omphalotus*) encontrado na Mata dos Cocais brasileira, nos estados do Maranhão, Tocantins, Goiás e Piauí (Floresta Amazônica e a Caatinga) que cresce na base de palmeiras (*Attalea humilis*, *A. funifera*, e *Orbignya phalerata*) (CAPELARI et al., 2011) e apresenta propriedade bioluminescente (OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015), considerado como o fungo mais bioluminescente (OLIVEIRA; STEVANI, 2009; CAPELARI et al., 2011; VENTURA; SILVA; STEVANI, 2014).

Ainda são raras as publicações relatando atividades biológicas do *N. gardneri*. Dentre as publicações, estudos apontam sua importância nutricional (FAN et al., 2006), como também atividades frente a alguns micro-organismos (POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006; IMITIAJ; LEE, 2007) e vírus (FAN et al., 2006). Da mesma forma, ainda são bastante raros os estudos sobre seus compostos bioativos e suas potencialidades como agentes antitumorais.

A aplicação de biomarcadores citogenéticos assume importância para o entendimento da patologia, bem como para análises de mecanismos citogenéticos de novos fármacos para sua terapia e prognósticos do câncer. O Teste de Micronúcleos é considerado como biomarcador de efeitos aneugênicos e clastogênicos (MATSUZAKI et al., 2014; HWANG et al., 2017), que pode indicar danos do DNA e morte celular (ROHR et al., 2013; BOLOGNESI; HOLLAND, 2016; NERSESYAN et al., 2016). O Ensaio Cometa também é um método sensível para detectar danos no DNA (WEBER et al., 2013; AZQUETA et al., 2017; PAWLAS et al., 2017).

O uso de células tumorais, como as de Sarcoma 180 induzido em murinos, assume importância em estudos de novos produtos naturais de importância terapêutica (GHAZARYAN et al., 2015; PATRA et al., 2016). Considerando, também, que a iniciação e progressão do câncer são associadas ao estresse oxidativo (MILEO; MICADEI, 2016), o uso de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido amplamente utilizado para a avaliação do estresse oxidativo (RHEE et al., 2012; BHATTACHARYYA et al., 2014; VÁZQUEZ et al., 2017), devido à similaridade de processos celulares com o de outros eucariotos (CARMONA-GUTIERREZ et al., 2010; FARRUGIA; BALZAN, 2012; ALBERGARIA; ARNEBORG, 2016). O estudo teve por objetivo avaliar os efeitos antitumorais e oxidantes/antioxidantes dos extratos metanólico (EM) e acetato de etila (AE), obtidos do *N. gardneri*, em células de Sarcoma 180 (murinos) e em *S. cerevisiae*, respectivamente, com aplicação de biomarcadores citogenéticos. Como também caracterizar os extratos quanto à

fitoquímica e identificar compostos bioativos, por ressonância magnética nuclear (RMN), com possíveis ações antitumorais.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes químicos utilizados no estudo

O meio de cultura RPMI 1640, penicilina e estreptomicina foram obtidos da GIBCO® (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). A doxorubicina (Dox) foi obtida da Eurofarma Laboratórios S.A. (São Paulo, Brasil); enquanto que o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (São Paulo, Brasil). A Dox foi utilizada em uma única concentração (2 µg/mL, solubilizada em água destilada). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi preparado a uma concentração final de 10 mM/mL (diluído em água destilada).

### 2.2 Procedimentos experimentais gerais

Os dados de RMN foram obtidos em espectrômetro *Bruker Avance DRX-500* (500 MHz e 126 MHz para os RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR respectivamente) em CD<sub>3</sub>OD, sendo o solvente residual não deuterado usado como referência interna. O espectro de massas de ionização por *electrospray* (HRESIMS) foi obtido no modo positivo usando um *LTQ Orbitrap XL Hybrid* com Transformada de Fourier (*Thermo Scientific Instruments*) acoplado a um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) *Thermo Instruments* (*Detector Accela PDA*, amostrador automático *Accela* e bomba *Accela*, Instrumentos *Thermo Scientific*). As seguintes condições foram usadas: tensão capilar 4,5 kV, temperatura capilar 260°C, auxiliar taxa de fluxo de gás 10-20 unidades arbitrárias, taxa de fluxo de gás de arraste 40-50 unidades arbitrárias, tensão de pulverização 4,5 kV, intervalo de massa 100-1000 amu. Os solventes padrões analíticos para extração e fracionamento (PA) para extração e isolamento foram das marcas *Synth*, *Dinâmica*, *Merck*: metanol (MeOH), etila, n-hexano, acetonitrila (MeCN). Para a separação cromatográfica em coluna aberta foi utilizado a fase estacionária *Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich*

### 2.3 Material fúngico

O cogumelo *N. gardneri* Berk. ex Gardner foi coletado no povoado Mimoso (Latitude -6.2192648, Longitude -43.1474344, Elevação 146m), no município de São

Francisco-MA, Brasil. A coleta foi realizada no período de janeiro a maio de 2013, no horário entre 18 e 20 horas, sob autorização SISBIO número 54548-1. O material foi identificado pelo professor Dr. Cassius Vinícius Stevani, do Laboratório de Bioluminescência de Fungos, Instituto de Química, da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil).

## 2.4 Extração e Isolamento

Após a coleta dos cogumelos (1000 g), os corpos de frutificação do cogumelo foram congelados em freezer a cerca de -5 °C. Para início do processo de extração, os cogumelos foram lavados em água corrente e em água destilada; e, em seguida, triturados com auxílio de gral e pistilo. O extrato (Ext. AcOEt) foi extraído segundo a metodologia de Adrade et al. (2014). Os cogumelos *N. gardneri* foram triturados e extraídos com AcOEt até exaustão e concentrado em evaporador rotatório *Fisatom* R-801, sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo. Logo em seguida, o cogumelo foi submetido à extração com metanol (MeOH), seguindo os mesmos padrões do extrato acetato de etila (AcOEt). Uma porção do Ext.AcOEt (1.5212 g) foi fracionada em coluna de sílica de fase reversa C18 (40-63 µm; Merck) eluída em gradiente H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH, obtendo oito (8) subfrações Ng1-Ng8. A subfração AcOEt-Ng<sub>3</sub> (165 mg) foi submetida à análise em coluna semipreparativa com coluna C18 SunFire (250 mm x 10 mm, 5 µm), sistema de solvente ACN:H<sub>2</sub>O no modo gradiente linear (30-100% ACN em 35 min, detecção em 254 nm, e fluxo de 4,5 mL/min) permitindo o isolamento de duas novas substâncias **1** (6,1 mg) e **2** (4,1 mg).

## 2.5 Prospecção fitoquímica preliminar

Foram realizados testes para açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis, taninos, flavonoides, alcaloides, catequinas, antraquinonas, depsídeos e depsidonas segundo Dos Santos Galarreta et al. 2016 com modificações, como evidenciado na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Testes realizados para caracterização fitoquímica dos extratos de *N. gardneri*

TESTE	TÉCNICA	POSSÍVEIS RESULTADOS
Açúcares redutores	10 miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada e 2 mL do reativo de <i>Fehling A</i> e 2 mL do reativo de <i>Fehling B</i> . Uso do banho-maria em ebulição durante 5 minutos.	O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo indica presença de açúcares redutores.
Polissacarídeos	10 miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada. Filtração e adição de duas gotas de lugol.	O aparecimento de coloração azul, indica resultado positivo.
Fenóis e taninos	10 miligramas de extrato seco em 5 mL de água destilada, filtrou-se e adicionou-se 2 gotas de solução alcoólica de FeCl <sub>3</sub> a 1%.	Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativo de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + solução de FeCl <sub>3</sub> ). Coloração inicial entre o azul e o vermelho, é indicativo da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo. Precipitado escuro de tonalidade azul, indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis); e verde, presença de taninos catéquicos.
Flavonoides Geral	10 miligramas do extrato seco, em 10mL de metano, 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio.	O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.
Alcaloides	10 miligramas do extrato seco em 5 mL de solução de HCl a 5%. Em seguida, separou-se quatro porções de 1 mL em tubos de ensaio e adicionou-se gotas dos reativos de <i>Bouchardat</i> , de <i>Dragendorff</i> e de <i>Mayer</i> .	Resultado para Reativo de <i>Bouchardat</i> : precipitado laranja avermelhado Resultado para Reativo de <i>Dragendorff</i> : precipitado vermelho tijolo Resultado para Reativo de <i>Mayer</i> : precipitado branco
Catequinas	10 miligramas do extrato seco em 3 mL de metanol. Acrescentou-se 1 mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 mL de HCl concentrado.	O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.
Antraquinonas	10 miligramas do extrato seco em 5 mL de tolueno e 2 mL de solução de NH <sub>4</sub> OH a 10%, agitou-se suavemente.	O aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.
Depsídeos e depsídonas	10 miligramas do extrato seco em 5 mL de éter etílico. Evaporação de todo o éter em banho-maria, juntou-se ao resíduo 3mL de metanol e 3 gotas de solução de FeCl <sub>3</sub> a 1%.	O aparecimento de coloração verde, azul ou cinza, indica reação positiva.

## 2.6 Cultura primária de Sarcoma 180

As células de Sarcoma 180 foram mantidas na cavidade peritoneal de camundongos (UFPI, #167/16, ANEXO E). Após 10 dias da inoculação, o líquido ascítico, contendo células tumorais, foi removido por punção na cavidade abdominal de um animal. Em seguida, as

células de S180 foram contadas em câmara de Neubauer ( $4 \times 10^6$  células/mL) e incubadas em meio de cultura RPMI 1640 (1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina), mantidas em estufa a 37°C, por 72h, concomitantemente com as substâncias teste (500, 1000, 1500 e 2000 µg/mL) e controles positivo e negativo.

## **2.7 Viabilidade celular por azul de Tripán em cultura primária de S180**

A viabilidade celular foi analisada com a aplicação do teste de exclusão por azul de Tripán, de acordo com Strober (2015). Após 72 horas de tratamento com as substâncias teste e controles, 90 µL da suspensão de células ( $0,5 \times 10^6$  células/mL) foram retirados das culturas e acrescidos de 10 µL do azul de Tripán. As células não viáveis foram contadas por sua coloração azulada, sendo consideradas como células mortas. Em contraste, as células viáveis não apresentam esta coloração devido às suas capacidades de expulsarem o azul de Tripán. As diferenciações celulares foram observadas em microscopia óptica com o aumento de 400X, com o auxílio da câmara de Neubauer.

## **2.8 Ensaio Cometa - versão alcalina**

A versão alcalina do Ensaio Cometa foi realizada conforme descrito por Speit e Rothfuss (2012). Alíquotas de 10 µL de suspensão celular de S180 ( $0,5 \times 10^6$  células/mL) foram misturadas com uma fina camada de agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (90 µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal 1,5%. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10, com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso), por até 72 horas a 4°C. Após esse período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH>13) por 20 minutos; e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos em cuba de eletroforese. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M e pH 7,5) e coradas com solução de nitrato de prata. As lâminas foram analisadas quanto ao perfil fotomicrográfico das células (aumento de 400X em microscópio óptico) e os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD) de 100 células em duplicata. O ID foi calculado por meio da fórmula:  $ID = \sum$  (número de células em determinada classe de dano X classe de dano), que variou de 0 a 400. E FD pela seguinte fórmula:  $FD = 100 - n^\circ$  de células classe 0.

## 2.9 Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (CBMN)

O CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI 1640 (fitohemaglutinina A GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], 1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA] e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA]) foram adicionados 20 µL de suspensão celular de S180 ( $0,5 \times 10^6$  células/mL). Em cada frasco de cultura foram acrescentadas as soluções teste e controles. As células foram incubadas por 44h a  $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ . Após este período, foram adicionados às culturas 6 µg/mL de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando os frascos à incubação por mais 28h. Ao final de 72 h, as culturas foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* celular foi levemente agitado para nova centrifugação após a adição de 5 mL de fixador (metanol:ácido acético, 5:1) e 3 gotas de formaldeído aos tubos. O procedimento foi repetido por 2 vezes utilizando fixador 3:1 e sem o formaldeído. Por fim, o sobrenadante foi descartado e 2 a 4 gotas da suspensão celular foram gotejadas sobre lâminas, as quais foram coradas com solução de Giemsa 5% por 7 minutos. As lâminas, previamente codificadas, foram analisadas em teste cego, com auxílio de microscópio óptico (1000X), considerando os danos citogenéticos presentes em 1000 células por lâmina em duplicata.

## 2.10 Avaliação da capacidade oxidante/antioxidante em *Saccharomyces cerevisiae*

A **Tabela 2** contém os genótipos das linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no ensaio de atividade antioxidante, linhagem proficiente (SODWT) em superóxido dismutase citoplasmática, deficiente simples (Sod1Δ, Sod2Δ e Cat1Δ) e duplo deficiente (Sod1Δ/Sod2Δ e Sod1Δ/Cat1Δ). As referidas linhagens proficiente e deficientes em Superóxido Dismutase (Sod) e Catalase (Cat) foram cedidas pelo grupo de pesquisa em Genética Toxicológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para o ensaio, as linhagens de *S. cerevisiae* foram repicadas em meio YEPD sólido (1% extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona e 2% de ágar) e armazenadas em condições apropriadas de acordo com Oliveira e colaboradores (2014). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem de uma placa de Petri em um ciclo contínuo, para ambos os lados da placa contendo,

no centro, um disco de papel de filtro estéril, no qual adicionou-se 10 µL das concentrações das substâncias teste.

**Tabela 2.** Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usadas no estudo

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 (SOD WT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1Δ)	sod1::URA3 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2Δ)	sod2::TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	sod1::URA3 sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1Δ)	EG103, except cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, except sod1:: URA3 and cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles

As linhagens de *S. cerevisiae* (SODWT, Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1ΔSod2Δ, Cat1Δ, Sod1ΔCat1Δ) foram semeadas em placas de petri a partir do centro para a margem. No centro da placa foi inserido um disco de papel filtro estéril no qual, posteriormente, foram adicionados 10µL dos extratos metanólico e acetato de etila em duas diferentes condições de tratamento. Na avaliação oxidante, as concentrações das amostras testadas foram adicionadas em um disco de papel filtro no centro da placa de YEPD. No co-tratamento, foram adicionados, simultaneamente, as concentrações das amostras e do agente estressor peróxido de hidrogênio a 10mM, no disco de papel filtro. Após 48 horas de incubação em estufa a 30 °C, mediu-se o halo de inibição do crescimento celular em milímetros (mm). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O controle positivo utilizado foi apenas 20 µL de peróxido de hidrogênio a 30%.

## 2.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e comparados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós-teste de *Tukey* e de *Dunnnett's* (considerando valores de  $p < 0,05$  como significantes), por meio do programa *Graphpad prism* (software intuitivo para a Ciência, San Diego, CA). Todos os estudos foram realizados em duplicata, a partir de avaliações biológicas independentes.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análise fitoquímica do extrato metanólico (EM) e acetato de etila (AE) obtidos do *N. gardneri*

No EM foi possível identificar a presença de alcaloides, açúcares redutores, proteínas, catequinas, taninos e depsídeos. Entretanto, no extrato AE foi possível identificar apenas alcaloides e açúcares redutores (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Caracterização fitoquímica dos extratos metanólico e acetato de etila obtidos de *N. gardneri*

Químicos	EXTRATO METANÓLICO	EXTRATO ACETATO DE ETILA
Alcaloides	Presentes	Presentes
Açúcares redutores	Presentes	Presentes
Flavonoides	Ausentes	Ausentes
Proteínas/aminoácidos	Presentes	Ausentes
Polissacarídeos	Ausentes	Ausentes
Catequinas	Presentes	Ausentes
Fenóis	Ausentes	Ausentes
Taninos	Presentes	Ausentes
Depsídeos	Presentes	Ausentes

#### 3.2 Caracterização estrutural dos metabólitos secundários do extrato metanólico

Os dados obtidos por RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (600 MHz) das substâncias 1 e 2, inéditos, isolados do *N. gardneri*, estão apresentados na **Tabela 4**. A análise dos dados de HRESIMS indicou a presença de um íon  $m/z$  367,2097 [ $\text{M}^+$ ] e 369,2271 [ $\text{M}^+2\text{H}^+$ ], correspondente à fórmula  $[\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{NO}_4]$ . O espectro de IV mostrou estiramentos em  $3445\text{ cm}^{-1}$  correspondentes a grupos hidroxilas, em  $1708\text{ cm}^{-1}$  de carbonilas e  $2921$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$  corresponde a carbonos  $\text{sp}^3$ . O espectro de ultravioleta em  $\text{CH}_3\text{OH}$  apresentou absorção máxima de 273 nm.

**Tabela 4.** Características obtidas em RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (600 MHz) das substâncias (amidas substituídas) inéditas: 7,8-dihidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida (substância1) e 7,8-dihidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (substância 2) isolados do extrato metanólico obtido do *N. gardneri*

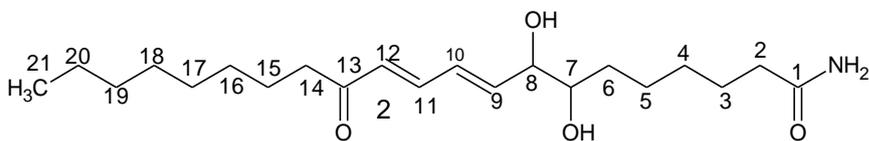
Posição	(1)			(2)		
	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$	HMBC	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$	HMBC
1	-	176,33		-	176,33	
2	2,29	33,51	C-1/C-4/C-5	2,30	33,59	C-1/C-3/C-4
3	1,38	24,67		1,37	28,81	C-4
4	1,35	28,56		1,62	24,67	C-1/ C-5/ C-6
5	1,62	24,49		1,56	32,02	
6	4,10	74,57		NO	25,24	
7	3,53	73,91		3,52	73,91	
8	2,27	33,60		4,10	74,59	C-7/C-10
9	6,32	143,82	C-6	6,33	143,82	C-11/C-12
10	6,49	129,04		6,51	129,07	C-8/C-11
11	7,29	142,79	C-13	7,30	142,79	C-9/C-13
12	6,21	129,01	C-13/C-10	6,23	129,02	C-13
13	-	202,45		-	202,45	
14	2,63	39,68	C-13/C-15/C-17	2,63	39,86	C-13/C-15/ C-16
15	1,53	23,90		ND	23,86	
16	1,27	29,29		1,32	31,16	
17	1,63	28,55		1,35	22,15	
18	1,36	31,90		0,93	12,89	C-16/C-17
19	1,40	27,83	C-16			
20	1,34	22,35	C-17			
21	0,94	13,02	C-20/C-19/ C-18			

\*Espectros obtidos em MeOD;\* valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC, ND-não determinado.

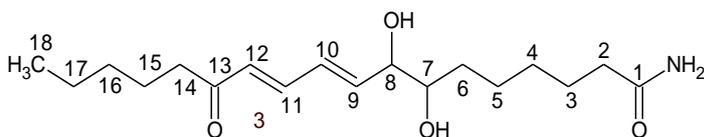
As substâncias 1 (**Figura 1 A**) e 2 (**Figura 1 B**) são amidas substituídas inéditas e foram identificadas como 7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida e 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida, respectivamente. A substância 1 (6,1 mg) foi obtida como um óleo amarelo claro. A análise do experimento de COSY evidenciou correlações entre os hidrogênios H-10 e H-11 e entre H-11 e H-12 que, associado com as correlações observadas em gHMBC, confirmaram a posição das ligações duplas.

**Figura 1.** Estrutura química dos compostos isolados do extrato metanólico obtidos do *N. gardneri*. Em **A** composto **1**: 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida. Em **B** o composto **2**: 7,8 -Di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida.

**A**



**B**



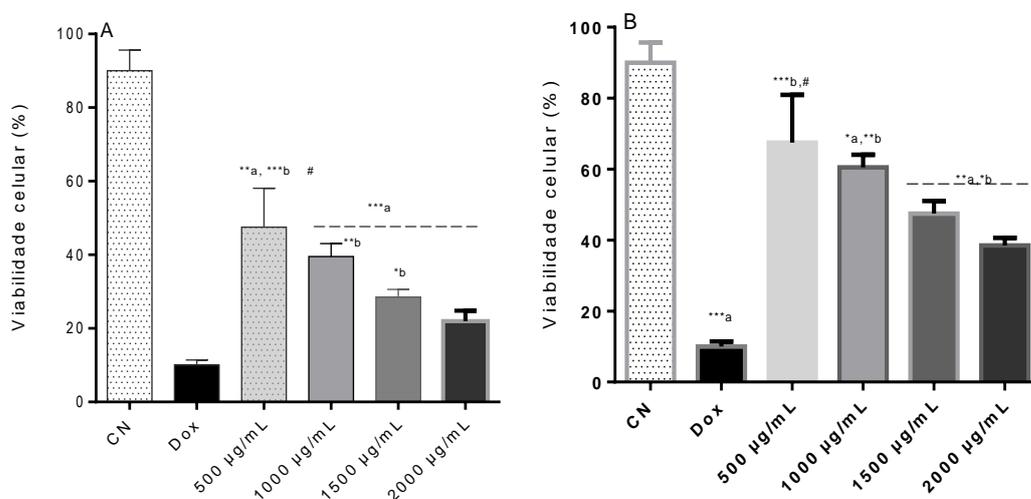
Através do experimento de TOCSY 1D pode-se observar um mesmo sistema de *spin* da molécula entre os hidrogênios H-14, H-15 e H-19, entre os hidrogênios H-9,H-10, H-11 e H-12. Também é possível observar interações entre a hidroxila OH-6 com os hidrogênios H-4, H-5 e H-7, permitindo propor para a substância 1 o nome de 7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida. A análise criteriosa e a comparação dos dados de RMN 1H de duas amidas inéditas: 7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida (**substância 1**) e 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (**substância 2**), isoladas de extratos metanólicos e suas frações. A perda dos sinais em 1,36 (m; 2H,  $\delta_C$  31,90),  $\delta_H$  1,40 (m; 2H,  $\delta_C$  27,83)  $\delta_H$  1,34 (m; 2H,  $\delta_C$  22,35) é atribuída aos hidrogênios metilênicos de H-18, H-19 e H-20. Em vez disso, apareceu o sinal em  $\delta_H$  0,93 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H,  $\delta_C$  12,89) de um tripleto atribuído a hidrogênios da metila.

A análise do experimento de HMBC, associado ao experimento de COSY1D e TOCSY 1D, permitiu propor a estrutura da substância **2** semelhante à substância **1**, com uma diferença de um grupo propil a menos na estrutura de **2**, indicando para 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida. O espectro de massas de alta resolução ESI (+) no modo positivo da substância **2**, apresentou pico para molécula protonada em  $m/z$  327.2162  $[M+2H]^+$ , correspondendo à fórmula molecular  $C_{18}H_{31}NO_4$ , indicando 4 insaturações, sugerindo um análogo da substância **1**.

### 3.3 Efeitos do extrato metanólico (EM) e fração acetato de etila extraídos do *N. gardneri* sobre a viabilidade celular em células do líquido ascítico de Sarcoma 180

O EM (**Figura 2A**) obtido do *N. gardneri*, em todas as concentrações testadas (500, 1000, 1500 e 2000 µg/mL), interferiu, significativamente, na viabilidade celular em células do líquido ascítico de Sarcoma 180, como avaliada com o teste de exclusão azul de Tripán, indicando efeitos citotóxicos para o EM. Entretanto, foi observado que esses efeitos foram significantes em relação ao apresentado pela Dox, exceto na concentração de 2000 µg/mL. Diferença estatística foi observada entre a menor com a maior concentração testada. Dados similares foram observados para a fração acetato de etila (**Figura 2 B**), exceto para a menor concentração (500 µg/mL), que não apresentou efeitos citotóxicos.

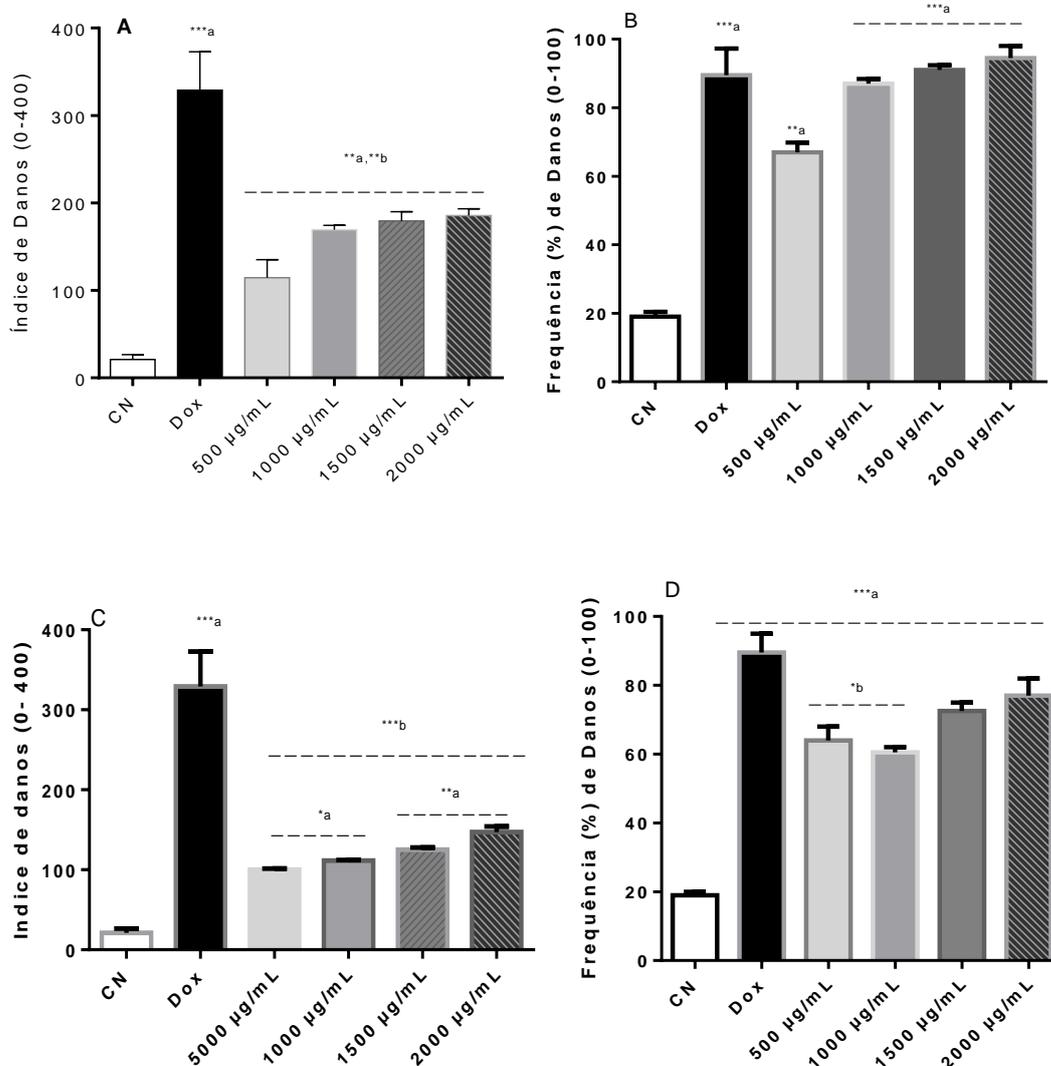
**Figura 2.** Efeitos de extratos obtidos do *N. gardneri* na viabilidade celular avaliada pelo teste de exclusão por azul de Tripán em células do líquido ascítico de Sarcoma 180, após 72h de exposição. Valores representam a média ± desvio padrão. CN: células não tratadas. DOX: Doxorubicina (2 µg/mL). A: extrato metanólico e B: acetato de etila. ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> Significante em relação ao CN (controle negativo); <sup>b</sup> Significante em relação à Dox e <sup>#</sup> Significante em relação à maior concentração.



### 3.4 Efeitos genotóxicos dos extratos metanólico (EM) e acetato de etila (AE) extraídos do *N. gardneri*

O EM e o AE induziram genotoxicidade em todas as concentrações testadas, pelos significantes aumentos dos índices e frequência de danos, quando comparados ao CN. Os efeitos genotóxicos dos extratos foram significantes em relação à Dox, exceto para a duas menores concentrações do FAE (**Figura 3**).

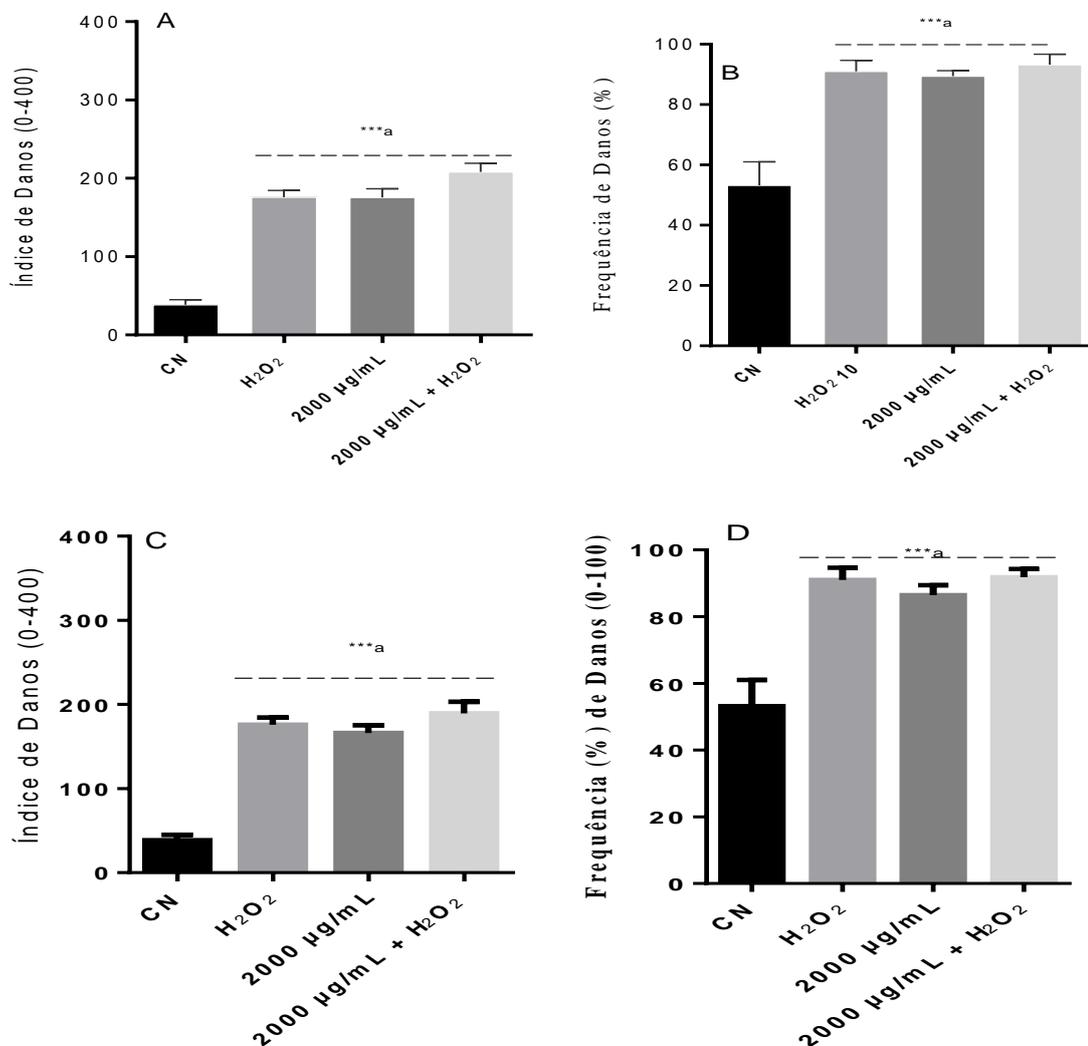
**Figura 3.** Efeitos genotóxicos do extrato metanólico (EM) e fração acetato de etila (AE) extraídos do *N. gardneri*. Em **A** (Índice de Danos) e **B** (Frequência de Danos), dados para o EM; e em **C** (Índice de Danos) e **D** (Frequência de Danos), dados para FAE. Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. CN: células não tratadas. Dox: Doxorubicina (2  $\mu$ g/mL). A e B: Extrato metanólico; C e D: acetato de etila. ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> Significante em relação ao CN (controle negativo); <sup>b</sup> Significante em relação à Dox.



### 3.5 Possíveis mecanismos oxidativos implicados em danos genotóxicos dos extratos metanólicos (EM) e acetato de etila (AE) obtidos do *N. gardneri* em células de Sarcoma 180.

Tanto o EM quanto o AE induziram danos genotóxicos por possíveis mecanismos oxidativos em cultura primária de S180, como observado em estudos comparativos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados apontam similaridades de danos genotóxicos de EM e AE com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 4**).

**Figura 4.** Efeitos oxidativos dos extratos metanólicos (EM) e acetato de etila (AE) obtidos de *N. gardneri* em cultura primária de Sarcoma 180 co-tratada com peróxido de hidrogênio na concentração de 2000µg/mL. Os valores representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: Doxorubicina 2 µg/mL. Em **A** e **B** - extrato metanólico (EM): e em **C** e **D** - acetato de etila (AE). ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey.  $p < 0,05$  comparado ao grupo CN (a) e  $H_2O_2$ (b).



### 3.6 Efeitos citogenéticos dos extratos metanólico (EM) e acetato de etila (AE) obtidos de *N. gardneri* em cultura primária de S180, avaliados pelo Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (CBMN)

Os extratos EM e AE, obtidos de *N. gardneri*, apresentaram efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos em células de Sarcoma 180, como observado pelo significativo aumento de micronúcleos em todas as concentrações testadas, quando comparado ao CN (grupo sem tratamento). Cabe enfatizar que a Dox induziu mais alterações do tipo micronúcleos do que os extratos EM e AE. Dados similares foram observados para o aumento de pontes e brotos em relação apenas ao CN. Ambos os extratos também induziram citotoxicidade conforme o

cálculo do índice de divisão nuclear (IDN) e índice de divisão nuclear considerando as apoptoses e necroses (IDNC) (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Danos citogenéticos dos extratos metanólicos (EM) e acetato de etila (AE) obtidos de *N. gardneri* em células de Sarcoma 180, após 72h de exposição, avaliados por meio do teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese.

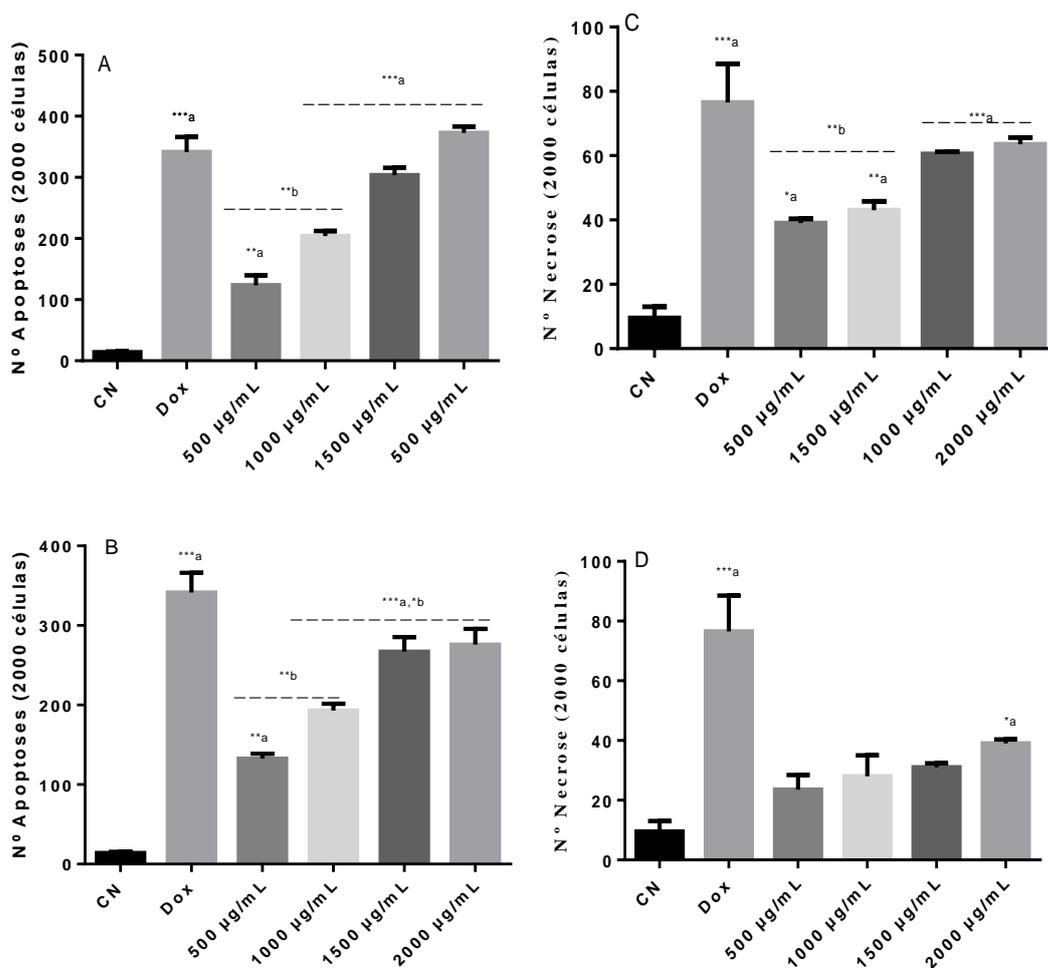
Tratamento	Danos citogenéticos			Citotoxicidade	
	Micronúcleos	Pontes	Brotos	IDN	IDNC
CN (sem tratamento)	1,75 ± 1,02	2,80 ± 0,41	1,70 ± 0,12	1,69 ± 7	1,60 ± 0,033
Doxorrubicina	36,50 ± 0,35 <sup>a</sup>	35,5 ± 3,53 <sup>a</sup>	17,0 ± 1,41 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,007 <sup>a</sup>
<b>Extrato metanólico</b>					
500 µg/mL	19,5 ± 3,5 <sup>a b</sup>	8,0 ± 4,2 <sup>a b</sup>	19,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,01 <sup>a b</sup>	1,19 ± 0,01 <sup>a</sup>
1000 µg/mL	21,5 ± 4,9 <sup>a b</sup>	9,5 ± 2,1 <sup>a b</sup>	18,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,02 <sup>a b</sup>	1,11 ± 0,02 <sup>a b</sup>
1500 µg/mL	24,0 ± 5,6 <sup>a b</sup>	11,0 ± 2,8 <sup>a b</sup>	21,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,02 <sup>a b</sup>
2000 µg/mL	25,5 ± 6,3 <sup>a b</sup>	13,0 ± 2,8 <sup>a b</sup>	23,0 ± 2,8 <sup>a b</sup>	1,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,05 <sup>a b</sup>
<b>Extrato acetato de etila</b>					
500 µg/mL	12,5 ± 3,5 <sup>a b</sup>	7,5 ± 0,7 <sup>b</sup>	16,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,03 <sup>a b</sup>	1,26 ± 0,1 <sup>a</sup>
1000 µg/mL	14,0 ± 5,6 <sup>a b</sup>	8,5 ± 0,7 <sup>a b</sup>	15,5 ± 4,9 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,02 <sup>a b</sup>	1,21 ± 0,02 <sup>a</sup>
1500 µg/mL	15,0 ± 0,0 <sup>a b</sup>	11,0 ± 0,0 <sup>a b</sup>	14,0 ± 4,2 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,03 <sup>a b</sup>	1,20 ± 0,01 <sup>a</sup>
2000 µg/mL	19,0 ± 1,4 <sup>a b</sup>	10,5 ± 0,7 <sup>a b</sup>	15,5 ± 4,9 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,01 <sup>a b</sup>

Valores representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: doxorubicina 2 µg/mL. IDN: índice de divisão nuclear. IDNC: índice de divisão nuclear considerando apoptose e necrose. ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. <sup>a</sup>p<0,05 comparado ao grupo CN. <sup>b</sup>p<0,05 comparado à Dox.

### 3.7 Ação citotóxica dos extratos metanólicos (EM) e acetato de etila (AE) obtidos do *N. gardneri* por indução de danos apoptóticos e necróticos em células de Sarcoma 180.

Os efeitos citotóxicos dos extratos EM e AE foram apontados também pelo aumento do número de células em apoptoses em todas as concentrações testadas comparadas ao CN, especialmente na concentração de 2000 µg/mL, onde foi observado similaridade com a Dox. Também foi observada aumento de morte celular por necrose para EM em todas as concentrações testadas, enquanto que para o AE apenas em 2000 µg/mL (**Figura 5**).

**Figura 5.** Apoptose e necrose induzidas pelos extratos de *N. gardneri* em cultura primária de S180, após 72h de exposição. A e B: apoptose. C e D: necrose. Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: doxorubicina 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Extrato metanólico de *N. gardneri*. A e C: Extrato metanólico e B e D: Acetato de etila de *N. gardneri*. ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo CN (a). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo CP (b). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

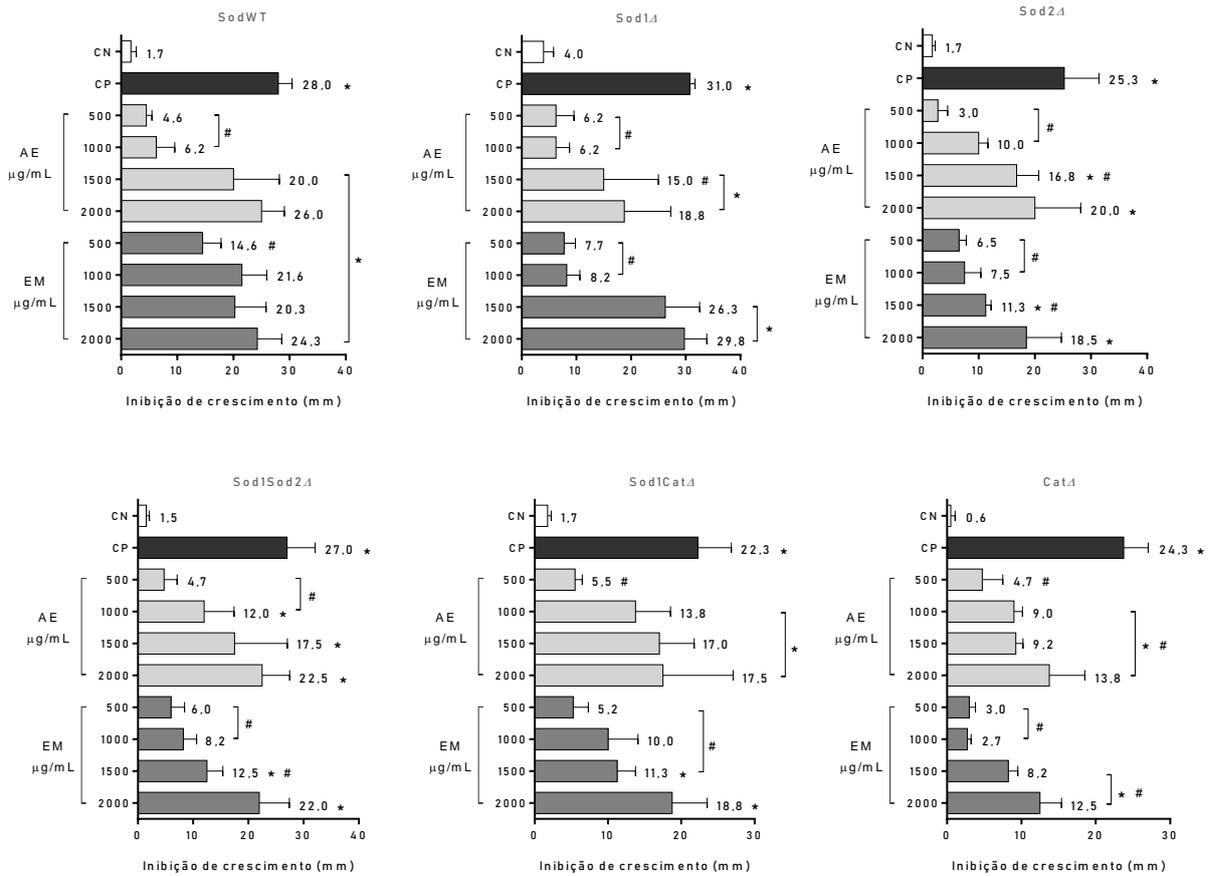


### 3.8 Efeitos oxidantes e antioxidantes de extratos metanólico (EM) e acetato de etila (AE) obtidos do *N. gardneri* em *S. cerevisiae*.

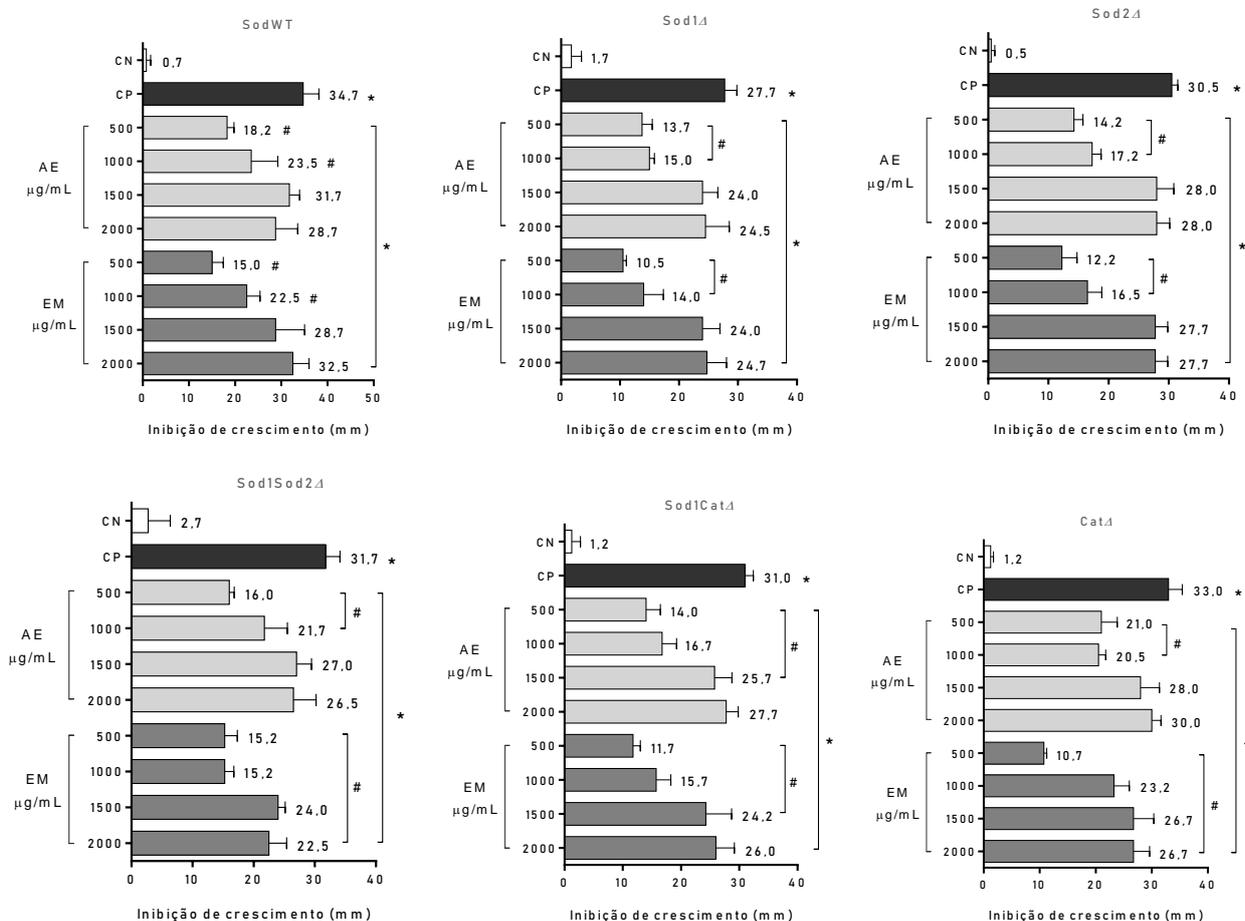
Os extratos EM e AE, obtidos do *N. gardneri*, a exemplo do observado com o teste desafio comparativo com o peróxido de hidrogênio, induziram danos oxidativos nas duas maiores concentrações em *S. cerevisiae* proficiente e mutadas para as enzimas superóxido dismutase citoplasmática, mitocondrial e duplo mutante, bem como para a catalase e duplo mutante catalase e superóxido dismutase citoplasmática, quando comparado ao CN (**Figura 6**). Entretanto, nas concentrações menores (500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), foram observados, para a maioria das linhagens, efeitos antioxidantes, exceto para a linhagem mutada em catalase, onde

esses efeitos também foram observados nas maiores concentrações (**Figura 7**). Os dados indicam que, dependendo das concentrações, os extratos AE e EM apresentam efeitos oxidantes e/ou antioxidantes.

**Figura 6.** Perfil oxidante dos extratos acetato de etila (AE) e metanólico (EM) em linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas antioxidantes. CN: solução de Tween 80. CP: Peróxido de hidrogênio 10 mM. ANOVA, Teste de Dunnett's. \* $p < 0,05$  comparado ao CN. # $p < 0,05$  comparado ao CP.



**Figura 7.** Atividade antioxidante (co-tratamento) dos extratos acetato de etila (AE) e metanólico (EM) frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio 10 mM em linhagens de *S. cerevisiae*. ANOVA, Teste de Dunnett's. \* $p < 0,05$  comparado ao CN. # $p < 0,05$  comparado ao CP.



#### 4. DISCUSSÃO

Em várias espécies do filo Basidiomycota, a exemplo do *N. gardneri*, os polissacarídeos, terpenoides, esteroides, alcaloides e compostos fenólicos estruturados demonstraram atividades antioxidante, antiviral, antibacteriana, anticolinesterase, antifúngica, anti-inflamatória, imunomoduladora e antitumoral (ISHIKAWA et al., 2001; MORADALI et al., 2007; TONG et al., 2009). Em análises fitoquímicas de extratos obtidos de *N. gardneri* foi possível evidenciar a presença de alcaloides, açúcares redutores, taninos, depsídeos e, em especial, proteínas no extrato metanólico (EM), bem como em sua fração acetato de etila (AE).

Os dados obtidos por RMN auxiliaram na caracterização estrutural de substâncias presentes no cogumelo *N. gardneri*, que foram isoladas e caracterizadas como 7,8-di-hidroxi-

13-oxo-heneicososa-9,11-dienamida e 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida. O oxigênio carboxílico de amidas é considerado um aceptor de ligações de hidrogênio; e o NH como um doador de ligações de hidrogênio. Mas a interação entre as pontes de hidrogênio acontece entre o grupo OH do metanol, como a que ocorre entre o grupo NH e o oxigênio do metanol (ZHAO et al., 2017). As amidas apresentam diversas atividades biológicas, tais como antifúngica e antimicrobiana e antitripanosoma (NOVAK et al., 1969; DOLEZAI et al., 2002; NARASIMHAN et al., 2004; PAPADOPOULOU et al., 2014).

Os extratos EM e AE, obtidos do *N. gardneri*, apresentaram citotoxicidade em células de Sarcoma 180 nas concentrações testadas (500, 1000, 1500 e 2000µg/mL), exceto para o AE em 500 µg/mL, como observado no teste azul de Tripán. Outros estudos, em Sarcoma 180, também indicaram citotoxicidade de amidas obtidas de extratos metanólicos de *Anthracophyllum lateritium*, por fragmentação nuclear indicativa de apoptose (FERNANDO et al., 2015). Citotoxicidade de amidas isoladas de *Macropiper excelsum*, em células de câncer de cólon HT29, também foram observadas em concentrações abaixo de 14µM (LEI et al., 2015). A amida 2-(3'-indolil)-N-ariltiazole-4-carboxamidas 17a-p, obtida de diversos fungos, foi responsável pela citotoxicidade em células Hela por mecanismos apoptóticos, indicando que apresentam efeitos antitumorais (HOSSEINI et al., 2013; MUKUND et al., 2015). Atividades citotóxicas de diversas amidas foram observadas em células tumorais escamosas (SHIMADA et al., 2014), em gliomas humanos (U251), células de ovário humano (SANTOS et al., 2015).

Os metabólicos secundários, oriundos de Basidiomycota, podem induzir toxicidade e ocasionar alterações de atividades biológicas em humanos e, conseqüentemente, são considerados com potenciais para fármacos (BUA-ART et al., 2010; BUA-ART et al., 2011; BURAKORN et al., 2015). Em outros estudos, os compostos nambinona C, aurisina A e aurisina K, isolados da *Neonothopanus nambi*, do mesmo gênero de *N. gardneri*, são responsáveis pela citotoxicidade em linhagens celulares de câncer NCI-H187 e de colangiocarcinoma (KANOKMEDHAKUL et al., 2012).

Outros compostos bioativos isolados de fungos apresentam atividades antitumorais por indução de apoptoses (MEI et al., 2015, LI et al., 2016; LI et al., 2017), expressão de caspases 7 e de BAX/BCI2 (LI et al., 2018), indução dos fatores IFN-4, COX-2 (WANG et al., 2015), TGFβ, indução de ERO's (PENG et al., 2015), aumento de proteínas quinases e de AMPc (ZAIANG et al., 2014) e aumento de TNF-α e IL2 (YANG et al., 2013). Os polissacarídeos também induzem toxicidades por parada do ciclo celular e indução de

apoptoses, autofagia aumento das proteínas BAX e caspases 3, diminuição do Bcl2 (ZHAO et al., 2017), além de aumento da liberação de citocromo e diminuição de ATP (PIRES et al., 2017), ativação de TNF, interleucinas e INOS (WANG et al., 2010). Estudos apontam que o extrato etanólico, obtido da espécie *Phellinus igniarius*, em MTT e DAPI, apresentou atividades antitumorais em linhagens humanas de HepG-2, AGS, SGC-7901, Hela e A-549, por mecanismos associados ao bloqueio do ciclo celular de SGC-7901 em G0/G1; colapso no potencial de membrana, indução de apoptoses por caspase-9, -3 e clivagem de PARP.

Eventos citogenéticos podem estar implicados na citotoxicidade e indução de apoptoses, tais como danos ao DNA, indicativos de genotoxicidade. No estudo, foi observado que tanto o EM como o AE induziram genotoxicidade em células obtidas de Sarcoma 180 em todas as concentrações testadas, em relação às células não tratadas com os extratos (CN). O extrato AE, nas duas maiores concentrações, induziu genotoxicidade de forma similar ao antineoplásico doxorrubicina. A doxorrubicina (Dox), em associação com a CPA, pode gerar radicais livres e inibir a topoisomerase II, enzima ativada durante a replicação do material genético (TACAR; SRIAMORNSAK; DASSA, 2012; BAMODU et al., 2015). As drogas citotóxicas podem também alterar o ciclo celular e/ou induzir a apoptose (LI et al., 2012).

O mecanismo de bioluminescência em *N. gardneri* foi explicado pela hidrólise catalisada pela enzima oxiluciferina, que produz ácido cafeico, reciclado na biossíntese de hispidina, através da via de estilipirona (KASKOVA et al., 2017). Cabe enfatizar que esse processo ocorre sob condições de estresse oxidativo (MOGILNAYA et al., 2016), devido à produção de peróxido de hidrogênio (PURTOV et al., 2015), com defesas antioxidantes observadas pela ação das enzimas peroxidases e catalases (MOGILNAYA et al., 2015).

Assim, os danos genotóxicos observados para os extratos EM e AE podem ser explicados, possivelmente, por mecanismos similares ao peróxido de hidrogênio. Como relatado, essa ERO pode ser liberada durante os processos de bioluminescência em *N. gardneri* (PURTOV et al., 2015), que acontece com estresse oxidativo (MOGILNAYA et al., 2016). A 3-hydroxi hispidina é uma luciferina fúngica considerada como produto da oxidação da hispidina. Quando misturada com uma fração de luciferase, nas espécies *N. nambi* e *N. gardneri*, o novo composto produz luz de forma dose-dependente, independente de NADPH. Os autores demonstraram que a hidroxilação de hispidina, no fragmento de piranhona, representa processos oxidativos.

Por outras análises, as amidas também podem induzir apoptoses e reduzir a recorrência do câncer por mecanismos associados à indução de ERO's e disfunção

mitocondrial e danos ao DNA, como por exemplo a lidocaína e aropivacaína, que causam danos ao DNA, induzem parada do ciclo celular em G0/G1, especialmente por induzirem ERO's, que levam à apoptose, como observado em células humanas de câncer de pulmão (WANG et al., 2016). Outros isolados do filo Basidiomycota,  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas, reagem rapidamente com cisteína para formar adutos no material genético estáveis, ao passo que as lactonas,  $\alpha$ -insaturadas- $\gamma$ , endocíclicas reagem lentamente com a cisteína para formar adutos instáveis (KUPCHAN et al., 1970).

Cabe enfatizar que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocasiona danos às macromoléculas, incluindo o DNA, podendo ocasionar a toxicidade celular, em especial a genotoxicidade (ORAKI et al., 2013), que induz apoptoses por interferência na expressão de citocromo C, Bcl-2, Bax, Bid e caspase 3 (GUTIÉRREZ-VENEGAS et al., 2015), como também por alterações na expressão caspase-9, P53, NF- $\kappa$ B e RIP, podendo atuar em apoptoses e em necroses (XIANG et al., 2016; LENNICKE et al., 2015). O peróxido de hidrogênio pode ser utilizado em modelos *in vitro* para a indução do estresse oxidativo. Ele resulta da conversão de ânion superóxido (O<sub>2</sub> •-) pela enzima superóxido dismutase (SOD) e seu potencial de toxicidade está relacionado à fácil redução desse composto em radicais OH• (FITÓ et al., 2007; BHATTACHARYYA et al., 2014).

Os danos genotóxicos quando não reparados podem ocasionar mutagenicidade, como observada no estudo para os extratos EM e AE obtidos do *N. gardneri* em células e Sarcoma 180 pela formação de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos. Não foram encontrados relatos de mutagenicidade para o *N. gardneri*. Esses mecanismos citogenéticos também estão implicados em atividades antitumorais. Os micronúcleos podem ter sido resultantes de erros durante a anáfase, onde fragmentos ou cromossomos acêntricos formaram corpos extracelulares (BOLOGNESI; FENECH, 2012; SABHARWAL et al., 2015), que são oriundos de quebras de cromossomos (clastogenia) ou perda de cromossomos inteiros (aneugenia) (FERREIRA et al., 2009; FENECH et al., 2011).

As pontes nucleoplasmáticas podem ser atribuídas a erros em rearranjos cromossômicos ou à fusão de extremidades cromossomais, telômeros que podem induzir à ligação entre dois núcleos distintos (FENECH et al., 2011). E os brotos nucleares podem ter sido resultantes de ampliações nucleares, sem segregação dos núcleos (BITGEN et al., 2016). Esses danos citogenéticos podem ser associados e/ou considerados como mecanismos de ação antitumoral que ocasionam a indução de apoptoses (HUANG, 2003; ZAVALA-AGUIRRE et al., 2010; KEY et al., 2015). A formação de brotos pode estar relacionada com

instabilidades cromossômicas resultantes de danos no material genético com amplificação gênica (BONASSI et al., 2011; FENECH et al., 2011; HONG et al., 2011).

Corroborando, a citotoxicidade observada com a coloração azul de Tripan, também foi possível apontar que os extratos obtidos de *N. gardneri* induziram citotoxicidade em células de Sarcoma 180, observado pelo índice de divisão nuclear (IDN) e índice de divisão nuclear considerando apoptoses e necroses (IDNC). Extratos metanólicos de *Fusarium moniliforme* e de *Manihot esculenta* apresentam efeitos citotóxicos pela viabilidade celular de células Vero, MG 63, HBL, Sw 1573, WID e Hela, por parada do ciclo celular e indução de apoptoses (CASTRO et al., 2015). Proteínas isoladas de outras espécies, tais como *Ganoderma lucidum* e de *Pleurotus ostreatus*, induziram citotoxicidade em macrófagos humanos (ZHANG et al., 2017).

A citotoxicidade dos extratos EM e AE, obtidos de *N. gardneri*, foi também indicada pelo aumento do nº de apoptoses e de necrose em células de Sarcoma 180. Existem relatos de que a hispidina, um composto fenólico, substância precursora da luciferina (composto bioluminescente), presente em micélio de *Neonothopanus nambi*, *Mycena chlorophos*, *Omphalotus japonicus* e *N. gardneri*, induz estresse oxidativo (OBA et al., 2017). Além disso podem ter efeitos antitumorais, demonstrado em células de câncer gástrico, por induzir morte celular necrótica por autofagia, por mecanismos associados à expressão de proteínas reguladoras de microtúbulos reversivelmente fosforilantes, e pela produção de óxido nítrico e interferências na permeabilidade de membranas lisossomais (LV, LONG-XIAN, 2017).

Também existem relatos de que a hispidina tem efeitos antitumorais associados à indução de apoptoses por geração de ERO's (LIM et al., 2015), como evidenciado em câncer de cólon (OBA et al., 2017). Em células de Sarcoma 180, polissacarídeos isolados da espécie *Phellinus linteus*, foram apontados como de ação antitumoral (MEI et al., 2015). Lectina, isolada da espécie *Russula lépida*, demonstrou potencial antitumoral em células de hepatoma (Hep G2) e células MCF-7 de câncer de mama humano (ZHANG et al., 2010) e também atribuíram atividades antitumorais para as  $\beta$ -glucanas, heteromananas e heteroglucanas (SHAH et al., 2007).

A resposta celular a danos oxidante/antioxidante ao DNA dos fungos é semelhante à resposta de células de mamíferos. Além disso 30% dos genes relacionados a doenças humanas, apresentam genes homólogos funcionais em leveduras (DE LA TORRE-RUIZ; PUJOL; SUNDARAN, 2015). As deleções de enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase manganês (MnSOD) e cobre-zinco (CuZnSOD) causam aumento de proteínas

oxidase que favorecem o uso destas linhagens em estudos de danos oxidativos (FARRUGIA; BALZAN, 2012). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a exemplo do teste desafio com o peróxido, também foi observado que os extratos AE e EM induzem danos oxidativos em linhagens proficientes e mutadas em defesas antioxidantes, para a superóxido dismutase citoplasmática, mitocondrial e para catalase, bem como para as mutantes.

Entretanto, em menores concentrações (500 e 1000 µg/mL), os efeitos foram para atividades antioxidantes frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio. Os polissacarídeos, obtidos do Basidiomycota, atuam como antioxidantes por mecanismos associados à remoção do radical hidroxil e ânion superóxido (CHEN et al., 2016), influência sobre a GSH e peroxidação lipídica (PANDA et al., 2017), eliminação (LI et al., 2017; ZHANG et al., 2017) e captura de radicais livres (ZHU et al., 2015).

Estudos também apontaram que os polissacarídeos heteroglicanos, isolados de *Pleurotus cystidiosus* e de *Entoloma lividoalbum*, atuam na alteração dos níveis de GSH na sua forma reduzida e oxidada (MAITY et al., 2014; PANDA et al., 2017). Os isolados das espécies *Cycnoches ventricosum*, *Pleurotus cystidiosus* foram responsáveis, como antioxidantes, por agirem nos níveis de Malondialdeído (MDA), catalase (CAT) e superóxido dismutase (LIU et al., 2016; MAITY et al., 2014; PANDA et al., 2017). Extratos das espécies *Ganoderma lucidum*, *Phellinus rimosus*, *Pleurotus florida* e *Pleurotus pulmonarius* também apresentaram propriedades antioxidantes e antitumorais (AJITH; JANARDHANAN, 2007). De forma similar, extratos isolados de fungos podem ser oxidantes devido a elevadas concentrações de compostos fenólicos. Entretanto, em baixas concentrações, são antioxidantes, como sequestradores de radicais livres (AKATA; ERGÖNÜL; KALYONCU, 2012).

## 5 CONCLUSÃO

Os extratos EM e AE, obtidos de *N. gardneri*, são misturas complexas de alcaloides, açúcares reduzidos, proteínas, taninos e catequinas e apresentaram duas amidas inéditas (7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida e 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida). Tais substâncias são, possivelmente, relacionados para atividades citotóxicas e antitumorais, especialmente as amidas, observadas em células de Sarcoma 180, por mecanismos citogenéticos associados a danos ao DNA e à formação de anormalidades nucleares do tipo micronúcleos, pontes nucleoplasmática e brotos, bem como por

apresentarem perfil oxidativo similar ao peróxido de hidrogênio em 2000 µg/mL. No estudo foi possível pontuar que EM e AE, nas menores concentrações (500 e 1000 µg/mL) testadas, em *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas antioxidantes para superóxido dismutase mitocondrial e citoplasmática e duplo mutante, bem como para catalase e mutantes, apresentaram efeitos antioxidantes. Mas, em 1500 e 2000 µg/mL, induziram danos oxidativos em *S. cerevisiae*. Substâncias com propriedades antagônicas como antioxidantes e citotóxicas, como observado no estudo, apontam boa opção para a terapia do câncer.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, M. A.; HODHOD, M. S.; BAHKALI, A. H.; JONES, E. G. Mohamed A. et al. Marine fungi of Saudi Arabia. **Botanica Marina**, v. 57, n. 4, p. 323-335, 2014.
- AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cogumelos medicinais indianos como fonte de agentes antioxidantes e antitumorais. **Jornal de Bioquímica Clínica e Nutrição**, v. 40, n. 3, p. 157-162, 2007.
- AKATA, Ilgaz; ERGÖNÜL, B.; KALYONCU, Fatih. Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. **Int J Pharmacol**, v. 8, n. 2, p. 134-138, 2012.
- ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2035-2046, 2016.
- ARAN, V.; VICTORINO, A. P.; THULER, L. C.; FERREIRA, C. G. Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality. **Clinical colorectal cancer**, v. 15, n. 3, p. 195-203, 2016.
- ARIFI, S.; BELBARAKA, R.; RAHHALI, R.; ISMAILI, N. Treatment of adult soft tissue sarcomas: an overview. **Rare cancers and therapy**, v. 3, n. 1-2, p. 69-87, 2015.
- AZQUETA, A.; RUNDÉN-PRAN, E.; ELJE, E.; NICOLAISSEN, B.; BERG, K. H.; SMERINGAIOVA, I.; JIRSOVA, K.; COLLINS, A. The comet assay applied to cells of the eye. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 21-24, 2017.
- BAMODU, O. A.; HUANG, W. C.; TZENG, D. T.; WU, A.; WANG, L. S.; YEH, C. T.; CHAO, T. Y. Ovatodiolide sensitizes aggressive breast cancer cells to doxorubicin, eliminates their cancer stem cell-like phenotype, and reduces doxorubicin-associated toxicity. **Cancer Letters**, v. 364, p. 125-134, 2015.

BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; VAZ, J. A.; FERREIRA, I. C.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 2, p. 151-156, 2007.

BEANE, J.D.; YANG, J.C.; BRANCO, D.; STEINBERG, S.M.; ROSENBERG, S.A.; RUDLOFF, U. Efficacy of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcoma of the extremity: 20-year follow-up of a randomized prospective trial. **Annals of surgical oncology**, v. 21, n. 8, p. 2484-2489, 2014.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S.E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, p. 329-354, 2014.

BITGEN, N.; DONMEZ-ALTUNTAS, H.; BAYRAM, F.; CAKIR, I.; HAMURCU, Z.; DIRI, H.; BASKOL, G.; SENOL, S.; DURAK, A. C. Increased micronucleus, nucleoplasmic bridge, nuclear bud frequency and oxidative DNA damage associated with prolactin levels and pituitary adenoma diameters in patients with prolactinoma. **Biotechnic&Histochemistry**, v. 91, p. 128-136, 2016.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 23, n. 1, p. 26-78, 2006.

BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v.7, p. 1125-1137, 2012.

BOLOGNESI, C.; HOLLAND, N. The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 183-203, 2016.

BONASSI, S.; EL-ZEIN, R.; BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, p. 93-100, 2011.

BRENNAN, M. F.; ANTONESCU, C. R.; MAKI, Robert G. **Management of soft tissue sarcoma**. New York:: Springer, 2013.

BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; HIRANSALEE, A.; KANOKMEDHAKUL, S.; LEKPHROM, R. Effect of bioactive compound from luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi* Speg.) on Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood) and Non-Target organism. **KKU Research Journal**, v. 16, p. 331-341, 2011.

BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; KANOKMEDHAKUL, S.; HIRANSALEE, A.; LEKPHROM, R. Extraction of Bioactive Compounds from Luminescent Mushroom (*Neonothopanus nambi*) and its Effect on Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*), **KKU Research Journal**, v. 10, p. 726-737, 2010.

BURAKORN, J.; NGUEYN, T.B.; PRAPHRUET, R. Biological Activities of a Thai Luminescent Mushroom. **Agriculture Technology and Biological Sciences**, v. 12, p. 505-514, 2015.

BÜYÜKAVCU, A.; ALBAYRAK, Y. E.; GÖKER, N. A fuzzy information-based approach for breast cancer risk factors assessment. **Applied Soft Computing**, v. 38, p. 437-452, 2016.

CAHLON, O.; BRENNAN, M. F.; JIA, X.; QIN, L. X.; SINGER, S.; ALEKTIAR, K. M. A postoperative nomogram for local recurrence risk in extremity soft tissue sarcomas after limb-sparing surgery without adjuvant radiation. **Annals of surgery**, v. 255, n. 2, p. 343, 2012.

CAPELARI, M.; DESJARDIN, D. E.; PERRY, B. A.; ASAI, T.; STEVANI, C. V. *Neonothopanus gardneri*: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. **Mycologia**, v. 103, n. 6, p. 1433-1440, 2011.

CARMONA-GUTIERREZ, D.; EISENBERG, T.; BÜTTNER, S.; MEISINGER, C.; KROEMER, G.; AND MADEO, F. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 5, p. 763, 2010.

CASTRO, L. S. E. P. W.; DE SOUSA PINHEIRO, T.; CASTRO, A. J. G.; SANTOS, M. D. S. N.; SORIANO, E. M.; LEITE, E. L. Potential anti-angiogenic, antiproliferative, antioxidant, and anticoagulant activity of anionic polysaccharides, fucans, extracted from brown algae *Lobophora variegata*. **Journal of applied phycology**, v. 27, n. 3, p. 1315-1325, 2015.

CHEN, T.; XU, Y.; LIU, Z.; ZHU, S.; SHI, W.; CUI, F. Evaluation of drinking water treatment combined filter backwash water recycling technology based on comet and micronucleus assay. **Journal of Environmental Sciences**, v. 61, p. 61-70, 2016.

D'ANGELO, S. P.; TAP, W. D.; SCHWARTZ, G. K.; CARVAJAL, R.D. Imunoterapia Sarcoma: abordagens passadas e direções futuras. **Sarcoma**, v. 2014, 2014.

DE ANDRADE, T. J. A. S.; SOMENSI, A.; LOPES, M. N.; ARAÚJO, A. R.; JASPARS, M.; SILVA, D. H. S. Citrinadin A derivatives from *Penicillium citrinum*, an endophyte from the marine red alga *Dichotomaria marginata*. **Planta Medica**, v. 80, n. 10, p. PC37, 2014.

DE LA TORRE-RUIZ, A. M.; PUJOL, N.; SUNDARAN, V. Coping with oxidative stress. The yeast model. **Current drug targets**, v. 16, n. 1, p. 2-12, 2015.

DEY, I.; SHAH, K.; BRADBURY, N.A. Natural Compounds as Therapeutic Agents in the Treatment Cystic Fibrosis. **Journal of Genetic Syndromes and Gene Therapy**, v. 7, n. 1, 2016.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 2, 2004.

DOLEZAI, M.; MILETIN, M.; KUNES, J.; KRALOVA, K. Substituted amides of pyrazine-2-carboxylic acids: Synthesis and biological activity. **Molecules**, v. 7, p. 363-373, 2002.

DORE, C. M. P. G.; ALVES, M. G. D. C. F.; SANTOS, M. D. G. L.; DE SOUZA, L. A. R.; BASEIA, I. G.; LEITE, E. L. Antioxidant and anti-inflammatory properties of an extract rich in polysaccharides of the mushroom *Polyporus dermatopus*. **Antioxidants**, v. 3, n. 4, p. 730-744, 2014.

DOS SANTOS GALLARRETA, Mariana et al. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRESENÇA DE ALCALÓIDES EM BOUGAINVILLEA GLABRA CHOISY (1). **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 7, n. 2, 2016.

DURU, M. E.; ÇAYAN, G. T. Biologically active terpenoids from mushroom origin: a review. **Records of Natural Products**, v. 9, n. 4, p. 456, 2015.

FAN, L.; PAN, H.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Advances in Mushroom Research in the Last Decade. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 3, 2006.

FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in oncology**, v. 2, p. 64, 2012.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLE, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J.; NORPPA, H. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125-32, 2011.

FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084, 2007.

FERNANDO, D.M.; WIJESUNDERA, R.L.; SOYSA, P.; DE SILVA, D.; NANAYAKKARA, C.M. Antioxidant potential, in vitro cytotoxicity and apoptotic effect induced by crude organic extract of *Anthracophyllum lateritium* against RD sarcoma cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 1-10, 2015.

FERREIRA, F. L. S.; PRÁ, D.; MARTINO-ROTH, M. G.; GARCIAS, G. L. Buccal micronucleus frequency in associated with age in Down syndrome. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 1231-1237, 2009.

FITÓ, M.; TORRE, L.R; COVAS, M. "Olive oil and oxidative stress," **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 1215–1224, 2007.

GHAZARYAN, N. A.; GHULIKYAN, L. A.; KISHMIRYAN, A. V.; KIRAKOSYAN, G. R.; NAZARYAN, O. H.; GHEVONDYAN, T. H.; ZAKARYAN, N. A.; AYVAZYAN, N. M. Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina obtusa* venom in S-180 sarcoma bearing mice. **European journal of pharmacology**, v. 764, p. 340-345, 2015.

GU, G.; YUAN, J.; WILLS, M.; KASPER, S. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo. **Cancer research**, v. 67, n. 10, p. 4807-4815, 2007.

GUTIÉRREZ-VENEGAS, G.; -SOLÍS, A.G.; SECA, C.M.; CANO, J.A.A. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gingival fibroblasts. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.8, p. 15563-15572, 2015.

HELMAN, L. J.; MELTZER, P. Mechanisms of sarcoma development. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 9, p. 685, 2003.

HOSSEINI,S.; MONAJJEMI, M.; RAJAEIAN, E.; MOHAMMAD HAGHGUC, M.; SALARID, A.; GHOLAMIA, M.R. A Computational Study of Cytotoxicity of Substituted Amides of Pyrazine- 2-carboxylic acids Using QSAR and DFT Based Molecular Surface Electrostatic Potential. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 745-750, 2013.

HUANG, S. Genetic and non-genetic instability in tumor progression: link between the fitness landscape and the epigenetic landscape of cancer cells. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 3-4, p. 423-448, 2013.

HWANG Y.H.; YANG H.J.; YIM N.H.; MA J.Y. Genetic toxicity of *Epimedium koreanum* Nakai. **Journal of ethnopharmacology**, v. 198, p. 87-90, 2017.

IMITIAJ, A; LEE, T.S. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.3, n.3, p. 316-321, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

ISHIKAWA, S.S.; RAINE, A.; LENCZ, T.; BIHRLE, S.; LACASSE, L. Autonomic stress reactivity and executive functions in successful and unsuccessful criminal psychopaths from the community. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 110, p. 423-432, 2001.

JAIN, S.; KAPOOR, G. Chemotherapy in Ewing's sarcoma. **Indian journal of orthopaedics**, v. 44, n. 4, p. 369, 2010

KANOKMEDHAKUL, S.; LEKPHROM, R.; KANOKMEDHAKUL, K.; HAHNVAJANAWONG, C.; BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. **Tetrahedron**. v.68, p.8261- 8266. 2012.

KASKOVA, Z. M.; DÖRR, F. A.; PETUSHKOV, V. N.; PURTOV, K. V.; TSARKOVA, A. S.; RODIONOVA, N. S.; MINEEV, K. S.; GUGLYA, E. B.; KOTLOBAY, A.; BALEEVA, N. S.; BARANOV, M. S.; ARSENIYEV, A. S.; GITELSON, J. I.; LUKYANOV, S.; SUZUKI, Y.; KANIE, S.; PINTO E.; MASCIO, P.; WALDENMAIER, H. E.; PEREIRA, T. A.; CARVALHO, R. P.; OLIVEIRA, A. G.; OBA, Y.; BASTOS, E. L.; STEVANI, C. V.; YAMPOLSKY, I. V.; BARANOV, M. S. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. **Science advances**, v. 3, n. 4, p. e1602847, 2017.

KATSUTA, E.; YAN, L.; NAGAHASHI, M.; RAZA, A.; STURGILL, J. L.; LYON, D.E.; RASHID, M. D.; NITAI C.; TAKABE, K. Doxorubicin effect is enhanced by sphingosine-1-

phosphate signaling antagonist in breast cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 219, p. 202-213, 2017.

KATYA K.; YUN Y.H.; PARK G.; LEE J.Y.; YOO G.; BAI S.C. Evaluation of the efficacy of fermented by-product of mushroom, *Pleurotus ostreatus*, as a fish meal replacer in juvenile Amur catfish, *Silurus asotus*: effects on growth, serological characteristics and immune responses. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 27, n. 10, p. 1478, 2014.

KEY, T.J.; APPLEBY, P.N.; TRAVIS, R.C.; ALBANES, D.; ALBERG, A.J.; BARRICARTE, A.; BLACK, A.; BOEING, H.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; CHAN, J.M.; CHEN, C.; COOK, M.B.; DONOVAN, J.L.; GALAN, P.; GILBERT, R.; GILES, G.G.; GIOVANNUCCI, E.; GOODMAN, G.E.; GOODMAN, P.J.; GUNTER, M.J.; HAMDY, F.C.; HELIÖVAARA, M. Carotenoids, retinol, tocopherols, and prostate cancer risk: pooled analysis of 15 studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 102, p. 1142-1157, 2015.

KUMAR, S.; BAJAJ, S.; BODLA, R. B. Preclinical screening methods in cancer. **Indian journal of pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 481, 2016.

KUPCHAN, S. M.; GIACOBBE, T. J.; KRULL, I. S. Reversible thiol addition as a protecting reaction for conjugated  $\alpha$ -methylene groups of lactones. **Tetrahedron Letters**, v. 11, n. 33, p. 2859-2862, 1970.

LEI, J.; BURGESS, E.J.; RICHARDSON, A.T.; HAWKINS, B.C.; BAIRD, S.K.; SMALLFIELD, B.M.; VAN KLINK, J.W.; PERRY, N.B. Cytotoxic Amides from Fruits of Kawakawa, *Macropiper excelsum*. **Plantamedica**, v. 81, p.1163-1168, 2015.

LENNICKE, C.; RAHN, J.; LICHTENFELS, R.; LUDGER A. WESSJOHANN L.A.; SELIGER, B. Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells. **Cell Communication and Signaling**, v.13, p. 1-19, 2015.

LI, H. J.; DU, J. Z.; DU, X. J.; XU, C. F.; SUN, C. Y.; WANG, H. X., CAO, Z. T.; YANG, X. Z.; ZHU, Y. H.; NIE, S.; WANG, J. Stimuli-responsive clustered nanoparticles for improved tumor penetration and therapeutic efficacy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 15, p. 4164-4169, 2016.

LI, T.; KON, N.; JIANG, L.; TAN, M.; LUDWIG, T.; ZHAO, Y., BAER, B.; GU, W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1269-1283, 2012.

LI, W.; GUO, L.; BI, X.; MA, J.; ZHENG, S. Immunohistochemistry of p53 and Ki-67 and p53 mutation analysis in renal epithelioidangiomyolipoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, p. 9446-9451, 2015.

LI, Y.; BATEMAN, C. C.; SKELTON, J.; JUSINO, M. A.; NOLEN, Z. J.; SIMMONS, D. R.; HULCR, J. Wood decay fungus *Flavodon ambrosius* (Basidiomycota: Polyporales) is widely farmed by two genera of ambrosia beetles. **Fungal biology**, v. 121, n. 11, p. 984-989, 2017.

- LI, Y.; SHAO, X.; XU, J.; WEI, Y.; XU, F.; WANG, H. Tea tree oil exhibits antifungal activity against *Botrytis cinerea* by affecting mitochondria. **Food chemistry**, v. 234, p. 62-67, 2017.
- LIM, W.; PARK, J.; LEE, Y.H.; HONG, J.; LEE, Y. Subglutinol A, an immunosuppressive  $\alpha$ -pyrone diterpenoid from *Fusarium subglutinans*, acts as an estrogen receptor antagonist. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, n. 3, pp. 507-512, 2015.
- LV, LONG-XIAN et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the bile stress response in probiotic *Lactobacillus salivarius* LI01. **Journal of proteomics**, v. 150, p. 216-229, 2017.
- MAITY, P.; NANDI, A.K.; SEN, I.K.; PATTANAYAK, M.; CHATTOPADHYAY, S.; DASH, S.K. Heteroglycan of an edible mushroom *Entoloma lividoalbum*: structural characterization and study of its protective role for human lymphocytes. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, p. 157-65, 2014.
- MATSUZAKI, K.; HARADA, A.; TANAKA, K.; TAKEIRI, A.; MISHIMA, M. HSP90 inhibitor CH5164840 induces micronuclei in TK6 cells via an aneugenic mechanism. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 773, p. 9-13, 2014.
- MEI, F.; YOU, J.; LIU, B.; ZHANG, M.; LIU, J.; ZHANG, B.; PEI, F. LASS2/TMSG1 inhibits growth and invasion of breast cancer cell in vitro through regulation of vacuolar ATPase activity. **Tumor Biology**, v. 36, n. 4, p. 2831-2844, 2015.
- MILEO, A.M.; MICCADEI, S. Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: new therapeutic strategies. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.
- MOGIL'NAYA, N.O.; RONZHIN, S.E.; MEDVEDEVA, V.S.; BONDAR, V. Total peroxidase and catalase activity of luminous basidiomycetes *Armillaria borealis* and *Neonothopanus nambi* in comparison with the level of light emission. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, p. 419-424, 2015.
- MOGILNAY, O.A.; RONZHIN, N.O.; BONDAR, V.S. Extracellular Peroxidase Activity and Light Emission of the Mycelium of the Basidiomycete *Neonothopanus nambi* in the Presence of  $\beta$ -Glucosidase. **Biophys**, v. 63, p. 93-99, 2016.
- MORADALI, M. F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 701-724, 2007
- MUKUND, P. T.; WANG, J.; SINGH, R.P.; KUMAR, A.; SHAH, K.; KUMARA, D. 2-(3'-Indolyl)-N-arylthiazole-4-carboxamides: Synthesis and evaluation of antibacterial and anticancer activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 4225-4231, 2015.

- NARASIMHAN, B.; BELSARE, D.; PHARANDE, D.; MOURYA, V.; DHAKE, A. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.39, p.827-834, 2004.
- NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; WALDHERR, M.; SETAYESH, T.; MISIK, M.; WULTSCH, G.; FILIPIC, M.; BARCELOS, G. R. M.; KNASMUELLER, S. Results of micronucleus assays with individuals who are occupationally and environmentally exposed to mercury, lead and cadmium. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 119-139, 2016.
- NGUYEN H.D.; LEWIS C.T.; LÉVESQUE C.A.; GRÄFENHAN T. Draft genome sequence of *Alternaria alternata* ATCC 34957. **Genome announcements**, v. 4, n. 1, p. e01554-15, 2016.
- NOVAK, A.F.; SOLAR, J.M.; MOD, R.R.; MAGNE, F.C.; SKAU, E.L., Antimicrobial activity of some N-substituted amides of long-chain fatty acids. **Applied microbiology**, v. 18, p.1050-1056, 1969.
- OBA, Y.; SUZUKI, Y.; MARTINS, G. N.; CARVALHO, R. P.; PEREIRA, T. A.; WALDENMAIER, H. E.; KANIE, S.; NAITO, M.; OLEIVEIRA, A. G.; DORR, F. A.; PINTO, E.; YAMPOLSKY, I. V.; STEVANI C. V. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 16, n. 9, p. 1435-1440, 2017.
- OLIVEIRA, A. G.; CARVALHO, R. P.; WALDENMAIER, H. E.; STEVANI, C. V. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. **Quim. Nova**, v. 36, n. 2, p. 314-319, 2013.
- OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, C. V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 10, p. 1416-1421, 2009.
- OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, C. V.; WALDENMAIER, H. E.; VIVIANI, V.; EMERSON, J. M.; LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. Circadian control sheds light on fungal bioluminescence. **Current Biology**, v. 25, n. 7, p. 964-968, 2015
- OLIVEIRA, G. L. S.; DE ALENCAR, M. V. I. O. B.; JUNIOR, A. L. G.; DE SOUZA, A. A.; CAVALCANTE, A. A. E. D. C. M.; DE FREITAS, R. M. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L.(Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 136-147, 2014.
- ORAKI KOHSHOUR, M.; NAJAFI, L.; HEIDARI, M.; GHAFFARI SHARAF, M. Antiproliferative effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> against human acute myelogenous leukemia KG1 cell line. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, n. 3, pp. 134-141, 2013.
- PANDA, A. C.; GRAMMATIKAKIS, I.; MUNK, R.; GOROSPE, M.; ABDELMOHSEN, K. Emerging roles and context of circular RNAs. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, n. 2, p. e1386, 2017.

PAPADOPOULOU, M.V.; BLOOMER, W.D.; ROSENZWEIG, H.S.; ARENA, A.; ARRIETA, F.; REBOLLEDO, J.C.; SMITH, D.K. Nitro (triazole/imidazole)-based amides/sulfonamides as antitubercular agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.1, p. 36-44, 2014.

PASSOS, H.; EGAL, E.; SHINOMIA, S.; ALEXANDRE, G.; CINTRA, M. L.; AMSTALDEN, E.; MARIANO, F. Retrospective Study of Sarcomas in a Brazilian Institution: Clinical-Pathological Analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 149, n. suppl\_1, p. S33-S33, 2018.

PATRA, K.; JANA, S.; SARKAR, A.; KARMAKAR, S.; JANA, J.; GUPTA, M.; MUKHERJEE, G.; DE, U. C.; MANDAL, D. P.; BHATTACHARJEE, S. Parkia javanica Extract Induces Apoptosis in S-180 Cells via the Intrinsic Pathway of Apoptosis. **Nutrition and cancer**, v. 68, n. 4, p. 689-707, 2016.

PAWLAS, N.; OLEWINSKA, E.; MARKIEWICZ-GORKA, I.; KOZLOWSKA, A.; JANUSZEWSKA, L.; LUNDH, T.; JANUSZEWSKA, E.; PAWLAS, K. Oxidative damage of DNA in subjects occupationally exposed to lead. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, v. 26, n. 6, p. 939-945, 2017.

POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. **Cryptogamie Mycologie**, v. 27, n. 4, p. 311, 2006.

PURTOV, K. V.; PETUSHKOV, V. N.; BARANOV, M. S.; MINEEV, K. S.; RODIONOVA, N. S.; KASKOVA, Z. M.; TSARKOVA, A. S.; PETUNIN, A. I.; BONDAR, V. S.; RODICHEVA, E. K.; MEDVEDEVA, S. E.; OBA, Y.; OBA, Y.; ARSENIYEV, A.S.; LUCYANOV, S.; GITELSON, J. I.; YAMPOLSKY, I. V. The chemical basis of fungal bioluminescence. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 28, p. 8124-8128, 2015.

RHEE, S. G.; WOO, H. A.; KIL, I. S.; BAE, S. H. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4403-4410, 2012.

ROHR, P.; DA SILVA, J.; DA SILVA, F. R.; SARMENTO, M.; PORTO, C.; DEBASTIANI, R.; SANTOS, C. E. I.; DIAS, J. F.; KVITKO, K. Evaluation of genetic damage in open-cast coal mine workers using the buccal micronucleus cytome assay. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 54, n. 1, p. 65-71, 2013.

SABHARWAL, R.; VERMA, P.; SYED, M. A.; SHARMA, T.; SUBUDHI, S. K.; MOHANTY, S.; GUPTA, S. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. **Indian Journal Medical Paediatric**, v. 36, p. 212-218, 2015.

SALEH, A. M.; AL-QUDAH, M. A.; NASR, A.; RIZVI, S. A.; BORAI, A.; DAGHISTANI, M. Comprehensive Analysis of the Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic Mechanisms of Pallines Spinosa Flower and Leaf Essential Oils Against Breast Cancer Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 2043-2065, 2017.

SAMUEL, P.; PRINCE, L.; PRABAKARAN, P. Antibacterial activity of marine derived fungi collected from South East Coast of Tamilnadu, India. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 4, p. 86-94, 2017.

SANTOS, D.S.; PIOVESAN, L.A.; D'OCA, C.R.M.; HACK, C.R.L.; TREPTOW, T.G.; RODRIGUES, M.O.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; RUIZ, A.L.T.; DE CARVALHO, J.E.; D'OCA, M.G.M.. Antiproliferative activity of synthetic fatty acid amides from renewable resources. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v.23, p.340-347, 2015.

SHAH, N. P.; SKAGGS, B. J.; BRANFORD, S.; HUGHES, T. P.; NICOLL, J. M.; PAQUETTE, R. L.; SAWYERS, C. L. Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 9, p. 2562-2569, 2007.

SHENG, J. Y.; MOVVA, S. Systemic therapy for advanced soft tissue sarcoma. **Surgical Clinics**, v. 96, n. 5, p. 1141-1156, 2016.

SHIMADA, C.; UESAWA, Y.; ISHIHARA, M.; KAGAYA, H.; KANAMOTO, T.; TERAKUBO, S.; NAKASHIMA, H.; TAKAO, K.; MIYASHIRO, T.; SUGITA, Y.; SAKAGAMI, H. Quantitative structure–cytotoxicity relationship of piperic acid amides. **Anticancer research**, v. 34, p.4877-4884, 2014.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Ahmedin. Cancer statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016.

SMETANINA, O. F.; KALINOVSKY, A. I.; KHUDYAKOVA, Y. V.; PIVKIN, M. V.; DMITRENOK, P. S.; FEDOROV, S. N.; JI, H.; KWAK, J. Y.; KUZNETSOVA, T. A. Indole alkaloids produced by a marine fungus isolate of *Penicillium janthinellum* Biourge. **Journal of natural products**, v. 70, n. 6, p. 906-909, 2007.

SONG, J.; CHEN, J. J.; WANG, M.; CHEN, Y. Y.; CUI, B. K. Phylogeny and biogeography of the remarkable genus *Bondarzewia* (Basidiomycota, Russulales). **Scientific reports**, v. 6, p. 34568, 2016.

SPEIT, G.; ROTHFUSS, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: **DNA Repair Protocols**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 79-90.

STEEN, S.; STEPHENSON, G. Current treatment of soft tissue sarcoma. In: **Baylor University Medical Center Proceedings**. Taylor & Francis, 2008. p. 392-396.

STILLER, C. A.; TRAMA, A.; SERRAINO, D.; ROSSI, S.; NAVARRO, C.; CHIRLAQUE, M. D.; PASALI, P. G. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 3, p. 684-695, 2013.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current protocols in immunology** / edited by John E. Coligan, 2015.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASSA, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 157–170, 2012.

TAYLOR, B.S.; BARRETINA, J.; MAKI, R.G.; ANTONESCU, C.R.; CANTOR, S.; LADANYI, M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 8, p. 541, 2011.

TONG, L.; LEE, S.; DENU, J.M. Hydrolaseregulates NAD<sup>+</sup> metabolitesandmodulatescellular redox.**JournalofBiologicalChemistry**, v. 17, p.11256-11266, 2009.

VÁZQUEZ, J.; GONZÁLEZ, B.; SEMPERE, V.; MAS, A.; TORIJA, M. J.; BELTRAN, G. Melatonin reduces oxidative stress damage induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1066, 2017.

VENTURA, F. F.; SILVA, R.T.P; STEVANI, C. V. História do Fungo Bioluminescente Flor-de-Coco (*Neonothopanus gardneri*) e Efeitos das Condições de Cultura Sobre a Emissão de Luz. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 41-55, 2014.

WANG, D.; WANG, J.; LIU, Y; ZHAO, Z.; LIU, Q. Roles of Chinese herbal medicines in ischemic heart diseases (IHD) by regulating oxidative stress. **International Journal of Cardiology**, v. 220, p.314–319. 2015.

WANG, H.; WANG, L.; JIANG, L.; TIAN, S.; , ZHONG, T.; FANG, X. Amide-linked local anestheticsinduceapoptosis in human non-smallcelllung câncer. **Journalof Thoracic Disease**, v. 8, p. 2748-2757, 2016.

WANG, Z.; LIU, Y.; HAN, N.; CHEN, X.; YU, W.; ZHANG, W.; ZOU, F. Profiles of oxidative stress-related microRNA and mRNA expression in auditory cells. **Brain research**, v. 1346, p. 14-25, 2010.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.

WEBER, L.; CARVALHO, L.; SÁ, N.; SILVA, V.; BERARDINI, N.; SOUZA, V.; CONCEIÇÃO, M. Genotoxic effects of the water-soluble fraction of heavy oil in the brackish/freshwater amphipod *Quadrivisio aff. lutzi* (Gammaridea) as assessed using the comet assay. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 4, p. 642-655, 2013.

XIANG, J.; WAN, C.; GUO, R.; GUO, D. Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types?.**BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-6, 2016.

YANG, Z.; XU, J.; FU, Q.; FU, X.; SHU, T.; BI, Y.; SONG, B. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. **Carbohydrate polymers**, v. 95, n. 2, p. 615-620, 2013.

YAP, H. Y. Y.; CHOOI, Y. H.; FIRDAUS-RAIH, M.; FUNG, S. Y.; NG, S. T.; TAN, C. S.; TAN, N. H. The genome of the Tiger Milk mushroom, *Lignosus rhinocerotis*, provides insights into the genetic basis of its medicinal properties. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 635, 2014.

YU, P. L.; CHEN, L. H.; CHUNG, K. R. How the pathogenic fungus *Alternaria alternata* copes with stress via the response regulators SSK1 and SHO1. **Plos one**, v. 11, n. 2, p. e0149153, 2016.

YUN, J. S.; PAHK, J. W.; LEE, J. S.; SHIN, W. C.; LEE, S. Y.; HONG, E. K. *Inonotus obliquus* protects against oxidative stress-induced apoptosis and premature senescence. **Molecules and cells**, v. 31, n. 5, p. 423-429, 2011.

ZAVALA-AGUIRRE, J. L.; TORRES-BUGARÍN, O.; BUELNA-OSBEN, H. R ; FLORES-KEHN, L. P.; RAMOS-IBARRA, M. L.; ZUNIGA-GONZALEZ, G.; OGURA, T. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities by cyclophosphamide and colchicine in *Xenotocamelanosoma* (Pisces, Goodeidae) from Lake la Alberca in Michoacan, Mexico. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 45, p. 75–81, 2010

ZHANG, G.; SUN, J.; WANG, H.; NG, T.B. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. **Phytomedicine**, v.17, p.775-781, 2010.

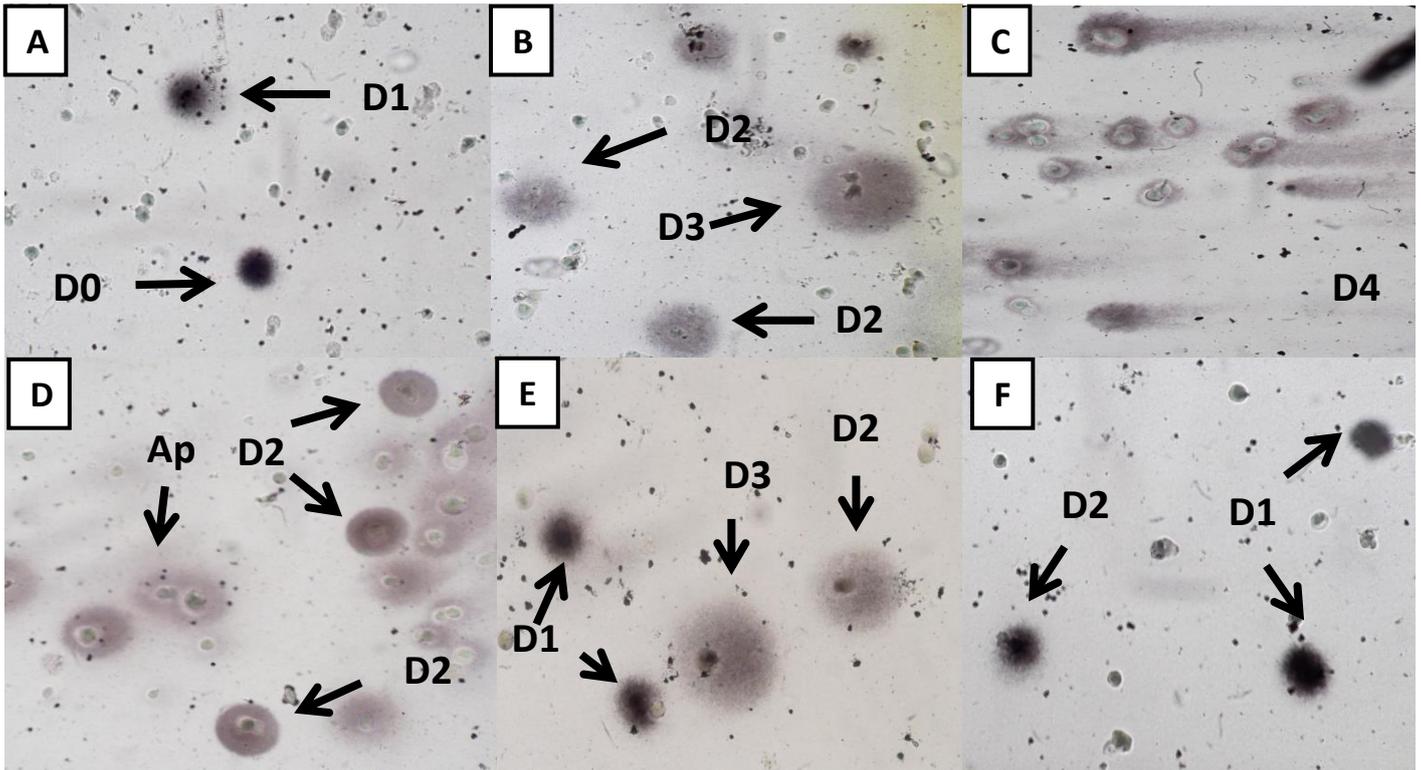
ZHANG, Q.; ZHU, B.; LI, Y. Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: A New Approach for Anticancer Therapy. **Frontiers in immunology**, v.8, n.71, 2017.

ZHAO, H.; TANG, S.; XU, X.; DU, L. Hydrogen Bonding Interaction between Atmospheric Gaseous Amides and Methanol Int. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1-10, 2017.

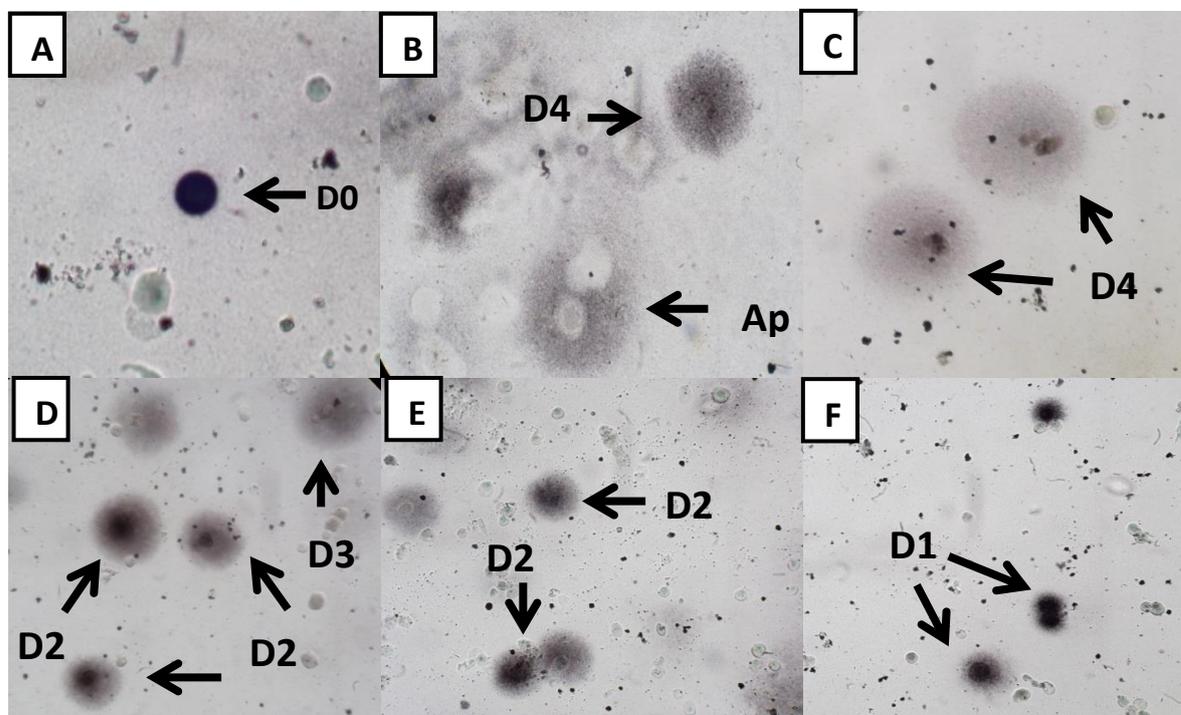
ZHU, F.; DU, B.; BIAN, Z.; XU, B. Beta-glucanos de cogumelos comestíveis e medicinais: características, atividades físico-químicas e biológicas. **Journal of Food Composition and Analysis** , v. 41, p. 165-173, 2015.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

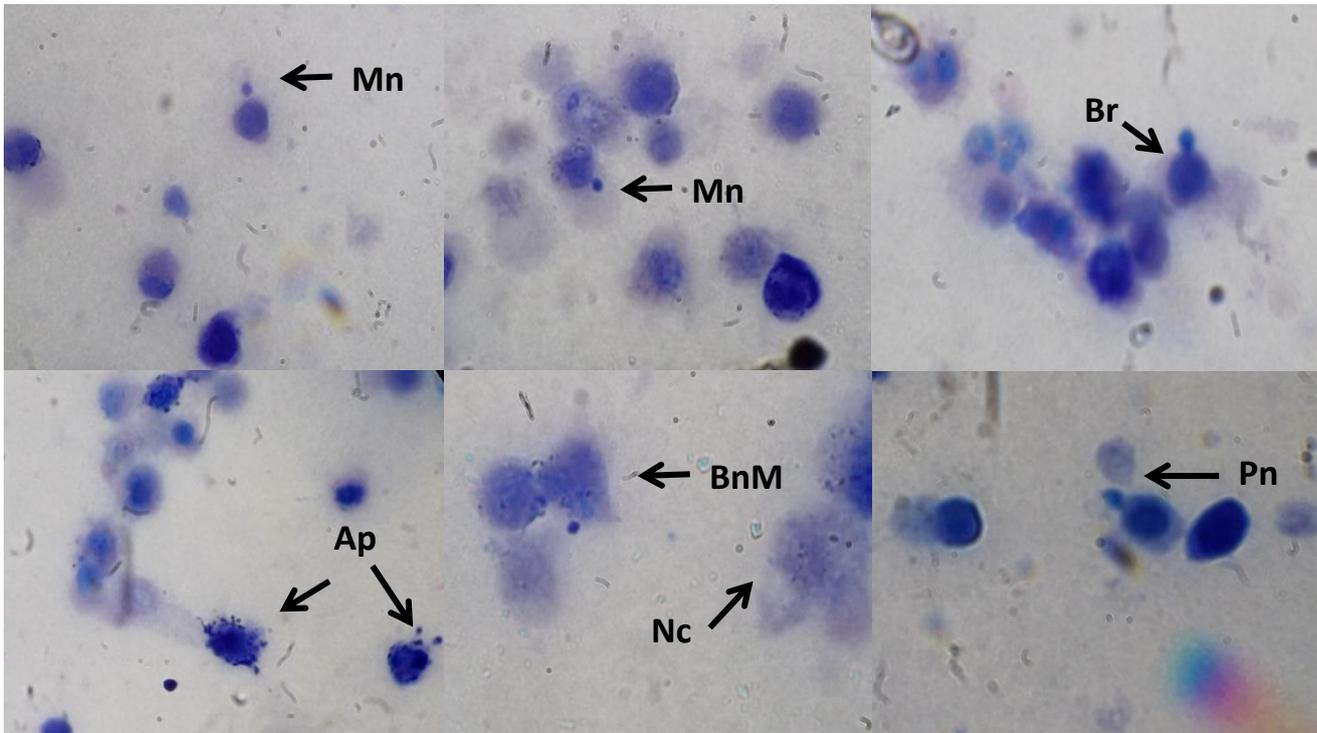
**Figura 1.** Perfil fotomicrográfico de cultura primária de S180 no ensaio cometa expostas ao extrato metanólico. A: células sem tratamento. B: doxorubicina 2  $\mu\text{g/mL}$ . C: EM 2000  $\mu\text{g/mL}$ ; D: EM 1500  $\mu\text{g/mL}$ ; E: EM 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; F: EM 500  $\mu\text{g/mL}$ . D0: dano tipo 0. D1: dano tipo 1. D2: dano tipo 2. D3: dano tipo 3. D4: dano tipo 4. Ap: apoptose. Coloração com prata. Aumento de 400X.



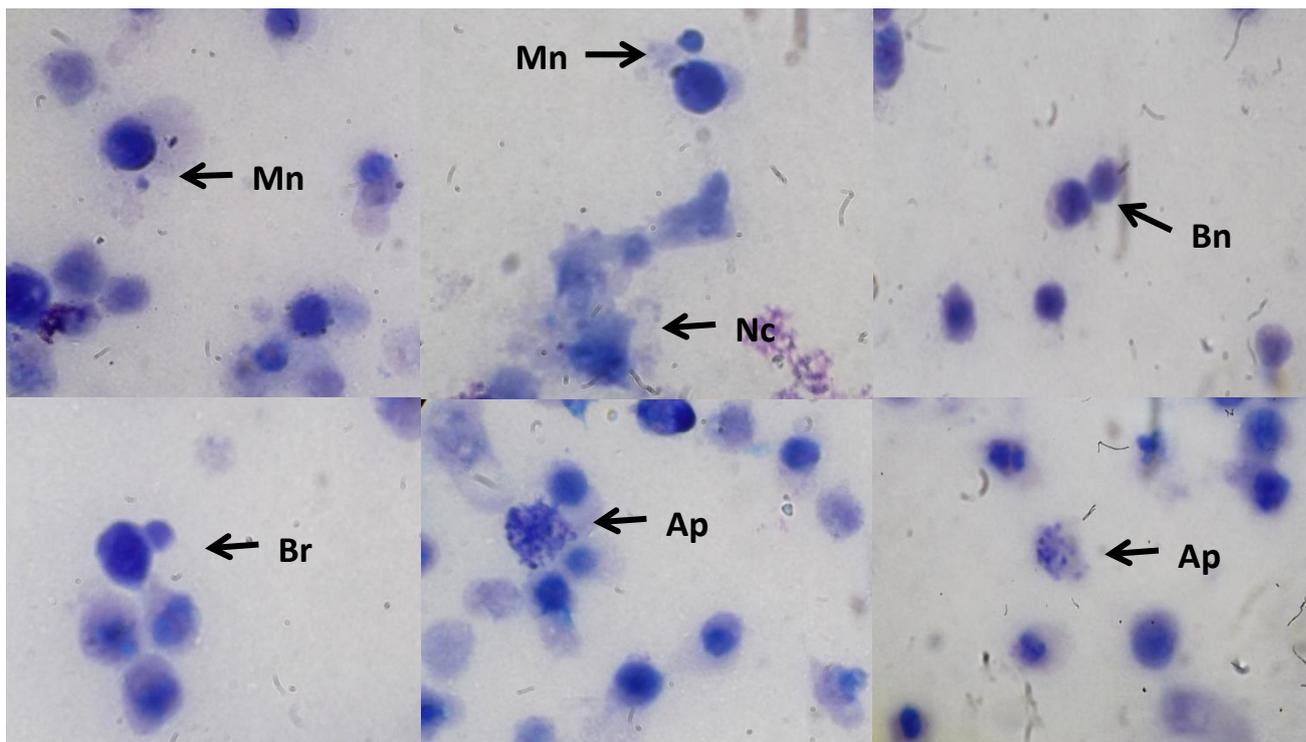
**Figura 2.** Perfil fotomicrográfico de cultura primária de S180 no ensaio cometa expostas ao extrato acetato de etila. A: células sem tratamento. B: doxorrubicina 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . C: AE 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; D: AE 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; E: AE 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; F: AE 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . D0: dano tipo 0. D1: dano tipo 1. D2: dano tipo 2. D3: dano tipo 3. D4: dano tipo 4. Ap: apoptose. Coloração com prata. Aumento de 400X.



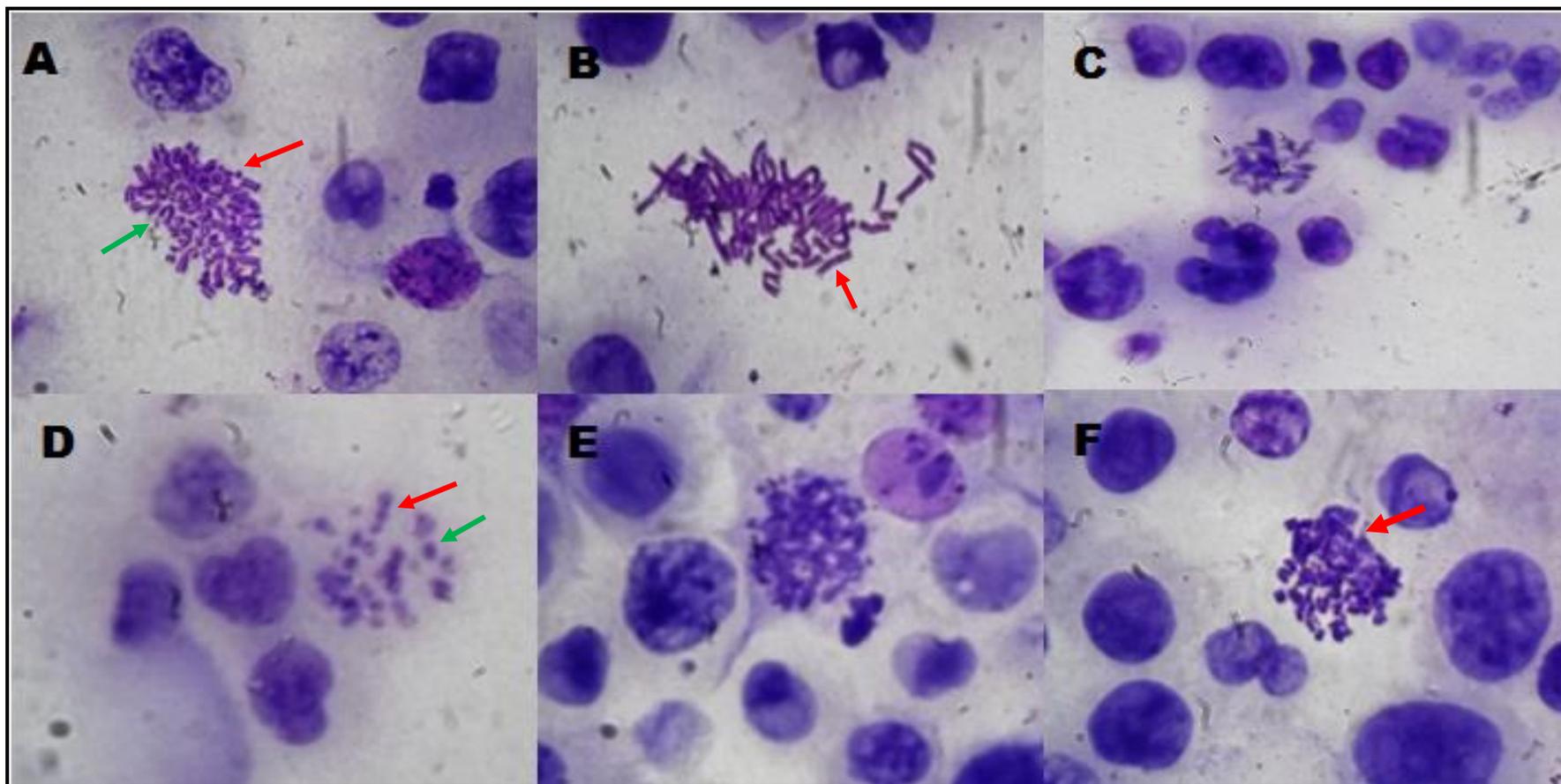
**Figura 3.** Perfil fotomicrográfico de células tumorais de Sarcoma 180 tratadas com extrato metanólico avaliadas pelo teste CBMN. Mn: Micronúcleo; Pn: Ponte nucleoplasmática; Ap: Apoptose; Nc: Necrose; BnMn: Célula binucleada com Mn; Br: Broto nuclear. Coloração com Giemsa 10%. Aumento de 1000X.



**Figura 4.** Perfil fotomicrográfico de células tumorais de Sarcoma 180 tratadas com extrato acetato de etila avaliadas pelo teste CBMN. Mn: Micronúcleo; Ap: Apoptose; Nc: Necrose; Bn: Célula binucleada normal; Br: Broto nuclear. Coloração com Giemsa 10%. Aumento de 1000X.



**Figura 05.** Perfil fotomicrográfico de células de sarcoma 180 após exposição aos extratos metanólico e acetato de etila no teste de Aberrações Cromossômicas. Em A, cromossomo dicêntrico (vermelha) e fragmento (verde); Em B, cromossomo dicêntrico; gragmento cromossômico (verde); Em C, Em D, cromossomo dicêntrico (Vermelha) e anel cromossômico (verde) e F, anel cromossômico.



# *CAPÍTULO III*

---

**Efeito antitumoral de extrato metanólico do *Neonothopanus gardneri* em modelo murino para câncer de mama: monitoramento toxicológico e citogenético**

## **Efeito antitumoral de extrato metanólico do *Neonothopanus gardneri* em modelo murino para câncer de mama: monitoramento toxicológico e citogenético**

Débora Cássia Vieira Gomes, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Rosália Maria Torres de Lima, Antonielly Campinho dos Reis, José Victor de Oliveira Santos, Gilberto Santos Cerqueira, Muhammad Torequl Islam, Luciano da Silva Lopes, João Marcelo de Castro e Sousa, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Maria das Dores Alves de Oliveira, Neicyano Souza Machado, Joaquim Soares da Costa Junior, Antônia Maria das Graças Lopes Citó, José Arimatéia Dantas Lopes, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante.

### **RESUMO**

Os Basidiomycotas são fontes ilimitadas de bioativos com propriedades terapêuticas. O *Neonothopanus gardneri* se destaca por suas atividades alimentares, nutracêuticas, antimicrobianas e antivirais. A quimioterapia do câncer de mama ainda causa diversos efeitos colaterais, não tem seletividade e apresenta riscos de instabilidade genética em células não neoplásicas. O estudo teve por objetivos isolar e caracterizar alguns dos compostos químicos do extrato metanólico obtido do *N. gardneri*, e avaliar os efeitos antitumorais em modelo murino para o câncer de mama, induzido pelo 7,12-dimetilbenzantraceno, com monitoramento toxicológico e citogenético. Foi feita a obtenção do extrato metanólico e sua caracterização fitoquímica e isolamento de compostos químicos por cromatografia em *Sephadex* LH-20 e ressonância magnética. Camundongos *Swiss*, albinos, com 6 a 7 semanas de idade, virgens e não gestantes pesando entre 20 a 50g foram usados para a indução do câncer de mama com 7,12-dimetilbenzantraceno (6 mg/Kg<sup>-1</sup> v.o), durante onze semanas. O carcinoma mamário ductal invasivo foi caracterizado por análise histopatológica e por marcação de Ki67. Os efeitos antitumorais foram avaliados com aplicação de biomarcadores citogenéticos (Ensaio Cometa, versão alcalina e Teste de Micronúcleos). O extrato foi testado, na dose de 10 mg/Kg<sup>-1</sup> v.o e a ciclofosfamida em 25 mg/Kg<sup>-1</sup> i.p., durante três semanas de terapias. O monitoramento toxicológico (comportamental (campo aberto, *rota rod*), peso de órgãos, hematológico e bioquímico para enzimas renais e hepáticas) foi feito durante a indução do câncer e terapia com o extrato. No extrato foram identificados açúcares, taninos, catequinas, depsídeos e proteínas, como também isolados as amidas substituídas, os compostos: 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida e 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida, como majoritários e inéditos. Para o extrato e ciclofosfamida não foram observadas alterações renais, no peso dos órgãos e comportamentais, apenas para o 7,12-dimetilbenzantraceno, que na última semana induziu quedas e permanência na chapa. Alterações hepáticas em plaquetas foram observadas para o extrato e para o 7,12-dimetilbenzantraceno. O extrato apresentou efeitos antitumorais, por mecanismos associados a danos ao DNA, possivelmente por efeitos oxidativos, como também por indução de apoptoses, que podem ser atribuídos aos seus compostos químicos, em especial aos majoritários, que devem ser testados para formulações farmacêuticas antitumorais.

**Palavras – chave:** *Neonothopanus gardneri*; antitumoral, danos ao DNA; mecanismos citogenéticos

## **Antitumor effect of methanolic extract of *Neonothopanus gardneri* in murine model for breast cancer: toxicological and cytogenetic monitoring**

### **ABSTRACT**

Basidiomycota are unlimited sources of bioactives with therapeutic properties. *Neonothopanus gardneri* stands out for its food, nutraceutical, antimicrobial and antiviral activities. Chemotherapy of breast cancer still causes several side effects, has no selectivity and presents risks of genetic instability in non-neoplastic cells. The aim of the study was to isolate and characterize some of the chemical compounds from the methanolic extract obtained from *N. gardneri*, and to evaluate the antitumor effects in murine model for breast cancer induced by 7,12-dimethylbenzanthracene, with toxicological and cytogenetic monitoring. The methanolic extract was obtained and its phytochemical characterization and isolation of chemical compounds characterized by chromatography on Sephadex LH-20 and magnetic resonance. Swiss, 6- to 7-week-old virgin and non-pregnant albinos weighing between 20 and 50 g were used for the induction of breast cancer with 7,12-dimethylbenzanthracene ( $6 \text{ mg/Kg}^{-1}$  v.o), for eleven weeks. Invasive ductal mammary carcinoma was characterized by histopathological analysis and by Ki67 labeling. The antitumor effects were evaluated with application of cytogenetic biomarkers (comet (alkaline version) and micronuclei tests). The extract was tested at a dose of  $10 \text{ mg/Kg}^{-1}$  v.o and cyclophosphamide at  $25 \text{ mg / kg}^{-1}$ , for three weeks of therapy. Toxicological monitoring (behavioral (open field, rotating rod), organ weight, hematological and biochemical for renal and hepatic enzymes) was done during cancer induction and therapy with the extract. In the extract were identified sugars, tannins, catechins, depositions and proteins, as well as the substituted amides, the compounds: 7,8-dihydroxy-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamide and 7,8-hydroxy-13-oxo-octadeca-9,11-dienamide, as major and unpublished. For the stratum and cyclophosphamide, renal changes were not observed in organ weight and behavioral only for 7,12-dimethylbenzanthracene, which in the last week induced falls and permanence in the plate. Hepatic changes in platelets were observed for the extract and 7,12-dimethylbenzanthracene. The extract showed antitumor effects, due to mechanisms associated with DNA damage, possibly due to oxidative effects, as well as by induction of apoptosis, which can be attributed to its chemical compounds, especially to the majoritarian ones, which should be tested for antitumor pharmaceutical formulations.

**Key words:** *Neonothopanus gardneri*; antitumor, DNA damage; cytogenetic mechanisms

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é de origem multifatorial (FACINA, 2014; MORAES et al., 2016) e responsável pela quinta causa de morte mundial entre as mulheres (HUANG et al., 2016), com maior incidência em idosos (ARRARAS et al., 2016); e com mais de 1,7 milhões de casos diagnosticados mundialmente (ABDEL-ZAHE; ELDEIB, 2016). Na quimioterapia do câncer de mama são usados os antineoplásicos ciclofosfamida, paclitaxel, carboplatina, cisplatina (MUNDHE et al., 2015), dentre outros. Entretanto, a maioria dos agentes antineoplásicos são genotóxicos e mutagênicos por clastogenia e/ou aneugenia, que são mecanismos citogenéticos preditivos de câncer (REIS et al., 2015), como também causam aductos ao DNA, erros de replicação, quebras e ligações cruzadas em todas as células (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; GUERREIRO et al., 2013).

A falta de seletividade dos antineoplásicos convencionais pode ocasionar efeitos colaterais inesperados (BAIRI et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018), induzindo danos em células não neoplásicas (ADÃO et al., 2013; RATTNER; BATHE, 2017), com riscos para o material genético (STORNETTA et al., 2017). Esses dados culminam para mais estudos sobre novos químicos para uma terapêutica eficaz e com baixa toxicidade sistêmica (PRATHEESHKUMAR et al., 2012; DONEPUDI et al., 2014). Produtos naturais extraídos de fungos são fontes de bioativos com propriedades biológicas compatíveis para formulações farmacêuticas para terapias oncológicas (SOUSA et al., 2013; HAVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Os Basidiomycotas apresentam diversos bioativos com uso terapêutico, tais como ácidos orgânicos, alcaloides, terpenoides, esteroides e compostos fenólicos (FERREIRA et al., 2009(a); JAYAKUMAR et al., 2011; SHIRMILA; RADHAMANY, 2012), que são considerados como antitumorais (PLESZCZYŃSKA et al., 2016; ZHANG et al., 2010; MEI et al., 2015). Os efeitos citotóxicos de compostos químicos de algumas espécies do filo Basidiomycota, em diferentes tipos celulares, são relatados como de potencial antitumoral (LAGUNES-CASTRO et al., 2016; WANG et al., 2018; FINIMUNDY et al., 2018; LI et al., 2018; MATUSZEWSKA et al., 2018).

O gênero *Neonothopanus* possui duas espécies que são mais conhecidas na literatura científica: *Neonothopanus gardneri* e *N. nambi* (COMER, 1981). A primeira distribui-se na Mata dos Cocais (Tocantins, Goiás e Piauí) (CAPELARI et al., 2011). Ambas são cogumelos bioluminescentes (CAPELARI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; VENTURA et al., 2015)

de importância toxicológica (VENTURA et al., 2015). Entretanto, ainda são raros os estudos sobre a ação terapêutica; em especial, antitumoral de extratos e compostos isolados do *N. gardneri*.

Os estudos de toxicologia em animais são de importância para a eficácia de compostos com propriedades antitumorais (ZERHOUNI, 2003) e a avaliação de marcadores citogenéticos pois apontam os riscos de toxicidade genética (RIM; KIM, 2015; GRUJIČIĆ et al., 2016). Ademais, os modelos de carcinogênese química em animais são importantes para pesquisa e desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos/quimiopreventivos (HOLLERN; ANDRECHEK, 2014; KEMP, 2015). Assim, o estudo teve por objetivos caracterizar e isolar compostos majoritários do extrato metanólico (EM) obtido do *N. gardneri*, além de avaliar os efeitos antitumorais desse extrato em modelo animal de câncer de mama, induzido pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), com monitoramento toxicológico e citogenético.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Reagentes químicos e extratos utilizados no estudo**

O DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno), Ciclofosfamida (CPA) e todos os demais produtos químicos e reagentes necessários para a realização deste estudo foram adquiridos da *Sigma-Aldrich (Chem Ex. Co. St. Louis, Missouri, USA)*. A CPA foi administrada por via intraperitoneal na dose de 25 mg/kg. O DMBA foi dissolvido em azeite de oliva (BARROS et al., 2004), e administrado por via oral na dose de 6 mg/kg/semana, durante 11 semanas de administração. O extrato metanólico (EM) obtido de *N. gardneri* foi solubilizado em 0,05% de *Tween 80*, dissolvido em 0,9% de Cloreto de Sódio e foi administrado por via oral na dose de 10 mg/kg<sup>-1</sup>.

### **2.2 Material fúngico**

O cogumelo *N. gardneri* Berk. ex Gardner foi coletado no povoado Mimoso (Latitude -6.2192648, Longitude -43.1474344, Elevação 146m), no município de São Francisco-MA, Brasil. A coleta ocorreu sob autorização, SISBIO número 54548-1. O material foi identificado pelo professor Dr. Cassius Vinícius Stevani, do Laboratório de

Bioluminescência de Fungos, Instituto de Química, da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil).

### **2.3 Extração e isolamento de compostos químicos do extrato metanólico de *N. gardneri***

Os cogumelos (500 g) foram lavados com água destilada e, em seguida, triturados com auxílio de gral pistilo e submetidos à extração com álcool metílico (3L) por 8 dias em temperatura de 30°C seguido pela evaporação do solvente em evaporador rotatório, levando à obtenção do extrato metanólico (4,045 g). Uma porção do extrato metanólico (1.5212 g) foi fracionada em coluna de sílica de fase reversa C18 (40-63 µm; Merck) eluída em gradiente H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH, obtendo oito (8) subfrações Ng1-Ng8. A subfração Met-Ng<sub>3</sub> (165 mg) foi submetida à análise em coluna semi-preparativa com coluna C18 *SunFire* (250 mm x 10mm, 5 µm), sistema de solvente ACN:H<sub>2</sub>O no modo gradiente linear (30-100% ACN em 35 min, detecção em 254 nm, e fluxo de 4,5 mL/min) permitindo o isolamento de dois novos compostos **1** (6,1 mg) e **2** (4,1 mg).

### **2.4 Análise fitoquímica**

Foram realizados testes de prospecção fitoquímica de acordo com a metodologia descrita por Barbosa (2001) a fim de identificar os seguintes compostos: açúcares redutores (reativo de Fehling), proteínas e aminoácidos, polissacarídeos, catequinas, alcaloides (Reativo de *Bouchardat*, Reativo de *Dragendorff* e Reativo de *Mayer*) flavonoides, taninos e fenóis e carotenoides, depsídeos.

### **2.5 Análise do extrato metanólico de *N. gardneri* por Ressonância Magnética e Cromatografia Líquida**

Foram feitas cromatografia em *Sephadex* LH-20, usando o metanol como eluente. Para reconhecer as substâncias isoladas, estas foram analisadas em HPLC e obtidos dados de RMN e espectrômetro *Bruker Avance DRX-500* (500 MHz e 126 MHz para os RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR respectivamente) em CD<sub>3</sub>OD sendo o solvente residual não deuterado como referência interna. O espectro de massas de ionização por *electrospray* (HRESIMS) foi obtido no modo positivo usando um *LTQ Orbitrap XL Hybrid* com Transformada de *Fourier* (*Thermo Scientific Instruments*) acoplado a um sistema de *CLAE Thermo Instruments* (*Detector Accela PDA*, amostrador automático *Accela* e bomba *Accela*, Instrumentos *Thermo Scientific*). As

seguintes condições foram usadas: tensão capilar 4,5 kV, temperatura capilar 260° C, taxa auxiliar de fluxo de gás 10-20 unidades arbitrárias, taxa de fluxo de gás de arraste 40-50 unidades arbitrárias, tensão de pulverização 4,5 kV, intervalo de massa 100-1000 amu. Os solventes padrões analíticos para extração e fracionamento (PA) para extração e isolamento foram das marcas Synth, Dinâmica, Merck: metanol (MeOH), etila, n-hexano, acetonitrila (MeCN) Para a separação cromatográfica em coluna aberta foi utilizado a fase estacionária *Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich*.

## **2.6 Animais**

Foram utilizados um total de 28 animais (04 grupos com 7 animais cada). A quantidade de animais foi estabelecida de acordo com o guia da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD n° 489, 2014). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (Protocolo n°132/16). Os animais utilizados no estudo foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias – CCA, da Universidade Federal do Piauí. Para o monitoramento toxicogenético do DMBA, camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, da linhagem *Swiss*, albinos, com 6 a 7 semanas de idade, virgens e não gestantes e pesando entre 20 a 50g, foram submetidas à aclimação por uma semana, sob condições monitoradas de temperatura equivalente a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , e um ciclo de 12 horas claro/escuro, com livre acesso à ração tipo *pellets* (Purina®) e água. Os animais foram divididos em quatro grupos: (1) azeite (azeite de oliva 10 mg/kg, v.o.); (2) DMBA (6 mg/kg, v.o.); (3) ciclofosfamida (25 mg/kg, i.p.) e (4) Extrato metanólico (EM) (10 mg/kg, v.o.). A dose do extrato foi escolhida mediante estudos prévios de toxicidade aguda (dados não mostrados).

## **2.7 Indução do câncer de mama em modelo animal com 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e terapia com EM**

O DMBA foi solubilizado em azeite de oliva e administrado, por gavagem, na dose de 6 mg/kg/semana. Todos os animais utilizados foram pesados e a dose individual foi calculada baseada no peso (BARROS et al., 2004). O grupo 1 foi tratado com azeite de oliva (10 mL/kg, v.o.). O grupo 2, com DMBA (6 mg/kg, v.o.), por 11 semanas. A formação do tumor foi monitorada, durante as 11 semanas, por palpções físicas e mensuração do diâmetro com o uso de um paquímetro digital. Após a detecção do tumor mamário, foi iniciada a terapia

durante três semanas com o EM (10 mg/Kg). A CPA (25 mg/Kg) foi usada como controle antineoplásico. Após o tratamento dos animais, as linhas mamárias das mamas esquerda e direita foram ressecadas e submetidas à necropsia completa, para avaliação macro e microscópica de neoplasias primárias. O produto das ressecções mamárias e da necropsia foi encaminhado para exame macroscópico (com especial atenção à determinação das dimensões e alterações da superfície de corte das peças), fixação em formalina 10% tamponada e processamento histotécnico automático para inclusão em parafina.

## **2.8 Monitoramento toxicológico durante a indução e terapia do câncer de mama com extrato metanólico obtido do *N. gardneri***

### 2.8.1 Análise hipocrática

Os riscos de toxicidade do EM foram avaliados de acordo com a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) *Guidelines* n° 423 e n° 407. Durante as onze semanas de administração do DMBA e três semanas de terapias com EM e CPA, os animais experimentais foram monitorados quanto às possíveis alterações hipocráticas (atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, contorção, reflexo de endireitamento, tônus muscular, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, calda em *straub*, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte, 30 minutos e 1h após administração semanal dos compostos.

### 2.8.2 Campo aberto

O aparato do teste de campo aberto consistiu de uma caixa em acrílico (paredes transparentes e piso preto, com diâmetro de 40 x 15cm de altura), dividido em nove quadrados de iguais dimensões (ARCHER, 1973). Após 30 minutos e 1h de cada administração, cada animal foi colocado, individualmente no aparato, sendo avaliado o número de cruzamentos com as quatro patas pelas divisões do aparato (atividade locomotora espontânea), frequência do comportamento de autolimpeza e número de levantamentos das patas dianteiras, sem apoiar-se nas paredes do aparato. Após cada avaliação individual, foi realizada a assepsia do equipamento com álcool 70%. O campo aberto foi repetido a cada semana de tratamento.

### 2.8.3 *Rota rod*

O teste de *Rota Rod* é utilizado para a avaliação da coordenação motora e relaxamento muscular produzido por drogas em animais. Resumidamente, após um intervalo de 5 minutos, os animais testados no campo aberto foram submetidos ao *Rota Rod*. Os camundongos foram colocados com as quatro patas numa barra cilíndrica giratória, de aço inoxidável, com 25 mm de diâmetro, a uma velocidade de rotação de 17 rpm, por um período de 3 min. O tempo de permanência na barra em segundos (TP), e o número de quedas (NQ), foram mensurados em triplicata (MACHADO et al., 2015). O *Rota Rod* também foi repetido a cada semana de tratamento.

### 2.8.4 Análise bioquímica e hematológica

Para a análise bioquímica, o sangue do coração foi colhido, logo após eutanásia dos animais, e centrifugado a 4000 x g, durante 5 min (a 4°C). O plasma foi submetido a uma análise bioquímica automática, em aparelho Labmax 240, com *kits* comerciais Labtest®, para os parâmetros de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Na avaliação hematológica, o número de eritrócitos, teor de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram determinados como séries vermelhas. O número de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos em séries brancas, e plaquetas. A análise foi realizada em aparelho hematológico automático (Advia 120/*Hematology Siemens*).

### 2.8.5 Eutanásia e coleta dos órgãos

Após as 3 semanas de tratamento com EM, os animais foram sacrificados por sobredose de solução anestésica (pentobarbital sódico + xilazina [1:1], i.p.). Imediatamente, foram separados, em caixa de gelo, o coração, o pulmão, o fígado, o baço e o rim. Os órgãos foram lavados com solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4), pesados e conservados em solução de formalina a 10%, por 24h; e posterior manutenção em solução de álcool 70%.

### 2.8.6 Avaliação histopatológica

Na análise histopatológica, os fragmentos de tecido mamário foram fixados em formaldeído a 3,5% em tampão fosfato (pH 7,6), juntamente com solução de sacarose a 1% e armazenados, durante 12h a 4°C, até a sua utilização. Processou-se a fixação durante 20h, seguida por desidratação das peças em diluições crescentes de etanol/água (50, 70, 90 e 95%, v/v). O material seco foi imerso em xileno PA e lavado duas vezes em parafina, e posteriormente, emblocados (BEHMER; TOLOSA; NETO, 1976). Os blocos foram seccionados (4 µM), em micrótomo, e as secções distendidas em lâminas. Consequentemente, as secções distendidas foram desparafinizadas em três banhos sucessivos de xileno PA e desidratadas em diluições decrescentes de etanol, conforme supracitado. Logo após, corou-se as lâminas com hematoxilina e eosina (ELGENGAIHI et al., 2016); e, finalmente, após lavagem e secagem, as lâminas foram cobertas por lamínulas com auxílio de bálsamo do Canadá.

### 2.8.7 Perfil imuno-histoquímico (Ki-67)

Dos blocos fabricados, prepararam-se secções de 3 µm, conforme citado. Após a desparafinização, realizou-se a recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0), por 20 minutos a 95°C. Bloqueou-se a peroxidase endógena com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 10 minutos, para reduzir a ligação não específica. Em seguida, foram incubadas as secções com anticorpo primário, Ki-67 (MIB-1, Dako), diluídos em diluente de anticorpo por 1h. Visualizaram-se os locais de ligação ao anticorpo pela incubação com solução de diaminobenzidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB, Dako). Utilizou-se como controle uma secção de tecido normal (mama dos animais tratados com azeite). Analisou-se a imunorreação semi-quantitativamente, de acordo com os critérios estabelecidos por Van Slooten e colaboradores (1996), considerando a intensidade da coloração no citoplasma de 400 células, analisados em microscópio (LEICA, S9APO), de acordo com o seguinte *score*: 0-25% de células marcadas (leve, +), 25-75% (moderada, ++) ou 75-100% (expressiva, +++). Em todos os casos, a coloração acastanhada, no citoplasma, será adotada como padrão para positividade da imunorreação (LI et al., 2015).

## **2.9 Monitoramento genotóxico, de reparo de DNA e mutagênico do DMBA e do EM obtido do *N.gardneri***

### **2.9.1 Avaliação genotóxica, apoptótica e de reparo de DNA em linfócitos de camundongos fêmeas com carcinoma mamário, com o Ensaio Cometa**

A versão alcalina do Ensaio Cometa foi realizada conforme descrito por Speit e Hartmann (2005). Alíquotas de 10 µL de sangue periférico caudal dos camundongos de cada grupo de estudo foram coletadas. Em seguida, foram misturados com uma fina camada de agarose *low melting* 0,75% (90 µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%. Além disso, alíquotas de 10 µL do homogenato dos tecidos fígado, medula óssea e as mamas foram processados conforme supracitado. As lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso), por até 72 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH > 13), por 20 minutos e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0.90 V/cm), por 15 minutos em cuba de eletroforese. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com solução de prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi calculado por meio da fórmula:  $ID = \sum (\text{número de células em determinada classe de dano} \times \text{classe de dano})$ , que variou de 0 a 400; e FD pela seguinte fórmula:  $FD = 100 - \text{n}^\circ \text{ de células classe } 0$ . Para estudo de reparo de danos induzidos pelo DMBA, realizaram-se coletas antes da indução do CM (1ª coleta), na 9ª semana (2ª coleta), 10ª semana (3ª coleta) e 11ª de tratamento com DMBA. Utilizou-se a 11ª semana como dano basal (antes do tratamento com EM e depois procederam-se mais três coletas (12ª, 13ª e 14ª semana) durante a terapia com EM.

### **2.9.2 Avaliação mutagênica por alterações citogenéticas, com o Teste de Micronúcleos**

Para este estudo, colheram-se as amostras de medula óssea dos animais de cada grupo para a preparação das lâminas. O teste de acordo com Moraes e colaboradores (2016). Resumidamente, a medula óssea colhida foi misturada com 0,3 mL de soro fetal bovino e espalhada em lâminas. Os esfregaços foram secos durante 30 minutos à temperatura ambiente e fixados em metanol durante 10 minutos. Em seguida, coraram-se as lâminas com Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0,2 M/L (pH 5.8). Realizou-se a contagem de Micronúcleos em 2000 células por fotomicrografia com aumento de 1000 X.

## 2.10 Análise estatística

A fim de determinar as diferenças entre os tratamentos, dados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão foram comparados por análise de variância (ANOVA), de duas vias, seguido pelo teste de *Tukey* (considerando valores de  $p < 0,05$  significantes), por meio do programa *Graphpad* (*software* intuitivo para a Ciência, San Diego, CA). Realizaram-se todos os estudos em triplicata, a partir de avaliações biológicas independentes.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Análise fitoquímica e identificação de compostos químicos em extrato metanólico obtido do *N. gardneri*.

A investigação fitoquímica preliminar mostrou a presença das seguintes substâncias obtidas de *N. gardneri*: alcaloides, açúcares redutores, proteínas, catequinas, taninos e depsídeos. Entretanto, foi possível isolar e identificar dois metabólitos secundários da classe das amidas por HPLC. Os dados obtidos em RMN para as duas substâncias estão apresentados na **Tabela 1**. Foram isolados as substâncias 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida (**1**), 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (**2**), considerados como majoritários e inéditos.

**Tabela 1.** Compostos isolados do extrato metanólico obtidos do *N. gardneri*. Dados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN de 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida (**1**), 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (**2**) em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Multiplicidade, J em Hz)

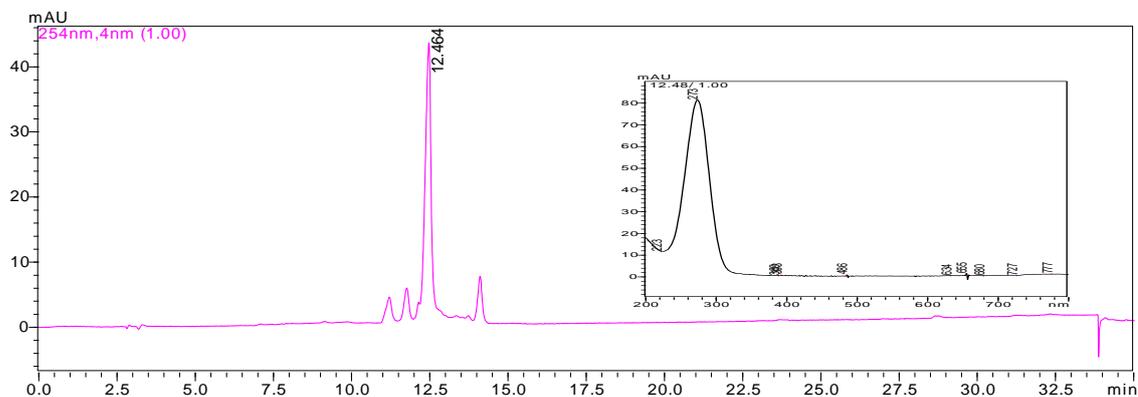
Posição	(1)			(2)		
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC
1	-	176,33		-	176,33	
2	2,29	33,51	C-1/C-4/C-5	2,30	33,59	C-1/C-3/C-4
3	1,38	24,67		1,37	28,81	C-4
4	1,35	28,56		1,62	24,67	C-1/ C-5/ C-6
5	1,62	24,49		1,56	32,02	
6	4,10	74,57		ND	25,24	
7	3,53	73,91		3,52	73,91	
8	2,27	33,60		4,10	74,59	C-7/C-10
9	6,32	143,82	C-6	6,33	143,82	C-11/C-12
10	6,49	129,04		6,51	129,07	C-8/C-11

11	7,29	142,79	C-13	7,30	142,79	C-9/C-13
12	6,21	129,01	C-13/C-10	6,23	129,02	C-13
13	-	202,45		-	202,45	
14	2,63	39,68	C-13/C-15/C-17	2,63	39,86	C-13/C-15/ C-16
15	1,53	23,90		ND	23,86	
16	1,27	29,29		1,32	31,16	
17	1,63	28,55		1,35	22,15	
18	1,36	31,90		0,93	12,89	C-16/C-17
19	1,40	27,83	C-16			
20	1,34	22,35	C-17			
21	0,94	13,02	C-20/C-19/ C-18			

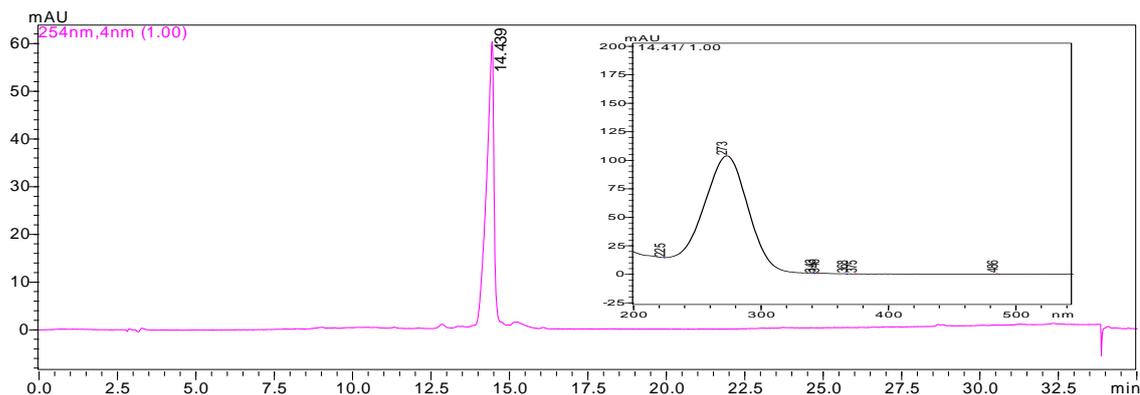
A análise criteriosa e a comparação dos dados de RMN 1H de 2 e 1 indicaram a perda dos sinais em 1,36 (m; 2H,  $\delta_C$  31,90),  $\delta_H$  1,40 (m; 2H,  $\delta_C$  27,83)  $\delta_H$  1,34 (m; 2H,  $\delta_C$  22,35) atribuídos aos hidrogênios metilênicos de H-18, H-19 e H-20. Em vez disso, apareceu o sinal em  $\delta_H$  0,93 (*t*,  $J = 7,2$  Hz, 3H,  $\delta_C$  12,89) de um tripleto atribuído a hidrogênios da metila. A análise dos dados de HRESIMS indicou a presença de um íon  $m/z$  391,000 [ $M+Na^++H^+$ ], correspondente à fórmula  $[C_{21}H_{37}NO_4]Na$ . O espectro de IV mostrou estiramentos em 3445  $cm^{-1}$  correspondentes a grupos hidroxilas, em 1708  $cm^{-1}$  de carbonilas e 2921 e 2852  $cm^{-1}$  corresponde a carbonos  $sp^3$ . Os cromatogramas e espectro UV, obtidos em HPLC-PDA para os compostos isolados presentes no extrato metanólico e fração acetato de etila, estão apresentados na **Figura 1**. O espectro de ultravioleta em  $CH_3OH$  apresentou absorção máxima de 273nm. Foram identificados dois compostos: 7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida (**1**), 7,8-di-hidroxi-13-oxo- octadeca-9,11-dienamida (**2**).

**Figura 1:** Cromatogramas do HPLC-PDA e espectro UV dos compostos **1** (A - 7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida) e composto **2** (B- 7,8-di-hidroxi-13-oxo- octadeca-9,11-dienamida), obtidos dos extratos metanólicos (fração acetato de etila).

**A**



**B**



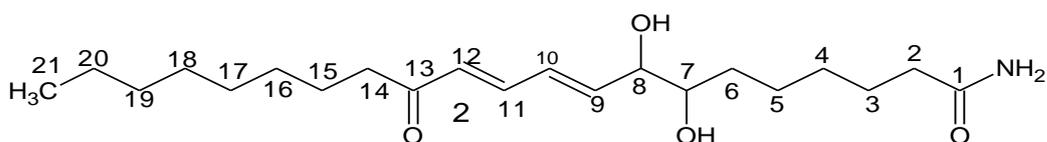
No experimento de *g*HMBC foram observadas as correlações dos hidrogênios H-14 com os carbonos C-13( $\delta_C$  202,45), C-15( $\delta_C$  23,90) e C-17( $\delta_C$  28,55); e hidrogênio H-21 da metila, com os carbonos C-20( $\delta_C$  22,35), C-19( $\delta_C$  27,83) e C-18( $\delta_C$  31,90), o hidrogênio H-19 com o carbono C-16( $\delta_C$  29,29), foi atribuído à correlação do hidrogênio olefínico H-12 com os carbonos C-13 e C-10 ( $\delta_C$  129,04), e H-11 com o carbono C-13, evidenciando que as ligações duplas conjugadas estão alfa carbonila cetônica. Ainda correlações do H-2 com os carbonos C-1( $\delta_C$  176,33), C-4 ( $\delta_C$  28,56), e C-5( $\delta_C$  24,49). A análise do experimento de COSY evidenciou correlações entre os hidrogênios H-10 e H-11 e entre H-11 e H-12 que, associadas com as correlações observadas em *g*HMBC confirmaram a posição das ligações duplas. Através do experimento de TOCSY 1D, pode-se observar um mesmo sistema de *spin*

da molécula entre os hidrogênios H-14, H-15; e H-19, entre os hidrogênios H-9, H-10, H-11 e H-12.

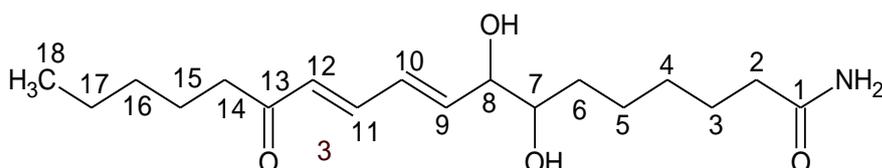
Também foi possível observar interações entre a hidroxila OH-6 com os hidrogênios H-4, H-5 e H-7, permitindo propor para a substância **1** o nome de 7,8-di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida. O espectro de massas de alta resolução ESI (+) no modo positivo do composto **2** apresentou pico para molécula protonada em  $m/z$  327.2162  $[M+2H]^+$ , correspondendo a fórmula molecular  $C_{18}H_{33}NO_4$ , indicando 4 insaturações sugerindo um análogo do composto **1**. O espectro de IV mostrou estiramentos em  $3445\text{ cm}^{-1}$  correspondentes a grupos hidroxilas, em  $1708\text{ cm}^{-1}$  de carbonilas e  $2921$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$  correspondentes a carbonos  $sp^3$ . O espectro de ultravioleta em  $CH_3OH$  apresentou absorção máxima de  $273\text{ nm}$ . A substância **1** ( $6,1\text{ mg}$ ) foi obtida como um óleo amarelo claro e identificada como 7,8 dihidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida (**Figura 2 A**). A análise do experimento de HMBC associado ao experimento de COSY1D e TOCSY 1D permitiu propor a estrutura da substância **2** semelhante a substância **1**, com uma diferença de um grupo propil a menos na estrutura de **2**, indicando para 7,8-di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida (**Figura 2 B**).

**Figura 2** Estrutura química dos compostos isolados do extrato metanólico obtidos do *N. gardneri*. Em **A** composto **1**: 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida. Em **B** o composto **2**: 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida.

**A**



**B**



## 3.2 Avaliação toxicológica

### 3.2.1 Monitoramento hipocrático, comportamental, metabólico e peso de órgãos

Durante a indução do câncer com o DMBA foram observadas alterações apenas no tempo de permanência e número de quedas no teste *Rota Rod* durante a última semana de indução do câncer. A terapia com CPA induziu significativa diminuição do tempo de permanência (TP) e aumento no número de quedas (NQ). Esses dados apontam toxicidade para a terapia com a CPA; entretanto, não foram observadas essas alterações durante a terapia com EM. Não foram observadas alterações em cruzamentos, autolimpezas e levantamentos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Avaliação comportamental e atividade locomotora de camundongos fêmeas, virgens, durante 14 semanas de tratamento com azeite, 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e terapias químicas com ciclofosfamida (CPA) e EM.

Grupos e semanas de tratamento		Parâmetros comportamentais e atividade locomotora				
		Campo aberto			Rota rod	
		Cruzamento	Autolimpeza	Levantamento	TP (s)	NQ
Azeite 10 mg/kg	S 1	83,2 ± 20,6	5,0 ± 2,14	12,0 ± 6,1	180,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2
	S 2	81,0 ± 16,8	14,4 ± 3,0	24,0 ± 7,4	174,4 ± 7,4	1,4 ± 0,8
	S 3	83,6 ± 33,4	11,4 ± 5,1	24,0 ± 19,5	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 4	57,2 ± 9,44	14,0 ± 2,9	16,8 ± 2,1	176,8 ± 7,1	0,0 ± 0,0
	S 5	55,0 ± 14,8	12,6 ± 6,1	12,8 ± 6,2	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 6	52,2 ± 21,4	9,8 ± 4,0	13,6 ± 8,0	180,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	S 7	37,0 ± 26,4	8,4 ± 11,3	9,6 ± 5,5	180,0 ± 0,2	0,0 ± 0,0
	S 8	73,1 ± 15,0	7,7 ± 3,4	23,9 ± 5,4	180,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	S 9	80,0 ± 16,8	12,3 ± 5,2	27,7 ± 7,5	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 10	82,3 ± 31,4	13,0 ± 4,4	22,4 ± 5,5	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 11	56,5 ± 12,0	8,9 ± 2,3	23,6 ± 7,5	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 12	55,0 ± 14,0	9,1 ± 3,5	21,8 ± 4,7	180,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	S 13	55,2 ± 20,1	13,2 ± 5,1	18,5 ± 5,5	180,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	S 14	39,0 ± 27,0	11,2 ± 5,1	14,0 ± 4,5	180,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
DMBA 6 mg/kg	S 1	68,2 ± 23,0	9,6 ± 4,8	20,6 ± 5,9	177,0 ± 17,0	1,4 ± 0,6
	S 2	82,0 ± 30,0	15,8 ± 6,1	27,2 ± 4,6	176,0 ± 6,9	0,4 ± 0,2
	S 3	65,0 ± 14,6	11,2 ± 1,3	19,6 ± 3,43	180,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1
	S 4	76,8 ± 11,3	15,8 ± 7,5	19,4 ± 10,6	176,6 ± 7,6	0,6 ± 0,1
	S 5	76,4 ± 18,9	15,4 ± 13,9	20,4 ± 4,0	174,2 ± 8,1	0,8 ± 0,3
	S 6	62,2 ± 24,3	11,4 ± 4,7	26,6 ± 12,1	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 7	60,8 ± 7,1	14,7 ± 10,3	19,8 ± 7,0	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 8	63,0 ± 5,8	10,3 ± 4,5	23,7 ± 7,3	180,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	S 9	70,5 ± 6,2	12,3 ± 7,0	18,5 ± 5,2	180,0 ± 0,2	0,0 ± 0,0
	S 10	69,4 ± 3,9	13,4 ± 3,7	19,3 ± 4,3	180,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	S 11	80,2 ± 14,0	15,3 ± 5,3	20,3 ± 5,3	165,0 ± 8,0 <sup>a</sup>	1,8 ± 1,5 <sup>a</sup>
CPA 25 mg/kg	S 12	54,6 ± 18,2	18,2 ± 6,2	22,6 ± 5,5	165,0 ± 15,0 <sup>a</sup>	4,3 ± 1,1 <sup>a</sup>
	S 13	78,0 ± 22,3	17,7 ± 4,7	21,8 ± 4,1	164,9 ± 13,5 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,2 <sup>a</sup>
	S 14	68,2 ± 18,3	20,3 ± 9,7	32,0 ± 6,3 <sup>a</sup>	177,7 ± 12,2	1,8 ± 0,1 <sup>a</sup>

EM 10 mg/kg	S 12	68,0 ± 7,3	15,0 ± 4,1	13,0 ± 4,8	176,8 ± 4,3	0,4 ± 0,2
	S 13	68,4 ± 7,3	13,2 ± 6,3	19,6 ± 5,3	175,0 ± 7,1	0,4 ± 0,2
	S 14	67,6 ± 16,4	13,6 ± 5,4	15,2 ± 4,1	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). EM = Extrato metanólico de *N. gardneri*. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. CPA: ciclofosfamida. TP = tempo de permanência. NQ = número de quedas. S: semana de tratamento. ANOVA (duas vias), pós-teste de Tukey. \* p<0,05 comparado ao Azeite, na mesma semana.

Em relação ao perfil metabólico, o EM não induziu alterações nos parâmetros: peso corporal, consumo de ração, de água, micção e defecação, indicando não toxicidade para o EM (Tabela 3).

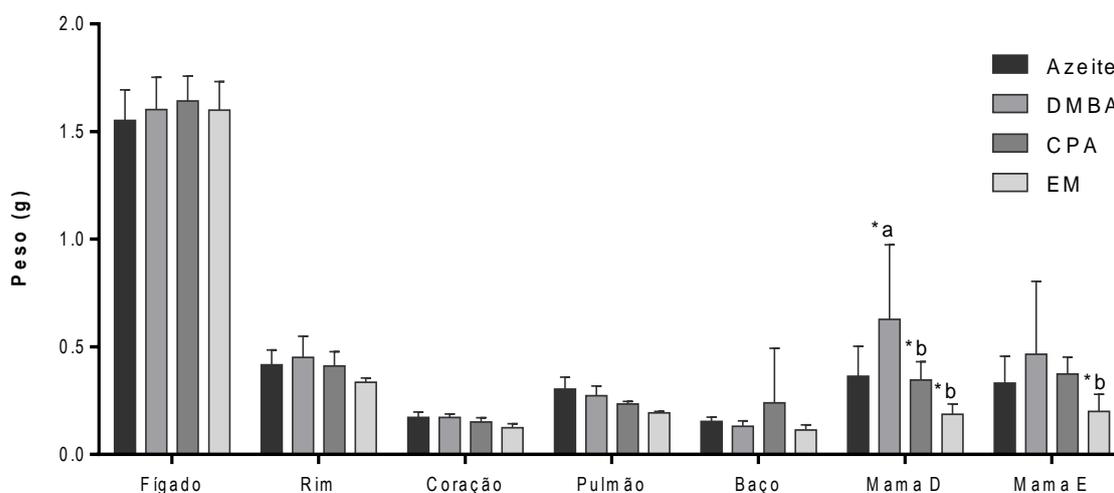
**Tabela 3.** Perfil metabólico durante terapia com extrato metanólico obtido do *N. gardneri* em camundongos *Swiss* fêmeas em três semana. Veículo (azeite de oliva- 10 mg/Kg<sup>-1</sup>). EM (extrato metanólico-10 mg/Kg<sup>-1</sup>). Os valores representam a média ± desvio padrão. Anova *two way* com pós teste de *Tukey's*. \* p<0,05 comparado ao Azeite, na mesma semana

Parâmetros	Grupos - 1ª semana de terapia	
	Veículo	EM 10 mg/kg
Peso corporal (g)	27,55 ± 3,30	27,01 ± 1,01
Consumo de ração (g)	9,41 ± 3,56	11,00 ± 1,12
Consumo de água (mL)	18,92 ± 7,66	23,14 ± 2,55
Micção (mL)	1,85 ± 1,49	1,35 ± 0,90
Defecação (g)	2,83 ± 0,88	2,75 ± 0,65
Parâmetros	Grupos - 2ª semana de terapia	
	Veículo	EM 10 mg/kg
Peso corporal (g)	27,1 ± 3,99	28,6 ± 1,22
Consumo de ração (g)	9,09 ± 2,52	10,01 ± 2,17
Consumo de água (mL)	20,27 ± 7,68	21,84 ± 1,27
Micção (mL)	1,36 ± 0,79	1,47 ± 0,70
Defecação (g)	2,77 ± 1,02	3,09 ± 1,02
Parâmetros	Grupos - 3ª semana de terapia	
	Veículo	EM 10 mg/kg
Peso corporal (g)	26,28 ± 0,45	28,02 ± 1,97
Consumo de ração (g)	12,43 ± 1,58	11,08 ± 2,03
Consumo de água (mL)	23,11 ± 1,45	22,10 ± 3,99
Micção (mL)	1,44 ± 0,59	1,19 ± 0,75
Defecação (g)	3,24 ± 1,23	3,01 ± 1,00

Durante a indução do câncer com DMBA não foram observadas alterações no peso do fígado, rim, coração, pulmão e baço; entretanto, foi observado aumento da mama direita. De

forma similar à CPA e o EM também não aumentaram o peso dos órgãos supracitados. De forma contrária ao DMBA, a terapia com EM diminuiu, significativamente, o tamanho das mamas (**Figura 3**).

**Figura 3.** Efeitos do extrato metanólico (EM) obtido do *N. gardneri* sobre o peso de órgãos de camundongos fêmeas, após 11 semanas de tratamento com DMBA (6 mg/mL) e 3 semanas de terapia com EM (10 mg/mL). Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n = 5); EM: Extrato metanólico de *N. gardneri*. DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno 6 mg/kg. CPA: ciclofosfamida 25 mg/kg. <sup>a</sup>p<0,05 comparado ao Veículo (azeite de oliva), <sup>b</sup>p<0,05 comparado ao grupo DMBA. (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).



### 3.2.2 Perfil hematológico e bioquímico durante e após indução do câncer de mama e terapia com EM

Não foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos nos grupos testados, exceto para plaquetas, durante a indução do câncer com DMBA e terapia com EM. Não foram observadas alterações para ureia e creatinina. Entretanto, alterações bioquímicas foram observadas para TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica), quando comparado ao veículo (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Efeitos do extrato metanólico (EM) de *N. gardneri* no perfil hematológico de camundongos com câncer de mama induzido pelo DMBA.

Perfil Hematológico	Grupos			
	Azeite 10 mg/kg	DMBA 6 mg/kg	CPA 25 mg/kg	EM 10mg/kg
<i>Série vermelha</i>				
HEM (10 <sup>12</sup> /L)	9,80 ± 1,00	9,36 ± 0,14	9,97 ± 0,54	8,21 ± 0,75
HGB (g/dL)	14,70 ± 1,16	16,10 ± 1,47	15,50 ± 1,16	15,30 ± 0,50
HTC (%)	54,20 ± 3,27	54,20 ± 1,49	56,50 ± 2,86	48,60 ± 4,60
VCM (fL)	55,60 ± 4,41	57,90 ± 2,32	56,70 ± 2,97	60,30 ± 8,36
HCM (pg)	15,00 ± 1,09	17,20 ± 1,47	15,60 ± 0,95	16,00 ± 3,00
CHCM (g/dL)	27,10 ± 0,84	29,80 ± 2,60	27,40 ± 0,91	27,50 ± 1,70
<i>Série branca</i>				
Leucócitos (p/mm <sup>3</sup> )	3650,00 ± 1372,60	3327,50 ± 672,30	3398,0 ± 840,70	2840,00 ± 650,90
Neutrófilos (10 <sup>9</sup> /L)	9,87 ± 1,42	11,95 ± 2,40	8,76 ± 2,51	5,70 ± 1,90
Linfócitos (10 <sup>9</sup> /L)	74,30 ± 5,38	78,27 ± 4,43	77,8 ± 4,62	85,70 ± 2,90
Eosinófilos (10 <sup>9</sup> /L)	0,20 ± 0,05	1,50 ± 1,02	0,14 ± 0,05	0,70 ± 0,60
Monócitos (10 <sup>9</sup> /L)	15,20 ± 4,83	7,95 ± 4,10*	12,8 ± 4,21	2,60 ± 1,30
<i>Outros</i>				
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)	1120,10 ± 134,60	811,5 ± 130,55*	1034,00 ± 100,7	731,20 ± 84,08*

Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). EM = Extrato metanólico de *N. gardneri*. DMBA = 7,12-dimetilbenzantracene. CPA: ciclofosfamida. HEM: hemácias; HGB: hemoglobina; HTC: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. ANOVA (duas vias), pós-teste de Tukey. \* p<0,05 comparado ao Azeite.

**Tabela 5.** Efeitos do extrato metanólico (EM) de *N. gardneri* no perfil bioquímico de camundongos com câncer de mama induzido pelo DMBA.

Perfil Bioquímico	Azeite	DMBA	CPA	EM
	10 mg/kg	6 mg/kg	25 mg/kg	10 mg/kg
Ureia (mg/dL)	33,5 ± 9,32	48,7 ± 8,30	36,0 ± 8,71	38,4 ± 11,8
Creatinina (mg/dL)	0,42 ± 0,05	0,47 ± 0,05	0,46 ± 0,05	0,46 ± 0,11
TGO (IU/L)	60,0 ± 7,87	143,0 ± 7,61*	101,6 ± 13,6*	108,6 ± 32,7*
TGP (IU/L)	111,8 ± 24,1	232,5 ± 16,0*	156,6 ± 6,65*	143,0 ± 37,2*

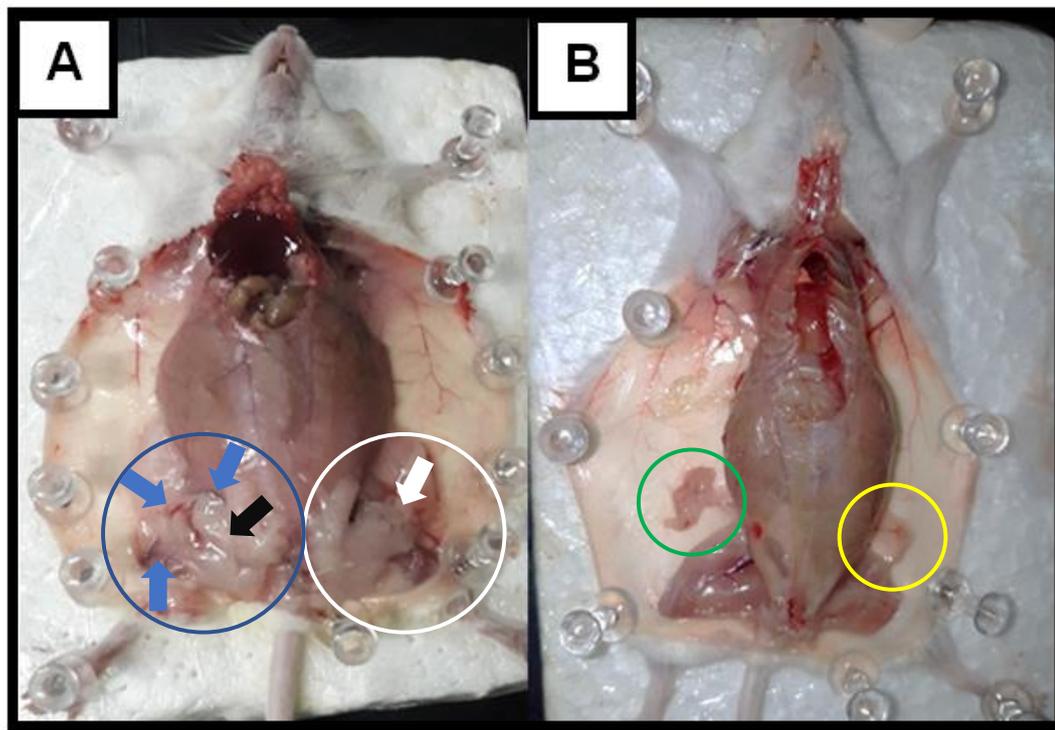
Média ± desvio padrão (n = 5); EM: extrato metanólico de *N. gardneri*; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica. \*p<0,05 comparado ao grupo controle. (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

### 3.3 Análise macroscópica, histopatológica e imuno-histoquímica (Ki-67) em mama de animais tratados com DMBA e terapia com EM

Em análises macroscópicas, a indução do câncer com DMBA aumentou a vascularização das mamas, bem como indução de processo inflamatório e inchaço do tecido mamário (**Figura 4A**). Em contrapartida, a terapia com EM, na dose de 10 mg/Kg<sup>-1</sup>, reduziu,

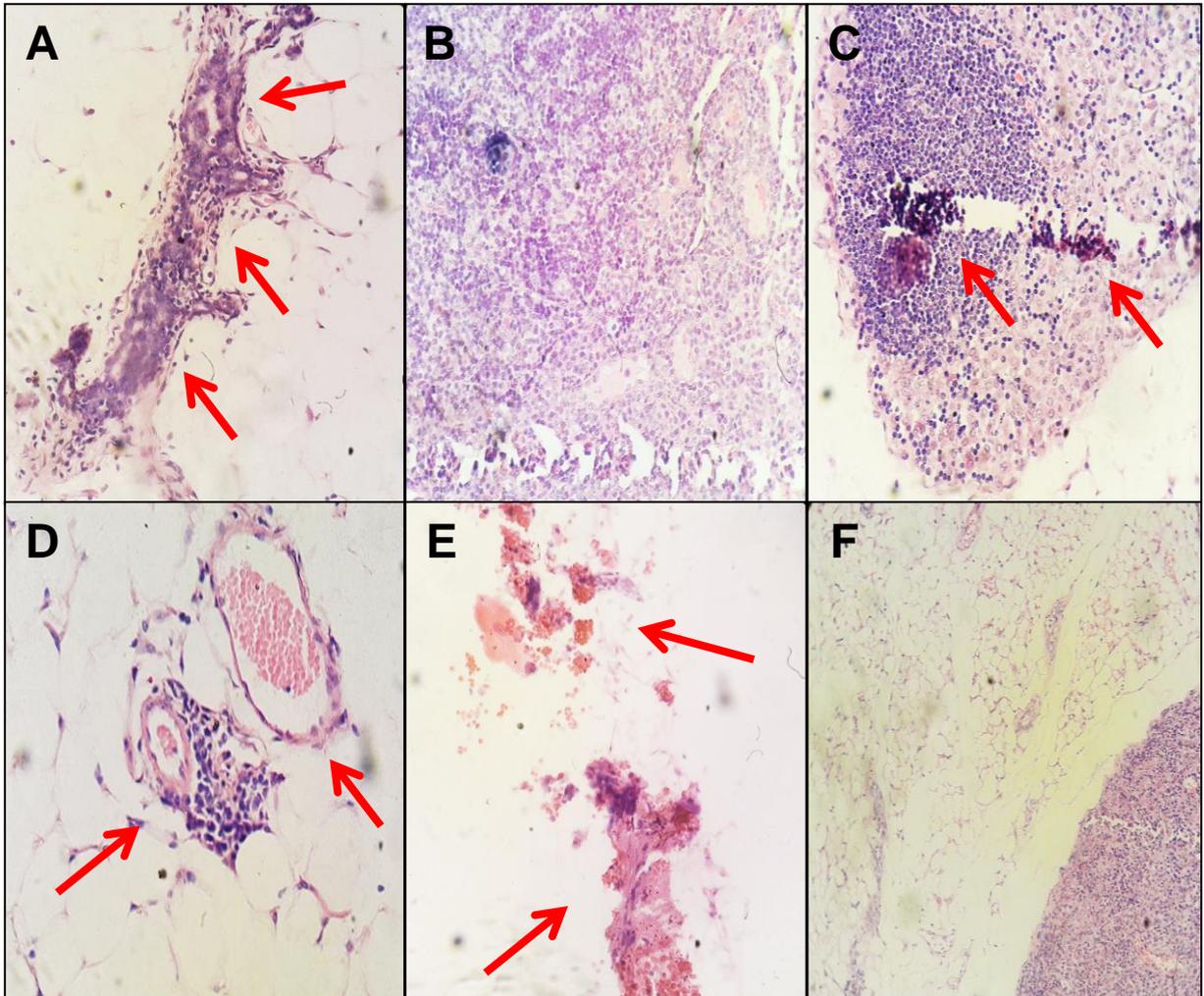
visivelmente, a formação da vascularização, processo inflamatório e inchaço mamário (Figura 4B).

**Figura 4:** Perfil macroscópico das mamas dos animais, após indução do câncer com DMBA. **A:** Tratamento com DMBA. Círculo azul: mama direita. Seta azul: indicação de uma maior vascularização. Seta preta e branca: inchaço mamário. Círculo branco: mama esquerda. **B:** Tratamento com EM, observa-se que houve redução das mamas após tratamento com EM (10 mg/Kg). Círculo verde: Mama direita. Círculo amarelo: Mama esquerda.



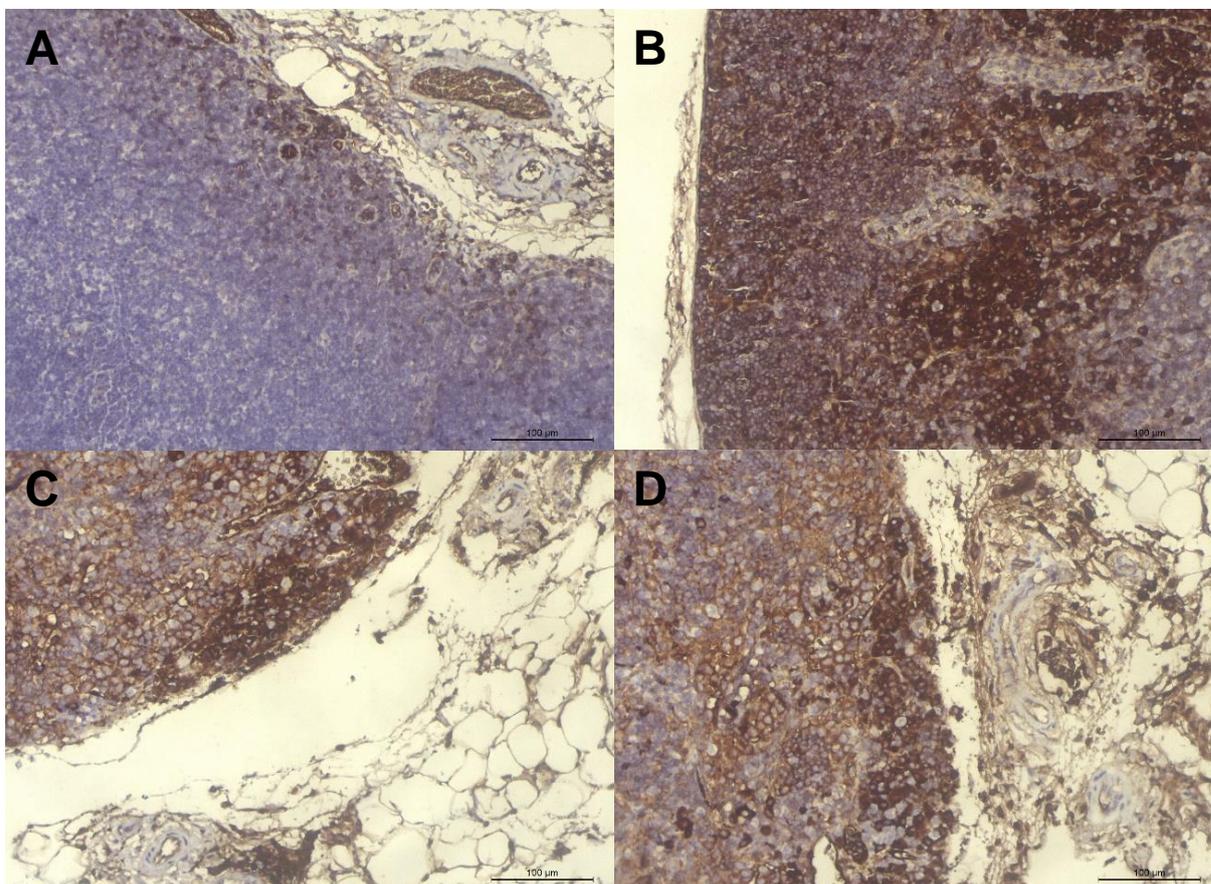
O perfil histopatológico das mamas dos animais tratados com DMBA mostraram presença de ductos não uniformes, basofilia, células ductais atípicas, algumas com alteração do contorno nuclear, condensação cromatínica e hiperplasia ductal atípica. Pôde-se verificar também que havia tecido conjuntivo misturado com a lesão, sugerindo carcinoma ductal invasivo; acompanhado de intensa proliferação celular, congestão vascular e hiperchromatismo nuclear. Por outro lado, nos animais que receberam terapia com EM (10 mg/kg) não foram observadas características histopatológicas de carcinoma, com ausência de áreas de necrose e demais características de malignidade (Figura 5).

**Figura 5.** Perfil histopatológico na mama de camundongos fêmeas, após tratamento com DMBA (A, B e C) e terapia com EM (D, E e F). **A:** hiperplasia ductal atípica; **B:** Tecido conjuntivo misturado com lesão, sugerindo carcinoma invasivo. **C:** congestão vascular e hiperchromatismo nuclear. **D:** hiperplasia ductal usual. **E:** congestão vascular. **F:** padrão tecidual normal. Coloração H&E (aumento de 200X).



Indicativos de proliferação celular também foram evidenciados durante a indução do câncer de mama. Quanto à avaliação imuno-histoquímica pela avaliação do marcador Ki-67 no tecido mamário dos animais, o grupo DMBA induziu expressiva marcação ( $85 \pm 15 \%$ ). O tratamento com EM reduziu a proliferação celular ( $55 \pm 9 \%$ ) em relação ao grupo DMBA (**Figura 6**).

**Figura 6.** Perfil imuno-histoquímico de proliferação celular (Ki-67), analisado em mama de camundongos, após 11 semanas de indução do câncer com DMBA e terapia com EM (10 mg/kg). **A:** controle (Azeite) – leve marcação ( $16 \pm 4\%$ ). **B:** DMBA – expressiva marcação ( $85 \pm 15\%$ ), **C e D:** EM – moderada ( $55 \pm 9\%$ ) marcação. % mensurada pela contagem individual de 400 células (n=3) com citoplasma acastanhado (aumento de 200X).

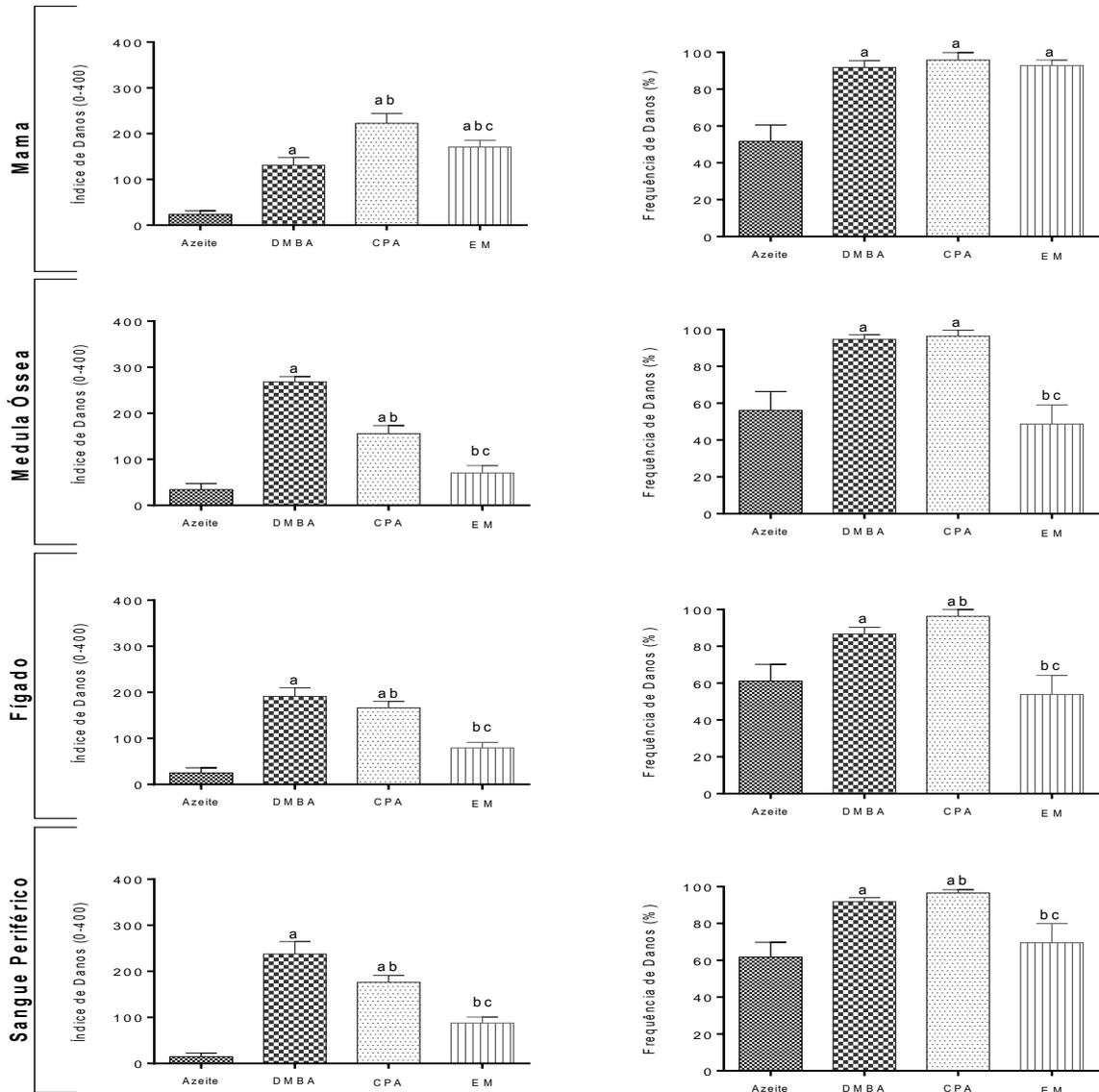


### 3.4 Mecanismos citogenéticos indicativos de ação antitumoral do EM obtido do *N. gardneri* em carcinoma mamário

#### 3.4.1 Efeitos genotóxicos e apoptóticos, e possíveis reparo de danos ao DNA

O EM induziu genotoxicidade em células de carcinoma mamário de camundongos fêmeas, como observado pelos índices e frequência de danos, assim como o DMBA e a CPA. Entretanto, esses danos não foram observados em células não neoplásicas (medula, fígado e rim), de forma contrária, ao DMBA e CPA, quando comparado ao veículo (**Figura 7**).

**Figura 7.** Efeitos antitumorais do extrato metanólico (EM) obtido do *N. gardneri* em mama, medula óssea, fígado e leucócitos de camundongos fêmeas pela indução de genotoxicidade. DMBA (6 mg/kg); EM (10 mg/kg) e CPA (25 mg/kg). Veículo (azeite de oliva). Média  $\pm$  desvio padrão (n=5). <sup>a</sup>p<0,05 comparado ao grupo azeite, <sup>b</sup>p<0,05 comparado ao DMBA e <sup>c</sup>p<0,05 comparado ao CPA (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).



Os danos induzidos pelo DMBA, em linfócitos de sangue periférico, analisados pelo aumento do índice e frequência de danos, não foram reparados, como observado na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana após o tratamento. No entanto, reparo de danos foram observados para os índices e frequências de danos durante terapia com EM (**Tabela 6**).

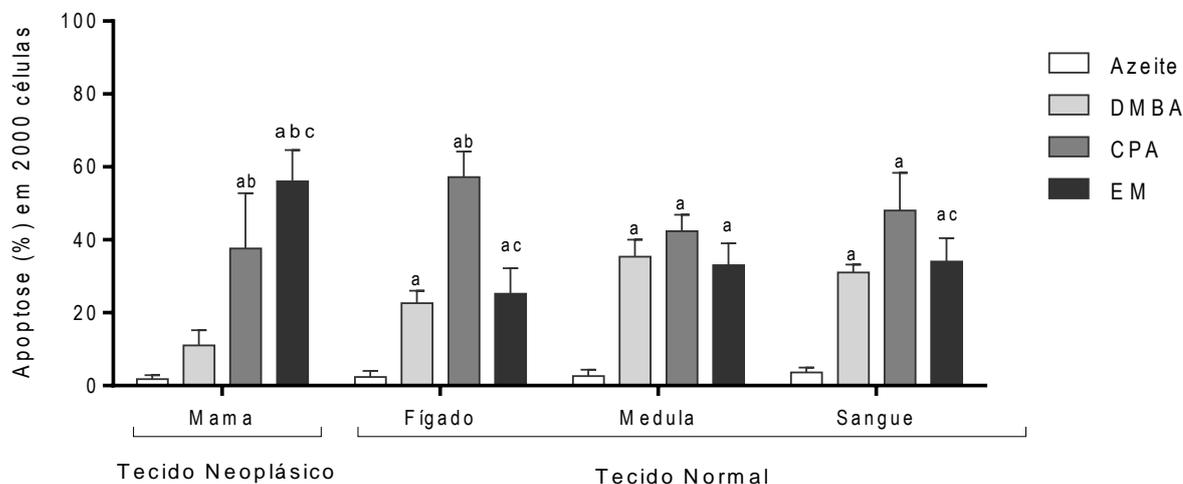
**Tabela 6.** Estudo de reparo de danos ao DNA, em linfócitos de sangue periférico de camundongos fêmeas, durante a indução do câncer de mama com DMBA e terapia com extrato metanólico obtido do *N. gardneri*.

Danos genotóxicos e reparo após semanas de tratamento				
DMBA	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>o</sup>
ID	133,00 ± 5,06	212,80 ± 20,06 <sup>a</sup>	228,60 ± 9,88 <sup>a</sup>	211,20 ± 2,07 <sup>a</sup>
FD	58,80 ± 1,92	68,80 ± 1,09 <sup>a</sup>	85,20 ± 3,83 <sup>ab</sup>	75,80 ± 1,92 <sup>ac</sup>
EM	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>o</sup>
ID	211,2 ± 2,07	60,30 ± 5,50 <sup>a</sup>	102,00 ± 12,20 <sup>a</sup>	89,20 ± 9,00 <sup>a</sup>
FD	75,80 ± 1,92	43,60 ± 6,00 <sup>a</sup>	83,40 ± 7,40 <sup>ab</sup>	82,80 ± 4,00 <sup>b</sup>

Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). EM = Extrato metanólico de *N. gardneri*. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno 6 mg/kg. ID = índice de danos. FD = frequência de danos. ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey's <sup>a</sup> p<0,05 comparado à 1<sup>a</sup> semana. <sup>b</sup> p<0,05 comparado à 2<sup>a</sup> semana. <sup>c</sup> p<0,05 comparado à 3<sup>a</sup> semana.

Todos os tratamentos induziram aumento significativo nos percentuais de apoptose em tecidos neoplásico e não neoplásicos em relação ao grupo azeite, exceto o grupo DMBA no tecido mamário. O EM induziu o aumento no percentual de apoptose, pela dissolução e fragmentação nuclear, em células neoplásicas de mama, quando comparado com os grupos azeite, DMBA e CPA. Em células do fígado e sangue periférico, o EM induziu menor percentual de células apoptóticas em relação ao grupo CPA (Figura 8).

**Figura 8.** Efeitos antitumorais do extrato metanólico (EM) obtido do *N.gardneri* em carcinoma mamário, fígado, medula e linfócitos de sangue periférico por indução de apoptoses. Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). EM (10 mg/kg); DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno (6 mg/kg semanal); CPA (25 mg/kg) = ciclofosfamida. ANOVA (duas vias), pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 comparado ao Azeite, <sup>b</sup> p<0,05 comparado ao DMBA e <sup>c</sup> p<0,05 comparado ao CPA<sup>c</sup>.



### 3.4.2 Efeitos mutagênicos em células do fígado e medula óssea de camundongos fêmeas com carcinoma mamário

O extrato metanólico (EM), obtido do *N.gardneri*, não induziu mutagenicidade pela formação de micronúcleos, pontes e brotos em medula óssea, quando comparado ao veículo, mas o DMBA induziu o aumento dessas alterações citogenéticas.

**Tabela 7.** Efeitos mutagênicos do extrato metanólico (EM), obtido do *N. gardneri*, avaliado pela formação de micronúcleos (MN), pontes (PT) e brotos (BT).

Grupos	Marcadores citogenéticos			
	Medula óssea			
	MN	PT	BT	
<b>Veículo</b>	5,00 ± 1,77	8,80 ± 2,58	9,00 ± 1,99	
<b>DMBA</b>	26,00 ± 2,30 <sup>a</sup>	27,00 ± 2,23 <sup>a</sup>	69,80 ± 11,99 <sup>a</sup>	
<b>EM</b>	8,00 ± 1,63 <sup>b</sup>	10,33 ± 9,07	11,33 ± 17,89	
Grupos	Células do fígado			
	<b>Veículo</b>	4,00 ± 1,77	9,40 ± 2,40	8,60 ± 1,94
	<b>DMBA</b>	22,00 ± 2,64 <sup>a</sup>	26,20 ± 5,35 <sup>a</sup>	25,00 ± 2,91 <sup>a</sup>
	<b>EM</b>	8,00 ± 0,7 <sup>b</sup>	6,00 ± 1,00 <sup>b</sup>	6,33 ± 1,57 <sup>b</sup>

Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). EN = Extrato metanólico de *N. gardneri* na dose de 10 mg/kg; DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno 6 mg/kg. MN: micronúcleos, PT: pontes citoplasmáticas, BT: Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). ANOVA, duas vias, pós-teste de *Tukey*. <sup>a</sup> p<0,05 comparado ao veículo. <sup>b</sup> p<0,05 comparado ao DMBA.

## 4 DISCUSSÃO

Os modelos animais de carcinogênese química são importantes para estudos de agentes antitumorais (HOLLERN; ANDRECHEK, 2014; KEMP, 2015). O 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é um indutor de tumores de mama em animais (WANG, et al., 2013; LIU et al., 2016) que, por ativação metabólica das enzimas citocromo P450 (CVYP1A2 e CYP1A1, CYP1B1), libera o metabólito dihidrodiolepóxido (MACEJOVÁ E BRTKO, 2001; AL-DHAHERI et al., 2008; KERDELHUÉ; FOREST; COUMOUL, 2016; ALVARADO et al., 2017). No estudo, a dose semanal de 6 mg/Kg foi eficiente na indução do carcinoma mamário. Existem relatos de que doses entre 1 a 3 mg/Kg são eficientes para a indução do carcinoma mamário em animais (MEDINA, 2004; OLIVEIRA et al., 2015).

As características histopatológicas analisadas da primeira dupla inferior de mamas, foram compatíveis para carcinoma mamário ductal invasivo. Apresentaram muita proliferação celular, induzida pelo metabólito DMBA, como observado no estudo pela marcação de Ki67 de 85 % de proliferação celular no tecido mamário, em 400 células, induzindo aumento da mama. Cabe relatar que o Ki-67 está expresso em todas as etapas do ciclo celular. Altos percentuais de Ki-67 estão associados com péssimos prognósticos e agressividade dos tumores (WANG et al., 2011; NISHIMURA et al., 2014). Entretanto, a terapia com EM, obtido do *N. gardneri*, na dose de 10 mg/Kg, alterou o perfil histopatológico neoplásico para não malignidade, com redução da marcação do Ki67 e efeitos na redução do peso da mama. Os percentuais de Ki67 foram comparados com o encontrado para o veículo (16 %).

Os dados do monitoramento toxicológico, com aplicação dos testes campo aberto e *Rota Rod* indicaram que durante a indução do câncer (11 semanas), não foram observadas alterações comportamentais motoras, exceto na última semana, com alterações tempo de permanência na chapa e o aumento de quedas ocasionadas pelo DMBA. Dados contraditórios, pois existem relatos de que o DMBA não causa alterações motoras em modelos experimentais (BIAGIONI et al., 2016). Entretanto, por outros parâmetros toxicológicos metabólicos, como estresse e/ou consumo de água (WAN et al., 2015), consumo de alimentos, bem como alterações na excreção de urina e fezes não foram observadas para o DMBA, CPA e EM. Também não foram observadas alterações renais, mas sim alterações hepáticas pelas enzimas hepáticas, TGO e TGP, como relatado para o DMBA (KHYADE, 2017), pois o tecido hepático é o maior sítio de metabolismo do indutor de câncer, com alta produção dos seus metabólitos (GIRAY et al., 2001).

Os biomarcadores citogenéticos são indicadores de efeitos antitumorais, a exemplo dos danos ao DNA, que podem ser avaliados com o Ensaio Cometa (NICOLAE et al., 2015; GUNASEKARANAL, RAJ e CHAND, 2015; ENCISO et al., 2014; GARM et al., 2013) que, na sua versão alcalina, como usada no estudo, detecta quebras de fitas simples e/ou duplas, sítios apurínicos, danos oxidativos e eficácia de reparo (CORTES-GUTIERREZ et al., 2012; DUSINSKA, COLLINS, 2008). O EM, obtido do *N. gardneri*, na dose de 10 mgKg<sup>-1</sup>, induziu genotoxicidade apenas nas células da mama. Os danos do EM em linfócitos foram reparados. De forma contrária, a CPA e o DMBA induziram genotoxicidade em medula óssea, fígado e linfócitos de sangue periférico. Estudos relatam que a capacidade carcinogênica do DMBA pode ser associada a mecanismos indutores de danos ao DNA

(SZAEFER et al., 2014; HAN et al., 2007; OZDEMIR et al., 2007), pela formação de aductos, quebras, ligações cruzadas e aberrações cromossômicas (EMMA et al., 2012).

No presente estudo foram isoladas, identificadas e caracterizadas duas amidas substituídas, os compostos inéditos 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida e 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida considerados como majoritários no EM, e que possivelmente podem ter atividades antitumorais. Ainda não existem estudos com esses compostos; entretanto, as amidas substituídas induzem citotoxicidade e propriedades antitumorais, como observado em ratos com tumores cerebrais (HUA et al., 2012) e em células MCF7 (câncer de mama) e HCT116 (câncer de colorretal), com menos citotoxicidade do que o tamoxifeno e 5-fluorouracil (YDAV et al., 2018), como também evidenciado em adenocarcinoma de mama MCF-7, devido citotoxicidade de titanoceníl (GAO; ENRIQUE MEL'ENDEZ, 2010).

Cabe também discutir que o EM pode, possivelmente, apresentar mecanismos de estresse oxidativos ao DNA, pois a emissão de bioluminescência do *N. gardneri* ocorre por processos de oxidação da luciferina por meio de sua catalização pela luciferase, onde a luciferina libera a oxiluciferina (BONDAR et al., 2013; KASKOVA et al., 2017; MOGIL'NAYA; RONZHIN; BONDAR, 2018), devido à produção de peróxido de hidrogênio (PURTOV et al., 2015), com defesas antioxidantes observadas pela ação das enzimas peroxidases e catalases (MOGIL'NAYA et al., 2015). Atividades citotóxicas foram atribuídas à espécie *Neonothopanus nambi* em células de câncer de pulmão (NCI-H1870) e de câncer de mama (BC1 e MCF-2) (KANOKMEDHAKUL et al., 2012). Os mecanismos oxidativos também estão envolvidos na ação antitumoral da CPA (JOHANNESSEN; NILSEN; LØVIK, 2007, KUMAR et al., 2014), como também as mutações genéticas e aberrações cromossômicas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; BOUSLIMI et al., 2008; CHANG et al., 2011).

As anormalidades nucleares são importantes para o entendimento dos mecanismos da tumorigênese (GRADE, 2015). O EM, obtido de *N. gardneri*, induziu mutagenicidade em células do fígado pela formação de micronúcleos. Entretanto, essas alterações podem ainda ser oriundas dos mecanismos de indução do câncer de mama, pois o DMBA induziu a formação de micronúcleos, pontes e brotos, em medula óssea e fígado. Esses dados corroboram com estudos que apontam o DMBA como indutor de instabilidade genética (MEDINA, 2004; LIU et al., 2015), incluindo a formação de micronúcleos (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; RATTNER, J.; BATHE, 2017), por mecanismos clastogênicos e/ou

aneugênicos atribuídos ao metabólito dihidrodiolepóxido (carcinógeno) (BASKARAN et al., 2010; ALVARADO et al., 2017; XUE et al., 2017). Os micronúcleos são ocasionados por falhas de citocineses no final da divisão celular; e os brotos, por eliminação, amplificação e reparos de DNA (SABHARWAL et al., 2015) que formam corpos extranucleares. Entretanto, pode ser ocasionado por quebras, indicando clastogenia; e por perda de cromossomos para agentes aneugênicos (FENECH et al., 2011. FERREIRA et al., 2009(a)) que induzem fragmentos de cromátides ou cromossomos acêntricos que são excluídos após as mitoses (FENECH, 2002; NERSESYAN et al., 2014; FENECH et al., 2016; TOUAHRI et al., 2016).

Ainda não existem relatos de estudos com isolados do EM obtido do *N. gardneri*, e seus efeitos antitumorais, especialmente com efeitos em câncer de mama. Mas, nesse estudo, o EM, obtido de *N. gardneri*, teve efeitos antitumorais em carcinoma mamário, não somente por indução de danos ao DNA e alterações citogenéticas, como também por indução de apoptoses em células do carcinoma mamário, no fígado, medula e em linfócitos de sangue periférico, como observado nos dados do Ensaio Cometa também para a CPA e DMBA. Na espécie *N. nambi*, mesmo gênero do *N. gardneri*, estudos apontam citotoxicidade em linhagens celulares de câncer NCI-H187 e de colangiocarcinoma atribuída aos isolados compostos nambinona C, aurisina A e aurisina K (KANOKMEDHAKUL et al., 2012).

Cabe enfatizar que os compostos inéditos isolados do EM podem, possivelmente, apresentar propriedades antitumorais. Proteínas obtidas de espécies do filo *Basidiomycota*, apresentaram efeitos antitumorais por indução de apoptoses, parada do ciclo celular (WANG et al., 2015), por regulação negativa de ciclinas B e E, regulação positiva de p53 e PARP (ZHANG et al., 2014; WANG et al., 2017; YUAN et al., 2017) e expressão de BAX/BC12 (LI et al., 2018), por inibição de polimerização de tubulinas, a exemplo das derivadas do ácido (E) -4-aryl-4-oxo-2-butenóico, como observado em tumores humanos (HeLa, FemX e K562) (VITOROVIĆ-TODOROVIĆA et al., 2013), por alterações em microtúbulos são fontes para ações antitumorais, a exemplo das amidas (ISLAM; ISKANDER, 2004) e aumento dos níveis de ERO's, aumento da expressão de p53, BC12 e clivagem de PARP e liberação de Citocromo C (AL-KHAYAL1 et al., 2017).

As amidas 5-nitrofurano-2-amida induzem apoptoses por ativação de moléculas da expressão de CHOP em câncer de mama triplo negativo (DUAN et al., 2015). Ainda em câncer de mama, as proteínas obtidas de *P. nameko* têm efeitos antitumorais em cultura de células MCF7 por indução de alterações morfológicas apoptóticas, como condensação da cromatina, acúmulo na fase G1 e alteração da permeabilidade mitocondrial, perda de

potencial de membrana mitocondrial que resultou na liberação de Citocromo C, ativação de caspase-9 e caspase-3 (ZHANG et al., 2014). Existem diversos estudos com células tumorais de mama, a exemplo da MCF atribuídos a outros compostos químicos (ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2014; NOVAKOVIC et al., 2017). Cabe enfatizar que as análises fitoquímicas do EM obtido do *N. gardneri*, além das proteínas, também sugeriu a presença de outros compostos químicos que também são considerados como antitumorais, a exemplo dos alcaloides, açúcares redutores, catequinas, taninos e depsídeos.

Os polissacarídeos, obtidos da *Lentinula edodes* nas doses de 5, 10 ou 20 mg / Kg, também apresentaram citotoxicidade células MCF-7 pelo aumento da expressão de de caspase 7 e da relação BAX/BCL2 (LI et al., 2018). Na espécie *Cerrena unicolor*, as subfrações de baixo peso molecular III exibiram a atividade inibitória em relação às células de carcinoma de mama MDA-MB-231, células de carcinoma prostático PC3 e células de câncer de mama MCF7 (MATUSZEWSKA et al., 2018). Ainda em adenocarcinoma de mama (MCF-7), os metabólitos da *Cerrena unicolor* inibiram proliferação celular em câncer humano MCF7, MDA-MB-231 e PC3. (MATUSZEWSKA et al., 2018). Assim, os compostos presentes no EM, obtidos do *N. gardneri*, a exemplo das amidas substituídas isoladas, de proteínas e de açúcares podem, possivelmente, ter efeitos antitumorais, a exemplo da toxicidade de metabólicos secundários oriundos de várias espécies de *Basidiomycota* de importância para fármacos, especialmente antitumorais (BUA-ART et al., 2010; BUA-ART et al., 2011; BURAKORN et al., 2015).

## 5 CONCLUSÃO

Análise fitoquímica do extrato metanólico (EM), obtido do *N. gardneri*, indicou sua complexidade química, com a presença de açúcares, taninos, depsídeos, catequinas e proteínas. Entretanto, por ressonância magnética e cromatografia líquida foram isoladas duas inéditas amidas substituídas, o composto **1**: 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida e o composto **2**: 7,8 di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida. O modelo animal de indução de carcinoma mamário ductal invasivo, com o DMBA, teve eficácia no estudo dos efeitos antitumorais de EM, na dose de 10 mg/Kg, caracterizados por mecanismos associados a danos ao DNA, possivelmente por estresse oxidativos compatíveis com o processo de bioluminescência, que culminaram com as apoptoses. Em tecidos não neoplásicos o EM não induziu a formação de alterações citogenéticas. Também não induziu alterações comportamentais, alterações renais, mas sim alterações hepáticas. Os efeitos antitumorais

podem ser atribuídos aos constituintes químicos do EM que apresentam relatos como antitumorais, especialmente para o câncer de mama, com menos toxicidade do que o carcinógeno DMBA e do antineoplásico ciclofosfamida. Entretanto, estudos de efeitos antitumorais devem ser feitos com as amidas isoladas, que apontam como fontes naturais para formulações farmacêuticas, considerando que os basidiomicotas são fontes de compostos considerados como antibióticos naturais, antioxidantes e, especialmente, como antitumorais.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-ZAHER, A. M.; ELDEIB, A. M. Breast cancer classification using deep belief networks. **Expert Systems with Applications**, v. 46, p. 139-144, 2016.
- ADÃO, R.; DE KEULENAER, G.; LEITE-MOREIRA, A.; BRÁS-SILVA, C. Cardiotoxicity associated with cancer therapy: pathophysiology and prevention strategies. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 32, n. 5, p. 395-409, 2013.
- AL-DHAHERI, W. S., HASSOUNA, I., AL-SALAM, S., & KARAM, S. M. Characterization of breast cancer progression in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1138, n. 1, p. 121-131, 2008.
- AL-KHAYAL, K., ALAFEIFY, A., VAALI-MOHAMMED, M. A., et al. Novel derivative of aminobenzenesulfonamide (3c) induces apoptosis in colorectal cancer cells through ROS generation and inhibits cell migration. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 4, 2017.
- ALVARADO, A.; FAUSTINO-ROCHA, A. I.; COLAÇO, B.; OLIVEIRA, P. A. Experimental mammary carcinogenesis – Rat models. **Life Sciences**, *In Press*, 2017.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.
- ARRARAS, J. I.; MANTEROLA, A.; ASIN, G.; ILLARRAMENDI, J. J.; CRUZ, S.; IBAÑEZ, B.; VERA, R. Quality of life in elderly patients with localized breast cancer treated with radiotherapy: A prospective study. **The Breast**, v. 26, p. 46-53, 2016.
- BAIRI, K.E.; OUZIR, M.; AGNIESZKA, N.; KHALKI, L. Anticancer potential of *Trigonella foenum graecum*: cellular and molecular targets. **Biomed Pharmacother** 90:479–491, 2017.
- BARBOSA, W. L. R., QUINARD, E., TAVARES, I. C. C., PINTO, L. N., OLIVEIRA, F. Q., & OLIVEIRA, R. M. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. Edição revisada, Belém, 2001.
- BARROS, A. C. S. D.; MURANAKA, E. N. K.; MORI, L. J.; PELIZON, C. H. T.; IRIYA, K.; GIOCONDO, G.; PINOTTI, J. A. Induction of experimental mammary carcinogenesis in

rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. **Revista Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 59, n. 5, p. 257-261, 2004.

BASKARAN, N.; MANOHARAN, S.; BALAKRISHNAN, S.; PUGALENDHI, P. Chemopreventive potential of ferulic acid in 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 637, p. 22-29, 2010.

BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; NETO, A.G.F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Livraria Editora Ltda; 1976.

BIAGIONI, A. F.; ANJOS-GARCIA, T. D.; ULLAH, F. et al. Neuroethological validation of an experimental apparatus to evaluate oriented and non-oriented escape behaviours: comparison between the polygonal arena with a burrow and the circular enclosure of an open-field test. **Behav Brain Res**, v. 298, p. 65–77, 2016.

BONDAR, V. S.; RODICHEVA, E. K.; MEDVEDEVA, S. E.; et al. On the mechanism of luminescence of the fungus *Neonothopanus nambi*. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 449, n. 1, p.80-83, 2013.

BOUSLIMI, A.; OUANNES, Z.; GOLLI, E. E.; et al. Citotoxicity and Oxidative Damage in Kidney Cells Exposed to the *Mycotoxins Ochratoxin A* and Citrinin: Individual and Combined Effects. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 18, p. 341 – 349, 2008.

BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; KAEN, K.; HIRANSALEE, A.; KANOKMEDHAKUL, S. Effect of bioactive compound from luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi* Sp.) on Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood) and Non-Target organism. **KKU Research Journal**, v.16, p.331-334, 2011.

BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; KANOKMEDHAKUL, S.; HIRANSALEE, A.; LEKPHROM, R. Extraction of bioactive compounds from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi* and its effect on Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*). **KKU Research Journal**, v.15, p.726-37, 2010.

BURAKORN, J.; NGUEYN, T. B.; PRAPHRUET, R. Biological activities of a Thai luminescent mushroom. **Walailak Journal of Science and Technology**, v.12, p.505-514, 2015.

CAPELARI, M.; DESJARDIN, D.E.; PERRY, B.A.; ASAI, T.; STEVANI, C.V. *Neonothopanus gardneri*: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. **Mycologia**. v.103, p.1433–40. 2011.

CHANG, C.H.; YU, F.Y.; WU, T.S.; WANG, L.T.; LIU, B.H. Mycotoxin Citrinin Induced Cell Cycle G2/M Arrest and Numerical Chromosomal Aberration Associated with Disruption of Microtubule Formation in Human Cells. **Toxicological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 84 – 92, 2011.

COLLINS, J.J.; JAMMER, B.; SLADDECZEK, F.M.; BODNAR, C.M.; SALOMON, S.S. Surveillance for angiosarcoma of the liver among vinyl chloride workers. **Journal of Occupational & Environmental Medicine**, v. 56, n.11, pp. 1207-1209, 2014.

COMER, E. J. H. The agaric genera *Lentinus*, *Panus* and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species. **Beihfte zur Nova Hedwigia**, v. 69, p. 1-169, 1981.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I., HERNÁNDEZ-GARZA, F., GARCÍA-PÉREZ, J. O., DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. I., AGUADO-BARRERA, M. E., & CERDA-FLORES, R. M. of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

DONEPUDI, M. S.; KONDAPALLI, K.; AMOS, S. J.; VENKANTESHAN, P. Breast cancer statistics and markers. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 506, 2014.

DUAN, H., LI, Y., LIM, H. Y., & WANG, W. Identification of 5-nitrofur-2-amide derivatives that induce apoptosis in triple negative breast cancer cells by activating C/EBP-homologous protein expression. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 15, p. 4514-4521, 2015.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 191-205, 2008.

ELGENGAIHI, S.; MOSSA, A.T.; REFAIE, A.A.; ABOUBAKER, D. Hepatoprotective Efficacy of *Cichorium intybus* L. Extract Against Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage in Rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 13, n. 5, p. 570-84, 2016.

ENCISO, J. M., SÁNCHEZ, O., LÓPEZ DE CERAIN, A., & AZQUETA, A. Does the duration of lysis affect the sensitivity of the in vitro alkaline comet assay?. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 21-28, 2014.

FASCINA, T. Estimativa. Incidência de Câncer no Brasil.(Resenha). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 1, p. 63, 2014.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-32, 2011.

FENECH, M.; KNASMUELLER, S.; BOLOGNESI, C.; et al. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. **Mutation Research**, v. 770, n. (Pt A), p. 12-25, 2016.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug discovery today**, v. 7, n. 22, p. 1128-1137, 2002.

FERREIRA, F. L. S.; PRÁ, D.; MARTINO-ROTH, M. G.; GARCÍAS, G. L. Buccal micronucleus frequency in associated with age in Down syndrome. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1231-1237, 2009 (a).

FERREIRA, I.C.; BARROS, L.; ABREU, R. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p.1543-1560, 2009 (b).

FINIMUNDY, T.C.; ABREU, R.M.V.; BONETTO, N.; et al. Apoptosis induction by Pleurotus sajor-caju (Fr.) Singer extracts on colorectal cancer cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v.112, p. 383-392, 2018.

GANESAN, S.; BHATTACHARYA, P.; KEATING, A. F. 7, 12-Dimethylbenz [a] anthracene exposure induces the DNA repair response in neonatal rat ovaries. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 3, p. 690-696, 2013.

GAO, L.M.; MELÉNDEZ, E. Cytotoxic properties of titanocenyl amides on breast cancer cell line MCF-7. **Metal-based drugs**, v., 2010.

GARM, C., MORENO-VILLANUEVA, M., BÜRKLE, A., LARSEN, L. A., BOHR, V. A., CHRISTENSEN, K., & STEVNSNER, T. Genetic and environmental influence on DNA strand break repair: a twin study. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 54, n. 6, p. 414-420, 2013.

GIRAY, B.; GÜRBAY, A.; HINCAL, F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. **Toxicology letters**, v. 118, n. 3, p. 139-146, 2001.

GRADE, M.; DIFILIPPANTONIO, M.J.; CAMPS, J. Patterns of Chromosomal Aberrations in Solid Tumors. **Recent Results in Cancer Research**, v. 200, p. 115-42, 2015.

GRUJIČIĆ, D.; RADOVIĆ, M.; ARSENIJEVIĆ, S.; MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ, O. Cytogenetic biomarkers in detection of genotoxic effects of gestagens in peripheral blood lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Medical Genetics**, *In press*, 2016.

GUERREIRO, P. S., FERNANDES, A. S., COSTA, J. G., CASTRO, M., MIRANDA, J. P., & OLIVEIRA, N. G. Differential effects of methoxyamine on doxorubicin cytotoxicity and genotoxicity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 757, n. 2, p. 140-147, 2013.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G.V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. GE01, 2015.

HAN, E. H., HWANG, Y. P., JEONG, T. C., LEE, S. S., SHIN, J. G., & JEONG, H. G. Eugenol inhibit 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced genotoxicity in MCF-7 cells: Bifunctional effects on CYP1 and NAD (P) H: quinone oxidoreductase. **FEBS letters**, v. 581, n. 4, p. 749-756, 2007.

HARVEY, A.L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

HOLLERN, D.P.; ANDRECHEK, E.R. A genomic analysis of mouse models of breast cancer reveals molecular features of mouse models and relationships to human breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 3, p. R59, 2014.

HUA, LV, WANG, F., REDDY, M. R., ZHOU, Q., ZHANG, X., REDDY, E. P., & GALLO, J. M. Screening candidate anticancer drugs for brain tumor chemotherapy: Pharmacokinetic-driven approach for a series of (E)-N-(substituted aryl)-3-(substituted phenyl) propenamide analogues. **Investigational new drugs**, v. 30, n. 6, p. 2263-2273, 2012.

HUANG, D., SHI, X., QIAN, Y., TANG, W., LIU, L., XIANG, N., & NI, Z. Rapid separation of human breast cancer cells from blood using a simple spiral channel device. **Anal Methods**. v. 8, n. 30, p. 5940-5948, 2016.

ISLAM, M.N.; ISKANDER, M.N. Microtubulin binding sites as target for developing anticancer agents. **Mini-Rev Med Chem.**; 4:1077–1104, 2004.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P.A.; SHEU, J.R.; GERALDINE, P. In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Food research international**, v.44, p.851-861, 2011.

JOHANNESSEN, L. N.; NILSEN, A. M.; LØVIK, M. Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. **Toxicology Letters**, v. 168, p. 103-112, 2007.

KANOKMEDHAKUL, S.; LEKPHROM, R.; KANOKMEDHAKUL, K.; et al. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. **Tetrahedron**. v. 68, p.8261- 8266. 2012.

KASKOVA, Z. M.; DÖRR, F.A.; PETUSHKOV, V. N.; et al. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. **Science advances**, v. 3, n. 4, p.1602847, 2017.  
KEMP, C. J. Animal models of chemical carcinogenesis: driving breakthroughs in cancer research for 100 years. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2015, n. 10, p. 865-874, 2015.

KERDELHUÉ, B.; FOREST, C.; COUMOUL, X.. Dimethyl-Benz (a) anthracene: A mammary carcinogen and a neuroendocrine disruptor. **Biochimie open**, v. 3, p. 49-55, 2016.

KHYADE, V.B. Influence of Sibinin on DMBA Induced Hepatotoxicity and Free-Radical Damage in Norwegian Rat, *Rattus norvegicus* (L). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 324-338, 2017.

KUMAR, M.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A.K.; et al. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A- and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Toxicology Industrial Health**, v. 30, p. 90-98, 2014.

LAGUNES-CASTRO, M.L.A; TRIGOS, Á.; LÓPEZ-MONTEON, A.; MENDOZA, G.; RAMOS-LIGONIO, A. Cytotoxic activity and induction of inflammatory mediators of the methanol: chloroform extract of *Fusarium moniliforme*. **Revista iberoamericana de micología**, v. 32, n. 4, p.235-241, 2015.

LI, W.; GUO, L.; BI, X.; MA, J.; ZHENG, S. Immunohistochemistry of p53 and Ki-67 and p53 mutation analysis in renal epithelioid angiomyolipoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 8, p. 9446-9451, 2015.

- LI, W.; WANG, J.; HU, H.; LI, Q.; LIU, Y.; WANG, K. Functional polysaccharide Lentinan suppresses human breast cancer growth via inducing autophagy and caspase-7-mediated apoptosis. **Journal of Functional Foods**, v.45, p.75-85, 2018.
- LIN, Y., YAO, Y., LIU, S., WANG, L., MOORTHY, B., XIONG, D., et al. Role of mammary epithelial and stromal P450 enzymes in the clearance and metabolic activation of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene in mice. **Toxicology letters**, v. 212, n. 2, p. 97-105, 2012.
- LIU, Y.; YIN, T.; FENG, Y. et al., Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative imaging in medicine and surgery**, v. 5, n. 5, p. 708-729, 2015.
- MACEJOVA, D.; BRTKO, J. Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosourea, 7, 12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (minireview). **Endocrine regulations**, v. 35, n. 1, p. 53-60, 2001.
- MACHADO, K. C., OLIVEIRA, G. L. S., MACHADO, K. C., ISLAM, M. T., JUNIOR, A. L. G., DE SOUSA, D. P., & FREITAS, R. M. Anticonvulsant and behavioral effects observed in mice following treatment with an ester derivative of ferulic acid: Isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 273-279, 2015.
- MATUSZEWSKA, A.; JASZEK, M.; STEFANIUK, D.; et al., Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. **Plos one** v.13, p.1-14, 2018.
- MEDINA, D. Breast cancer: The protective effect of pregnancy. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 380-384, 2004.
- MEI, Y.; ZHU, H.; HU, Q.; LIU, Y.; ZHAO, S.; PENG, N. A novel polysaccharide from mycelia of cultured *Phellinus linteus* displays antitumor activity through apoptosis. **Carbohydrate Polymers**. v.124, p.90–97, 2015.
- MOGIL'NAYA, O. A.; RONZHIN, N. O.; BONDAR, V. S. Extracellular Peroxidase Activity and Light Emission of the Mycelium of the Basidiomycete *Neonothopanus nambi* in the Presence of  $\beta$ -Glucosidase. **Biophysics**, v.63, p.93-99, 2018.
- MOGIL'NAYA, O. A.; RONZHIN, N. O.; MEDVEDEVA, S.E.; BONDAR, V. S. Total Peroxidase and Catalase Activity of Luminous Basidiomycetes *Armillaria borealis* and *Neonothopanus nambi* in Comparison with the Level of Light Emission. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, p. 395-401, 2015.
- MORAES, G.P.; ALENCAR, M.V.O.B.; ISLAM, M.T.; et al., Cytogenotoxic and oxidative status evaluation of *Morinda citrifolia*. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-13, 2016.
- MUNDHE, N. A., KUMAR, P., AHMED, S., JAMDAD, V., MUNDHE, S., & LAHKAR, M. Nordihydroguaiaretic acid ameliorates cisplatin induced nephrotoxicity and potentiates its anti-tumor activity in DMBA induced breast cancer in female Sprague–Dawley rats. **International immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 634-642, 2015.

NASCIMENTO, F. R., MOURA, T. A., BAETA, J. V., PUBLIO, B. C., et al. New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA. **Biophysical chemistry**, v. 239, p. 1-6, 2018.

NERSESYAN, A., FENECH, M., BOLOGNESI, C., MIŠÍK, M., SETAYESH, T., et al. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 1-11, 2016.

NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; FENECH, M.; BOLOGNESI, C.; MISIK, M.; WULTSCH, G.; HARTMANN, M.; KNASMUELLER, S. Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): a review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 762, p. 7-51, 2014.

NICOLAE, C. M., AHO, E. R., CHOE, K. N., CONSTANTIN, D., et al. A novel role for the mono-ADP-ribosyltransferase PARP14/ARTD8 in promoting homologous recombination and protecting against replication stress. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 6, p. 3143-3153, 2015.

NISHIMURA, R.; OSAKO, T.; NISHIYAMA, Y.; et al. Prognostic significance of Ki-67 index value at the primary breast tumor in recurrent breast cancer. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 2, n. 6, p. 1062-1068, 2014.

NOVAKOVIC, A.; KARAMAN, M.; KAISAREVIC, S.; RADUSIN, T. Antioxidant and Antiproliferative Potential of Fruiting Bodies of the Wild-Growing King Bolete Mushroom, *Boletus edulis* (Agaricomycetes), from Western Serbia. **International journal of medicinal mushrooms**, v.19, p.27-34, 2017.

OLIVEIRA, A. G.; CARVALHOII, R.P.; WALDENMAIERII, H.E.; STEVANI, C.V. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. **Química Nova**. v.36, p. 1-10, 2013.

OLIVEIRA, K.D; AVANZO, G.U.; TEDARDI, M.V. et al. Chemical carcinogenesis by DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene) in female BALB/c mice: new facts. **Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 125-133, 2015.

OZDEMIR, I., SELAMOGLU, Z., ATES, B., GOK, Y., & YILMAZ, I. Modulation of DMBA-induced biochemical changes by organoselenium compounds in blood of rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, Vol 44, 257-259, 2007.

PINTO, W. V. R.; KO, G. M. Teste de rota rod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, p. 202-212, 2011.

PLESZCZYŃSKA, M.; WIATER, A.; SIWULSKI, M. et al. Cultivation and utility of *Piptoporus betulinus* fruiting bodies as a source of anticancer agents. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p.1-9, 2016.

PRATHEESHKUMAR, P., SREEKALA, C., ZHANG, Z., BUDHRAJA, A., et al. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular

targets. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 12, n. 10, p. 1159-1184, 2012.

PURTOV, K. V.; PETUNIN, A. I.; RODICHEVA, E. K.; et al. Components of the luminescent system of the luminous fungus *Neonothopanus nambi*. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v.461, n.1, p. 65-68, 2015.

RATTNER, J.; BATHE, O. F. Monitoring for response to antineoplastic drugs: The potential of a metabolomic approach. **Metabolites**, v. 7, n. 60, p. 1-16, 2017.

REIS, A. P., COSTA, S., SANTOS, I., PATINHA, C., NOACK, Y., et al. Investigating relationships between biomarkers of exposure and environmental copper and manganese levels in house dusts from a Portuguese industrial city. **Environmental geochemistry and health**, v. 37, n. 4, p. 725-744, 2015.

RIM, K.T.; KIM, S.J. A Review on Mutagenicity Testing for Hazard Classification of Chemicals at Work: Focusing on in vivo Micronucleus Test for Allyl Chloride. **Safety and Health at Work**, v. 6, n. 3, p. 184-91, 2015.

SABHARWAL, R.; VERMA, P.; SYED, M. A.; SHARMA, T.; SUBUDHI, S. K.; MOHANTY, S.; GUPTA, S. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. **Indian Journal Medical Paediatric**, v. 36, n. 4, p. 212-218, 2015.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutation Research**, v. 640, n. 1, p. 8-15, 2008.

SHIRMILA, J.G.; RADHAMANY, P.M. Identification and determination of antioxidant constituents of bioluminescent mushroom. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p.386-391, 2012.

SIVANANDHAN, S., KHUSRO, A., PAULRAJ, M., IGNACIMUTHU, S., & AL-DHABI, N. Biocontrol Properties of Basidiomycetes: An Overview. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 2, 2017.

SOUSA, J. M. C.; MATOS, L. A.; ALCÂNTARA, D. F. A.; et al. Cellular responses induced *in vitro* by pesthelic acid, a fungal metabolite, in a gastric adenocarcinoma cell line (PG100). **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4106-4115, 2013.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Molecular Toxicology Protocols**, p. 85-95, 2005.

STORNETTA, A.; ZIMMERMANN, M.; CIMINO, G. D.; HENDERSON, P. T.; STURLA, S. J. DNA Adducts from Anticancer Drugs as Candidate Predictive Markers for Precision Medicine. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 388-409, 2017.

SZAEFER, H., KRAJKA-KUŹNIAK, V., IGNATOWICZ, E., ADAMSKA, T., & BAER-DUBOWSKA, W. Evaluation of the effect of beetroot juice on DMBA-induced damage in liver and mammary gland of female sprague–dawley rats. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 1, p. 55-61, 2014.

TOUAHRI, H. G., BOUTIBA, Z., BENGUEDDA, W., & SHAPOSHNIKOV, S.. Active biomonitoring of mussels *Mytilus galloprovincialis* with integrated use of micronucleus assay and physiological indices to assess harbor pollution. **Marine pollution bulletin**, v. 110, n. 1, p. 52-64, 2016.

VENTURA, F.F.; SILVA, R.T.; STEVANI, C.V. História do Fungo Bioluminescente Flor-de-Coco (*Neonothopanus gardneri*) e Efeitos das Condições de Cultura Sobre a Emissão de Luz. **Revista Virtual de Química**, v. 7, p. 41-55, 2015.

VITOROVIĆ-TODOROVIĆ, M. D., ERIĆ-NIKOLIĆ, A., KOLUNDŽIJA, B., HAMEL, E., RISTIĆ, S., JURANIĆ, I. O., & DRAKULIĆ, B. J. (E)-4-Aryl-4-oxo-2-butenic acid amides, chalcone–aroylacrylic acid chimeras: Design, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization. **European journal of medicinal chemistry**, v. 62, p. 40-50, 2013.

WAN, D., ZHOU, X., XIE, C., SHU, X., WU, X., & YIN, Y. Toxicological evaluation of ferrous N-carbamylglycinate chelate: acute, sub-acute toxicity and mutagenicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 644-651, 2015.

WANG, D., LI, Q., QU, Y., WANG, M., LI, L., LIU, Y., & LI, Y. The investigation of immunomodulatory activities of *Gloeostereum incaratum* polysaccharides in cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. **Experimental and therapeutic medicine**, v.15, p.3633-3638, 2018.

WANG, K.F; SUI, K. Y.; CHENGUO, C.; CHUN-ZHAOLIU, C. Z. Quorum sensing molecule-farnesol increased the production and biological activities of extracellular polysaccharide from *Trametes versicolor*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.104, p.377-383, 2017.

WANG, M. Y., PENG, L., ANDERSON, G., & NOWICKI, D. Breast cancer prevention with *Morinda citrifolia* (noni) at the initiation stage. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 3, n. 6, p. 203-222, 2013.

WANG, T.; GAVIN, H.M.; ARLT, V.M.; et al. Aryl hydrocarbon receptor activation during pregnancy, and in adult nulliparous mice, delays the subsequent development of DMBA-induced mammary tumors. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 7, p. 1509-1523, 2011.

WANG, W. J.; WU, Y. S.; CHEN, S.; LIU, C. F.; CHEN, S. N. Mushroom  $\beta$ -glucan may immunomodulate the tumor-associated macrophages in the Lewis lung carcinoma. **Biomed research international**, 2015.

XUE, M.; JI, X.; XUE, C.; et al. Caspase-dependent and caspase-independent induction of apoptosis in breast cancer by fucoidan via the PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  pathway *in vivo* and *in vitro*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 898-908, 2017.

YADAV, S., LIM, S. M., RAMASAMY, K., VASUDEVAN, M., SHAH, S. A. A., MATHUR, A., & NARASIMHAN, B. Synthesis and evaluation of antimicrobial, antitubercular and anticancer activities of 2-(1-benzoyl-1 H-benzo [d] imidazol-2-ylthio)-N-substituted acetamides. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 66, 2018.

YUAN, B.; MA, N.; ZHAO, L.; et al. In vitro and in vivo inhibitory effects of a *Pleurotus eryngii* protein on colon cancer cells. **Food & function**, v.8, p.3553-3562, 2017

ZERHOUNI, E. **The NIH roadmap**. 302:63–72, 2003.

ZHANG, G.; SUN, J.; WANG, H.; NG, T.B. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula mushroom*. **Phytomedicine**, v.17, p.775-781, 2010.

ZHANG, S., NIE, S., HUANG, D., HUANG, J., FENG, Y., & XIE, M. A polysaccharide from *Ganoderma atrum* inhibits tumor growth by induction of apoptosis and activation of immune response in CT26-bearing mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 38, p. 9296-9304, 2014 (a).

ZHANG, Y., LIU, Z., NG, T. B., CHEN, Z., QIAO, W., & LIU, F. Purification and characterization of a novel antitumor protein with antioxidant and deoxyribonuclease activity from edible mushroom *Pholiota nameko*. **Biochimie**, v.99, p.28-37, 2014 b.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como observado no capítulo de revisão sobre compostos bioativos e propriedades farmacológicas de espécies do filo Basidiomycota, a espécie *Neonothopanus gardneri* aparece com poucas informações sobre seus constituintes químicos e efeitos farmacológicos. Alguns estudos relatam apenas propriedades nutraceuticas e antimicrobianas. Cabe enfatizar que em diversas espécies do filo Basidiomycota, os estudos relativos às atividades antitumorais são, em sua grande maioria, em cultura de células com diversos cânceres, incluindo linhagens para o câncer de mama. O estudo em foco contribuiu para o entendimento de possíveis atividades antitumorais para extratos obtidos do *N. gardneri* em células de Sarcoma 180 e em modelos murino para o câncer de mama pelos seguintes aspectos do estudo:

- ✓ Os extratos metanólicos (EM) e acetato de etila (AE) apresentam fitoquímicos que, em outras espécies do filo Basidiomycota, têm efeitos antitumorais em cultura de células com câncer, tais como os polissacarídeos, alcaloides e proteínas;
- ✓ Duas substâncias foram isoladas do EM: o 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-heneicosa-9,11-dienamida e 7,8 -di-hidroxi-13-oxo-octadeca-9,11-dienamida - caracterizadas como amidas substituídas;
- ✓ O EM e o AE, nas maiores (1500 e 2000 µg/mL) concentrações testadas, apresentaram efeitos oxidativos em *S. cerevisiae*; mas, em concentrações menores (500 e 1000 µg/mL), os efeitos foram de atividades antioxidantes;
- ✓ O EM e o AE apresentaram efeitos citotóxicos pela viabilidade celular em células de Sarcoma 180, especialmente nas maiores concentrações, como também induziram apoptoses, possivelmente associadas a danos ao DNA e a mecanismos citogenéticos, pela formação de micronúcleos, brotos e pontes nucleoplasmáticas;
- ✓ O 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA -6 mg/Kg<sup>-1</sup>v.o) foi eficiente na indução de carcinoma mamário ductal invasivo durante onze semanas, com caracterização histopatológica e pelo Ki67 (marcador de proliferação celular); bem como indução de alterações comportamentais e hepáticas; como também de danos citogenéticos (danos ao DNA, apoptoses e alterações nucleares em mama, fígado, medula óssea e linfócitos de sangue periférico);
- ✓ O EM (10 mg.Kg<sup>-1</sup>) não induziu alterações comportamentais, não alterou o peso do fígado, rins, coração e pulmão nos animais do estudo, porém reduziu o peso da mama

na 14<sup>a</sup> semana em animais tratados com DMBA. Induziu significativamente o aumento dos níveis de apoptose no tecido mamário e redução da expressão do gene Ki-67, indicando redução da proliferação celular no tecido mamário.

- ✓ O EM (10 mg.Kg<sup>-1</sup>), não induziu alterações renais, mas sim hepáticas por marcadores bioquímicos;
- ✓ O EM teve efeitos antitumorais em camundongos fêmeas com carcinoma mamário ductal invasivo por mecanismos associados a danos ao DNA e à indução de apoptoses, possivelmente por danos oxidativos. Não foi observada a indução de mecanismos citogenéticos no tecido mamário, apenas em células hepáticas.
- ✓ O estudo deixa como perspectiva a avaliação antitumoral das substâncias isoladas.

## REFERÊNCIAS

ABBA, M. C.; ZHONG, Y.; LEE, J.; KIL, H.; LU, Y.; TAKATA, Y.; ALDAZ, C. M. DMBA induced mouse mammary tumors display high incidence of activating Pik3caH1047 and loss of function Pten mutations. **Oncotarget**, v.7, n. 39, p. 64289-644299, set, 2016.

ABDALLA, D.S.P.; FAINE, L.A. Radicais livres e antioxidantes. IN: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª edição, São Paulo: Atheneu, 2008, Cap 1, p. 39-58.

ABDEL-ZAHER, A.M; ELDEIB, A.M. Breast cancer classification using deep belief networks. **Expert Systems with Applications**, v.46, p. 139-145, mar, 2016.

ABRAHAM, J.; BALLINGER, R. The emergence of the genetically engineered animal models in carcinogenic risk assessment of pharmaceuticals: a case study of process innovation. **New Genetics and Society**, v. 31, n. 2, p.223-247, 2012.

ABRAMCZYK, H.; BROZEK-PLUSKA, B. New look inside human breast ducts with Raman imaging. Raman candidates as diagnostic markers for breast cancer prognosis: mammaglobin, palmitic acid and sphingomyelin. **Analytica chimica acta**, v. 909, p. 91-100, fev, 2016.

AERTS, J. G.; DE GOEJE, P. L.; CORNELISSEN, R.; KAIJEN-LAMBERS, M. E.; BEZEMER, K.; VAN DER LEEST, C. H.; BRAAKMAN, E. Autologous dendritic cells pulsed with allogeneic tumor cell lysate in mesothelioma: From mouse to human. **Clinical Cancer Research**, v.24, p.766-776, dez, 2017.

AKATA, I.; ERGÖNÜL, B.; KALYONCU, F. Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. **International Journal of Pharmacology**, v. 8, n. 2, p.134-8, 2012.

AKHTAR, M. F.; ASHRAF, M.; ANJUM, A. A.; JAVEED, A.; SHARIF, A.; SALEEM, A.; AKHTAR, B. Textile industrial effluent induces mutagenicity and oxidative DNA damage and exploits oxidative stress biomarkers in rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.41, p.180-186, jan, 2016.

ALAEI-MAHABADI, B.; BHADURY, J.; KARLSSON, J. W.; NILSSON, J. A.; LARSSON, E. Global analysis of somatic structural genomic alterations and their impact on gene expression in diverse human cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.113, n.48, p.13768-73, nov, 2016.

ALEXANDROV, L. B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D. C.; APARICIO, S. A.; BEHJATI, S.; BIANKIN, A. V.; BOYAULT, S. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**. v. 500, n. 7463, p.415-21, 2013.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, p. 869, 1996.

AL-HUSSAINI, H.; HOGG, D.; BLACKSTEIN, M. E.; O'SULLIVAN, B.; CATTON, C. N.; CHUNG, P. W.; FERGUSON, P. C. Clinical features, treatment, and outcome in 102 adult and pediatric patients with localized high-grade synovial sarcoma. **Sarcoma**, v. 2011, 2011.

ALMEIDA, V.L.D.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.118-129, 2005.

AMES, B.N.; LEE, F.D.; DURSTON, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 3, p.782-6, 1973.

AN, Q.; HAN, M. L.; WU, X. J.; SI, J.; CUI, B. K.; DAI, Y. C.; WU, B.. Laccase production among medicinal mushrooms from the *Genus Flammulina* (Agaricomycetes) under different treatments in submerged fermentation. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.18, n.11, p.1049-59, 2016.

ANBUSELVAM, C.; VIJAYAVEL, K.; BALASUBRAMANIAN, M.P. Protective effect of *Operculina turpethum* against 7, 12-dimethyl benz (a) anthracene induced oxidative stress with reference to breast cancer in experimental rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.168, n.3, p. 229-36, jul, 2007.

ANDERSON, K.N.; SCHWAB, R.B.; MARTINEZ, M.E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. **Breast cancer research and treatment**, v.144, n.1, p.1-10, fev, 2014.

ANDOR, N.; MALEY, C. C.; JI, H. P. Genomic instability in cancer: teetering on the limit of tolerance. **Cancer research**, v.77, n.9, p.1-7, abr, 2017.

ARIFI, S.; BELBARAKA, R.; RAHHALI, R.; ISMAILI, N. Treatment of Adult Soft Tissue Sarcomas: An Overview. **Rare Cancers and Therapy**, v.3, n. 1-2, p. 69–87, dez, 2015.

ARRARAS, J. I.; MANTEROLA, A.; ASIN, G.; ILLARRAMENDI, J. J.; DE LA CRUZ, S.; IBAÑEZ, B.; VERA, R. Quality of life in elderly patients with localized breast cancer treated with radiotherapy. A prospective study. **The Breast**, v.26, p.46-53, 2016.

ARROYO-ACEVEDO, J.; CHÁVEZ-ASMAT, R. J.; ANAMPA-GUZMÁN, A.; DONAIRES, R.; RÁEZ-GONZÁLES, J. Protective effect of Piper aduncum capsule on DMBA-induced breast cancer in rats. **Breast cancer: basic and clinical research**, v.9,p. 41-48, 2015.

ASANO, Norihide et al. An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 404, n. 1, p. 149-154, 1998.

ASATRYAN, A.D.; KOMAROVA, N.L. Evolution of genetic instability in heterogeneous tumors. **Journal of theoretical biology**, v.396, p. 1-12, 2016.

AUDEH, M. W.; CARMICHAEL, J.; PENSON, R. T.; FRIEDLANDER, M.; POWELL, B.; BELL-MCGUINN, K. M.; LU, K. Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. **The Lancet**, v.376, n.9737, p.245-51, 2010.

AZIZ, T.; MEHMET, E.D.; NAZIME, A.M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Russula delica* Fr: An edible wild mushroom. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**, v.2, n.1, p.54-67, 2007.

- BACCI, G.; LONGHI, A.; BERTONI, F.; BRICCOLI, A.; VERSARI, M.; PIGNOTTI, E.; PICCI, P. Bone metastases in osteosarcoma patients treated with neoadjuvant or adjuvant chemotherapy: the Rizzoli experience in 52 patients. **Acta Orthopaedica**, v.77, n.6, p. 938–43, 2006.
- BACCI, G.; ROCCA, M.; SALONE, M.; BALLADELLI, A.; FERRARI, S.; PALMERINI, E.; BRICCOLI, A. High grade osteosarcoma of the extremities with lung metastases at presentation: treatment with neoadjuvant chemotherapy and simultaneous resection of primary and metastatic lesions. **Journal Surgical Oncology**, v.98, n.6, p.415-20, 2008.
- BAKHOUM, S. F.; KABECHE, L.; COMPTON, D. A.; POWELL, S. N.; BASTIANS, H. Mitotic DNA Damage Response: At the Crossroads of Structural and Numerical Cancer Chromosome Instabilities. **Trends in cancer**, v.3, n.3, p. 225-34, mar, 2017.
- BALKWILL, F.; CHARLES, K.A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer cell**, v.7, n.3, p.211-17, mar, 2005.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.D.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-43, 2010.
- BARNARD, M.E.; BOEKE, C.E.; TAMIMI, R.M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v.1856, n.1, p.73-85, 2015.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. D. L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.113-23, 2006.
- BARTKOVA, J.; HOŘEJŠÍ, Z.; KOED, K.; KRÄMER, A.; TORT, F.; ZIEGER, K.; ØRNTOFT, T. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**, v.434, n. 7035, p.864–870, abr., 2005.
- BATISTA, R.; SUSEL, E.; GRASS, A. V.; DEL CAMPO AVILÉS, E.; TORRES PÉREZ, L.; FERNÁNDEZ PORTELLES, A. Ciclofosfamida en el tratamiento de la esclerosis sistémica. **Correo científico médico de holguín**, v.19, n.4, p. 1-12, 2015.
- BAUMSTARK-KHAN, C.; HELLWEG, C.E.; REITZ, G. Cytotoxicity and genotoxicity reporter systems based on the use of mammalian cells. In: **Whole Cell Sensing System II**, Springer, Berlin, Heidelberg, p. 113-151, 2010.
- BEANE, J. D.; YANG, J. C.; WHITE, D.; STEINBERG, S. M.; ROSENBERG, S. A.; RUDLOFF, U. Efficacy of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcoma of the extremity: 20-year follow-up of a randomized prospective trial. **Annals of Surgical Oncology**, v. 21, n.8, p. 2484-2489, ago., 2014.
- BEGG, A.C.; STEWART, F.A.; VENS, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. **Nature Reviews Cancer**, v.11, n.4, p.239 - 253, mar., 2011.
- BENAKANAKERE, I.; BESCH-WILLIFORD, C.; CARROLL, C. E.; HYDER, S. M. Synthetic progestins differentially promote or prevent 7,12-DMBA-induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats. **Cancer Prevection Research**, v.3, n.9, p.1157–1167, set., 2010.

- BENASSI-EVANS, B.; FENECH, M. Chronic alcohol exposure induces genome damage measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and aneuploidy in human B lymphoblastoid cell lines. **Mutagenesis**, v.26, n.3, p.421-429, maio, 2011.
- BENAMEUR, L.; AUFFAN, M.; CASSIEN, M.; LIU, W.; CULCASI, M.; RAHMOUNI, H.; STOCKER, P.; TASSISTRO, V.; BOTTERO, J.Y.; ROSE, J.; BOTTA, A. DNA damage and oxidative stress induced by CeO<sub>2</sub> nanoparticles in human dermal fibroblasts: Evidence of a clastogenic effect as a mechanism of genotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 6, p. 696-705, 2015.
- BENTON, G.; DEGRAY, G.; KLEINMAN, H. K.; GEORGE, J.; ARNAOUTOVA, I. In vitro microtumors provide a physiologically predictive tool for breast cancer therapeutic screening. **PloS one**, v.10, n.4, abr, 2015.
- BENTON, G.; ARNAOUTOVA, I.; GEORGE, J.; KLEINMAN, H. K.; KOBLINSKI, J. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.79-80, p.3-18, dez, 2014.
- BERG, N.; DE WEVER, B.; FUCHS, H.W.; GACA, M.; KRUL, C.; ROGGEN, E.L. Toxicology in the 21st century—working our way towards a visionary reality. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 4, p.874-81, 2011.
- BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, v. 75, n.2, p 245-255, 2004.
- BIELACK, S. S.; KEMPF-BIELACK, B.; DELLING, G.; EXNER, G. U.; FLEGE, S.; HELMKE, K.; ZOUBEK, A. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: An analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. **Journal of Clinical Oncology**, v.20, n.3, p. 776–790, 2002.
- BITGEN, N.; DONMEZ-ALTUNTAS, H.; BAYRAM, F.; CAKIR, I.; HAMURCU, Z.; DIRI, H.; DURAK, A. C. Increased micronucleus, nucleoplasmic bridge, nuclear bud frequency and oxidative DNA damage associated with prolactin levels and pituitary adenoma diameters in patients with prolactinoma. **Biotechnic & histochemistry**, v.91, n.2, p.128-136, 2016.
- BIXEL, K.; HAYS, J.L. Olaparib in the management of ovarian cancer. **Pharmacogenomics personalized medicine**, v.8, p.127-135, ago, 2015.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–438, mar, 2011.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. MARINE NATURAL PRODUCTS. **NATURAL PRODUCT REPORTS**, v.23, P.26-78, 2006.
- BOLOGNESI, C.; HOLLAND, N. The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p.183-203, 2016.
- BONASSI, S.; EL-ZEIN, R.; BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Micronuclei frequency in

peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v.26, n.1, p.93-100, 2011.

BONONI, V.L.R. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulolíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (ed.). **Microbiologia Ambiental**, Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, p. 243 –267, 1997.

BOUFETTAL, H.; NOUN, M.; SAMOUH, N. Breast cancer in young patient in Morocco. **Cancer radiotherapie: journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique**, v.14, n.8, p.698-703, jul, 2010.

BORCHERS, A.T.; KRISHNAMURTHY, A.; KEEN, C.L.; MEYERS, F.J.; GERSHWIN, M.E. The immunobiology of mushrooms. **Experimental biology and medicine**, v. 233, n. 3, p. 259-76, 2008.

BRENNAN, M.F.; ANTONESCU, C.R.; MAKI, R.G. **Management of soft tissue sarcoma**, New York: Springer, p.553, 2013.

BRITTO, A. C.; DE OLIVEIRA, A. C.; HENRIQUES, R. M.; CARDOSO, G. M.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, A. A.; BEZERRA, D. P. In vitro and in vivo antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Medica**, v.78, n.5, p.409-414, 2012.

BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; KANOKMEDHAKUL, S.; HIRANSALEE, A.; LEKPHROM, R. Extraction of Bioactive Compounds from Luminescent Mushroom (*Neonothopanus nambi*) and its Effect on Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*). **Asia-Pacific Journal of Science and Technology**, v.15, n.8, p.726-737, ago, 2010.

BURAKORN, J.; NGUEYN, T. B.; PRAPHRUET, R. Biological activities of a Thai luminescent mushroom. **Walailak Journal of Science and Technololy**, v.12, n.6, p.505-514, 2015.

BURRELL, R. A.; MCCLELLAND, S. E.; ENDESFELDER, D.; GROTH, P.; WELLER, M. C.; SHAIKH, N.; CHEW, S. K. Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. **Nature**, v.494, p.492–496, fev, 2013.

BURRELL, R.A.; SWANTON, C. The evolution of the unstable cancer genome. **Current Opinion Genetics & Development**, v.24, p.61–67, fev., 2014.

BUSWELL, J.A.; CHANG, S.T. Edible Mushrooms: attributes and applications. In: **Genetics and Breeding of Edible Mushroom**, Overseas Publishers Association NV, p. 297-324, 1993.

BÜYÜKAVCU, A.; ALBAYRAK, Y.E.; GÖKER, N. A fuzzy information-based approach for breast cancer risk factors assessment. **Applied Soft Computing**, v.38, p.437-452, jan, 2016.

CADDOO, K. A.; MORRIS, P. G.; COWELL, E. P.; PATIL, S.; HUDIS, C. A.; MCARTHUR, H. L. Adjuvant chemotherapy and trastuzumab is safe and effective in older women with small, node-negative, HER2-positive early-stage breast cancer. **Clinical breast cancer**, v.16, n.6, p.487-493, dez, 2016.

- CAGEL, M.; GROTZ, E.; BERNABEU, E.; MORETTON, M. A.; CHIAPPETTA, D. A. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. **Drug Discovery Today**, v.22, n.2, p.270-281, fev, 2017.
- CAHLON, O.; BRENNAN, M. F.; JIA, X.; QIN, L. X.; SINGER, S.; ALEKTIAR, K. M. A postoperative nomogram for local recurrence risk in extremity soft tissue sarcomas after limb-sparing surgery without adjuvant radiation, **Annals of Surgery**, v. 255, n.2, p. 343-347, fev, 2012.
- CALABRESI, P.; CHABNER, B.A. QUIMIOTERAPIA DA DOENÇAS NEOPLÁSICAS. IN: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (9 Ed.). In: Goodman e Gilman – **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, cap. 24, p. 395-407, 1996.
- CALDECOTT, K.W. DNA single-strand break repair. **Experimental cell research**, v.1, n.329, p. 2-8, 2014.
- CAPELARI, M.; DESJARDIN, D. E.; PERRY, B. A.; ASAI, T.; STEVANI, C. V. *Neonothopanus gardneri*: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. **Mycologia**, v.103, n.6, p.1433–1440, 2011.
- CARDNELL, R.; DIAO, L.; WANG, J.; BEARSS, D.; WARNER, S.; FAN, Y. H.; WILLIAMS, M. D. An epithelial-mesenchymal transition (EMT) gene signature to predict resistance to EGFR inhibition and AXL identification as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, n.15, p. 6011-6011, maio, 2013.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and chemical toxicology**, v.51, p.15-25, jan., 2013.
- CARVALHO, L.F.; SILVA, A.M.F.; CARVALHO, A.A. The use of antioxidant agents for chemotherapy-induced peripheral neuropathy treatment in animal models. **Clinical and Experimental Pharmacology Physiology**, v.44, n.10, p. 971-979, out., 2017.
- CAVALIERI, E.; FRENKEL, K.; LIEHR, J. G.; ROGAN, E.; ROY, D. Chapter 4: Estrogens as endogenous genotoxic agents—DNA adducts and mutations. **Journal of the National Cancer Institute: Monographs**, v.2000, n.27, p.75-94, jul., 2000.
- CECCALDI, R.; RONDINELLI, B.; D'ANDREA, A.D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. **Trends Cell Biololy**, v.26, n.1, p.52–64, jan., 2016.
- CEDERBAUM, A.I.; LU, Y.; WU, D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. **Archives of toxicology**, v.83, n.6, p.519-548, jun., 2009.
- CHA, C.; ANTONESCU, C. R.; QUAN, M. L.; MARU, S.; BRENNAN, M. F. Long-term results with resection of radiation-induced soft tissue sarcomas. **Annals of Surgery**, v. 239, n.6, p. 903-110, jun, 2004.
- CHAJÈS V; ROMIEU I. Nutrition and breast cancer. **Maturitas**, v.77, n.1, p.7-11, jan, 2014.
- CHAKRABORTY, S.; STARK, J. M.; SUN, C. L.; MODI, H.; CHEN, W.; O'CONNOR, T. R.; BHATIA, R. Chronic myelogenous leukemia stem and progenitor cells demonstrate

chromosomal instability related to repeated breakage-fusion-bridge cycles mediated by increased nonhomologous end joining. **Blood**, v.119, n. 26, p. 6187-8197, abr, 2012.

CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n.5, p. 473-476, set, 1996.

CHANG, S.T.; MILES P.G. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. CRC Press. **New York**, p. 451, 2004.

CHANG, S.T.; WASSER, S.P. The Role of Culinary-Medicinal Mushrooms on Human Welfare with a Pyramid Model for Human Health. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, n. 2, p. 95–134, 2012.

CHATTERJEE, M.; JANARTHAN, M.; MANIVANNAN, R.; RANA, A.; CHATTERJEE, M. Combinatorial effect of fish oil (Maxepa) and  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.188, n.1, p.102–110, out., 2010.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and molecular mutagenesis**, v.58, n.5, p.235-263, jun., 2017.

CHAUVEINC, L.; MOSSERI, V.; QUINTANA, E.; DESJARDINS, L.; SCHLIENGER, P.; DOZ, F.; DUTRILLAUX, B. Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. **Ophthalmic Genetics**, v. 22, n.2, pp. 77-88, 2001.

CHEN, H. Y.; LU, H. F.; YANG, J. S.; KUO, S. C.; LO, C.; YANG, M. D.; CHUNG, J. G.. The novel quinolone CHM-1 induces DNA damage and inhibits DNA repair gene expressions in a human osteogenic sarcoma cell line. **Anticancer research**, v.30, n.10, p.4187-4192, out., 2010.

CHEN, Y.L.; CHUEH, F.S.; YANG, J.S.; HSUEH, S.C.; LU, C.C.; CHIANG, J.H.; LEE, C.S. Antitumor effects with apoptotic death in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and suppression of leukemia xenograft tumor growth by irinotecan HCl. **Environmental Toxicology**, v. 30, n.7, p. 803-815, 2015.

CHEN, H. Y.; LU, H. F.; YANG, J. S.; KUO, S. C.; LO, C.; YANG, M. D.; CHUNG, J. G. Increased Intracellular Reactive Oxygen Species Mediates the Anti-Cancer Effects of WZ35 via Activating Mitochondrial Apoptosis Pathway in Prostate Cancer Cells. **The Prostate**, v.77, n.5, p.489-504, abr., 2017.

CHEUNG, P.C.K. The nutritional and health benefits of mushrooms. **Nutritional Bulletin**, v.35, n.4, p.292–299, dez., 2010.

CHEUNG-ONG, K; GIAEVER, G; NISLOW, C. DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. **Chemistry & Biology**, v.20, n. 5, 648-659, maio, 2013.

CHIU, H. W.; TSENG, Y. C.; HSU, Y. H.; LIN, Y. F.; FOO, N. P.; GUO, H. R.; WANG, Y. J. Arsenic trioxide induces programmed cell death through stimulation of ER stress and inhibition of the ubiquitin–proteasome system in human sarcoma cells. **Cancer letters**, v.356, n.2, p.762-772, jan., 2015.

CHOU, A.J.; GELLER, D.S.; GORLICK, R. Therapy for osteosarcoma: where do we go from here? **Pediatric Drugs**, v.10, p.315–27, 2008.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Molecular Cell**, v.40, n.2, p. 179-204, out, 2010.

COINDRE, J. M.; TERRIER, P.; GUILLOU, L.; LE DOUSSAL, V.; COLLIN, F.; RANCHÈRE, D.; N'GUYEN BUI, B. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. **Cancer**, v.91, n 10, p. 1914–1926, mai, 2001.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER et al. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. **The Lancet oncology**, v. 13, n. 11, p. 1141-1151, 2012.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; MORETTI, M. The Comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation Research**, v.759, p.27–39, jan-mar, 2014 (a).

COLLINS, J. J.; JAMMER, B.; SLADECZEK, F. M.; BODNAR, C. M.; SALOMON, S. S. Surveillance for angiosarcoma of the liver among vinyl chloride workers. **Journal of Occupational & Environmental Medicine**, v. 56, n.11, p. 1207-1209, nov, 2014 (b).

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249, 2004.

CONYERS, R.; YOUNG, S.; THOMAS, D.M. Liposarcoma: molecular genetics and therapeutics. **Sarcoma**, v.2011, p.1-13, 2010.

CORMIER, J.N.; et al. Bone and soft tissue sarcoma. In: FEIG, B.W.; BERGER, D.H.; FUHRMAN, G.M. **The MD Anderson surgical oncology handbook**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.322, 2003.

CORMIER, J. N.; POLLOCK, R.E. Soft Tissue Sarcomas. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 54, n.2, p. 94-109, mar-abr, 2004.

COMER, E.J.H. The Agaric *Genera Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus* with Particular Reference to Malaysian Species. **Beihefte zur Nova Hedwigia**, v. 69, p. 1-169, 1981.

CORREDOR, Z.; RODRÍGUEZ-RIBERA, L.; SILVA, I.; DÍAZ, J. M.; BALLARÍN, J.; MARCOS, R.; PASTOR, S. Levels of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients undergoing standard hemodialysis vs on-line hemodiafiltration: A comet assay investigation. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.808, p.1-7, set, 2016.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular aspects of medicine**, v. 22, n. 4-5, p.217-246, 2001.

- COULDREY, C.; MOITRA, J.; VINSON, C.; ANVER, M.; NAGASHIMA, K.; GREEN, J. Adipose tissue: a vital in vivo role in mammary gland development but not differentiation. **Developmental Dynamics**, v.223, n, 4, p.459-468, abr, 2002.
- CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Natural Products as Sources of Anticancer Agents: Current Approaches and Perspectives. In: Natural Products as Source of Molecules with Therapeutic Potential. **Springer, Cham**, 2018. p. 309-331.
- DA SILVA, J. DNA damage induced by occupational and environmental exposure to miscellaneous chemicals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v.770, p.170–182, out-dez, 2016.
- D'ANGELO, S. P.; TAP, W. D.; SCHWARTZ, G. K.; CARVAJAL, R. D. Sarcoma immunotherapy: past approaches and future directions. **Sarcoma**, v.2014, p.1-13, mar, 2014.
- DALTON, R.N. Serum creatinine and glomerular filtration rate: perception and reality. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 08-11, 2011.
- DAVIS, L.; KUTTAN, G. Effect of *Withania somnifera* on DMBA induced carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, n.2-3, p.165-168, maio, 2001.
- DE DEUS MOURA, R., CARVALHO, F.M.; BACCHI, C.E. Breast cancer in very young women: clinicopathological study of 149 patients ≤ 25 years old. **The Breast**, v.24, n.4, p.461-467, ago., 2015.
- DE FORNI, M.; MALET-MARTINO, M. C.; JAILLAIS, P.; SHUBINSKI, R. E.; BACHAUD, J. M.; LEMAIRE, L.; SOULIE, P. Cardiotoxicity of high-dose continuous infusion fluorouracil: a prospective clinical study. **Journal of Clinical Oncology**, v.10, n.11, p.1795-1801, nov., 1992.
- DE LA TORRE-RUIZ, A.M.; PUJOL, N.; SUNDARAN, V. Coping with oxidative stress. The yeast model. **Current drug targets**, v. 16, n. 1, p. 2-12, 2015.
- DE VITA, F.; ROMANO, C.; ORDITURA, M.; GALIZIA, G.; MARTINELLI, E.; LIETO, E.; CATALANO, G. Interleukin-6 serum level correlates with survival in advanced gastrointestinal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v.21, n.1, p.45-52, jan., 2001.
- DETINGER, S.D.; TOROUS, D.K.; HAYASHI, M.;MACGREGOR, J.T. Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p.139-45, 2011.
- DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biol Toxicol**. v.25, n.1, p.5-32, fev., 2009.
- DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Induction of resistance in cucumber plants against *Colletotrichum lagenarium* by applying extracts of basidiocarps from *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p.243-250, 2004.
- DIAZ-PADILLA, I.; ROMERO, N.; AMIR, E.; MATIAS-GUIU, X.; VILAR, E.; MUGGIA, F.; GARCIA-DONAS, J. Mismatch repair status and clinical outcome in endometrial cancer:

a systematic review and meta-analysis. **Critical reviews in oncology/hematology**, v.88, n.1, p.154-167, out., 2013.

DONATI, A.; CASTRO, L.G.M. Efeitos colaterais cutâneos de quimioterapia com taxanos: O ponto de vista do Dermatologista. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.4, p.755-758, 2011.

DURFEE, R.A.; MOHAMMED, M.; LUU, H.H. Review of osteosarcoma and current management. **Rheumatology and Therapy**, v.3,n.2, p.221-243, dez., 2016.

DURU, M.E.; ÇAYAN, G.T. Biologically active terpenoids from mushroom origin: a review. **Records of Natural Products**, v. 9, n.4, p.456-483, 2015.

EALES, K.L.; HOLLINSHEAD, K.E.R.; TENNANT, D.A. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, n. 1, p.e190, 2016.

EARL, H. M.; VALLIER, A. L.; HILLER, L.; FENWICK, N.; YOUNG, J.; IDDAWELA, M.; HOUSTON, S. Effects of the addition of gemcitabine, and paclitaxel-first sequencing, in neoadjuvant sequential epirubicin, cyclophosphamide, and paclitaxel for women with high-risk early breast cancer (Neo-tAnGo): an open-label, 2×2 factorial randomised phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v.15, n.2, p.201-212, fev., 2014.

ECCLES, L.J.; O'NEILL, P.; LOMAX, M.E. Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: Friend or foe? **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.711, n. 1-2, p. 134-141, jun., 2011.

EDWARDS, R.L; LEWIS, D.G. WILSON, D.V .Constituents of the higher fungi. Part I. Hispidin, a new 4-hydroxy-6-styryl-2-pyrone from polyporus hispidus(Bull.) Fr. **Journal of the Chemical Society**, v.1961, p. 4995-5002, 1961.

EICHNER, J.; WRZODEK, C.; RÖMER, M.; ELLINGER-ZIEGELBAUER, H.; ZELL, A. Evaluation of toxicogenomics approaches for assessing the risk of nongenotoxic carcinogenicity in rat liver. **PloS one**, v. 9, n. 5, p.e97678, 2014.

EGUCHI, F.; DULAY, R. M. R.; KALAW, S. P.; YOSHIMOTO, H.; MIYAZAWA, N.; SEYAMA, T.; REYES, R. G. Antihypertensive activities of a Philippine wild edible white rot fungus (*Lentinus sajor-caju*) in spontaneously hypertensive rats as models. **Advances in environmental biology**, p. 74-82, 2014.

ELHAJOUJI, A.; TIBALDI, F.; KIRSCH-VOLDERS, M. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 2, n. 3, p.133-40, 1997.

EL-ZEIN, R.; VRAL, A.; ETZEL, C.J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. **Mutagenesis**, v.26, n. 1, p. 101-6, 2011.

ELLIOTT, N.T.; YUAN, F.A. Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n.1, p.59-74, jan, 2011.

ELLIOTT, P.; KLEINSCHMIDT, I. Angiosarcoma of the liver in Great Britain in proximity to vinyl chloride sites. **Occupational and environmental medicine**, v.54, n.1, p.14-18, 1997.

- ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v.19, n.5, p. 403-10, nov., 1991.
- ENZINGER, F.M.; WEISS, S.W. Malignant tumors of the peripheral nerves. In: **Soft tissue tumors**. 4th ed. St Louis, Missouri: Mosby. p.889-912, 2001.
- ERIKSSON, M. Histology-driven chemotherapy of soft-tissue sarcoma. **Annals of Oncology**, v.21, n.7, p.vii270–vii276, out., 2010.
- ERRANI, C.; LONGHI, A.; ROSSI, G.; RIMONDI, E.; BIAZZO, A.; TOSCANO, A.; BACCI, G. Palliative therapy for osteosarcoma. **Expert Review Anticancer Therapy**, v.11, n.2, p.217-27, 2011.
- ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v.25, n. suppl\_3, p. iii102-iii112, 2014.
- ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 286-298, mar, 2007.
- FACCHINI, J.M.; ALVES, E.P.; AGUILERA, C.; GERN, R.M.M.; SILVEIRA, M.L.L.; WISBECK, E.; FURLAN, S.A. Antitumor activity of Pleurotus ostreatus polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. **International journal of biological macromolecules**, 68, pp.72-77, 2014.
- FAN, L.; PAN, H.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Advances in mushroom research in the last decade. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 303-311, 2006.
- FANG, J.S.; GILLIES, R.D.; GATENBY, R.A. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. **Seminars in cancer biology**, v. 18, n. 5, p. 330-337, out, 2008.
- FARAZI, P.A. Cancer trends and risk factors in Cyprus. **Ecancermedicalsecience**, v.8, p.389, 2014.
- FARBER, E.; CAMERON, R. The sequential analysis of cancer development. **Advances in cancer research**, v. 31, p. 125-226, 1980.
- FATTANEH, A.; DEVILEE, P. WHO classification of tumors: tumors of the breast and female genital organs. **Lyon: IARC**, 2003.
- FEBRIANSAH, R.; DYANINGTYAS, D. P.; NURULITA, N. A.; MEIYANTO, E.; NUGROHO, A. E. Hesperidin as a preventive resistance agent in MCF-7 breast cancer cells line resistance to doxorubicin. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, n.3, p.228-233, mar, 2014.
- FEI, C.; ZHANG, J.; LIN, Y.; WANG, X.; ZHANG, K.; ZHANG, L.; ZHENG, W.; WANG, M.; LI, T.; XIAO, S.; XUE, F. Safety evaluation of a triazine compound nitromezuril by assessing bacterial reverse mutation, sperm abnormalities, micronucleus and chromosomal aberration. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 71, n. 3, p.585-9, 2015.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v.2; n.5, p.1084-104, maio, 2007.

- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p.81-95, 2000.
- FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug discovery today**, v. 7, n. 22, p.1128-37, 2002.
- FENECH, M.; MORLEY, A.A.. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147, n. 1-2, p.29-36, 1985.
- FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.;BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytoxicity and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 605-12, 1999.
- FENECH, M.; KNASMUELLER, S.; BOLOGNESI, C.; BONASSI, S.; HOLLAND, N.; MIGLIORE, L.; PALITTI, F.; NATARAJAN, A.T.; KIRSCH-VOLDERS, M. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 12-25, 2016.
- FERGUSON, L. R.; CHEN, H.; COLLINS, A. R.; CONNELL, M.; DAMIA, G.; DASGUPTA, S.; ASHRAF, S. S. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. **Seminars in cancer biology**, v. 35, p. S5-S24, dez., 2015.
- FERRAIUOLO, M.; VERDUCI, L.; BLANDINO, G.; STRANO, S. Mutant p53 protein and the hippo transducers YAP and TAZ: A critical oncogenic node in human cancers. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 5, p. 961, 2017.
- FERREIRA, I.C.; BARROS, L.; ABREU, R. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 1543-60, 2009.
- FISHER, B.; BROWN, A. M.; DIMITROV, N. V.; POISSON, R.; REDMOND, C.; MARGOLESE, R. G.; KARDINAL, C. G. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. **Journal of Clinical Oncology**, v. 8, n. 9, p.1483-96, set, 1990.
- FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.
- FLETCHER, C.D.M. World Health Organization classification of tumours of soft tissue and bone. 4th ed. **Lyon: IARC Press**, 2013.
- FLEURY, JR.; L.F.F.; SANCHES JR, J.A. Primary cutaneous sarcomas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 3, p. 207-221, jun., 2006.
- FONG, E. L.; WAN, X.; YANG, J.; MORGADO, M.; MIKOS, A. G.; HARRINGTON, D. A.; FARACH-CARSON, M. C. A 3D in vitro model of patient-derived prostate cancer xenograft for controlled interrogation of in vivo tumor-stromal interactions. **Biomaterials**, v.77, p.164-72, jan., 2016.

- FRAJESE, G. V.; BENVENUTO, M.; FANTINI, M.; AMBROSIN, E.; SACCHETTI, P.; MASUELLI, L.; BEI, R. Potassium increases the antitumor effects of ascorbic acid in breast cancer cell lines in vitro. **Oncology letters**, v.11, n.6, p.4224-4234, jun., 2016.
- FREEDMAN, R.A.; PARTRIDGE, A.H. Adjuvant therapies for very young women with early stage breast cancer. **The Breast**, v.20, n.3, p. S146-S149, out., 2011.
- FREEMAN, L.R.; KELLER, J.N. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood–brain-barrier and antioxidant based interventions. **Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 822-829, maio, 2012.
- FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells – A manual of basic technique. Second edition. **Alan R Liss**, New York: Inc, 1987.
- FRÖHNER, M.; WIRTH, M.P. Etiologic factors in soft tissue sarcomas. **Oncology Research and Treatment**, v.24, n.2, p.139-142, abr, 2001.
- GARRETT, M.D.; COLLINS, I. Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when?. **Trends in pharmacological sciences**, v.32, n.5, p.308-316, maio, 2011.
- GATENBY, R.A.; GILLIES, R.J. A microenvironmental model of carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v.8, n.1, p.56-61, 2008.
- GAVANDE, N. S., VANDERVERE-CAROZZA, P. S., PAWELCZAK, K. S., & TURCHI, J. J. Targeting the nucleotide excision repair pathway for therapeutic applications. **DNA Repair in Cancer Therapy (second edition)**, p. 135-150, 2016.
- GELLER, D.S.; GORLICK, R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. **Clinical Advances in Hematology & Oncology**, v.8, n.10, p. 705-718, out, 2010.
- GEWIRTZ, D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the antitumor antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v.57, n.7, p.727-741, abr, 1999.
- GILLET, J.P.; VARMA, S.; GOTTESMAN, M.M. The clinical relevance of cancer cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v.105, n.7, p.452-458, abr, 2013.
- GOLDBERG, J.; FISHER, D. E.; DEMETRI, G. D.; NEUBERG, D.; ALLSOP, S.; FONSECA, C.; MORGAN, J. A. Biologic Activity of Autologous, Granulocyte–Macrophage Colony-Stimulating Factor Secreting Alveolar Soft-Part Sarcoma and Clear Cell Sarcoma Vaccines. **Clinical Cancer Research**, v.21, p.3178-3186, mar, 2015.
- GOLLAPUDI, B.B.; THYBAUD, V.; KIM, J.H.; HOLSAPPLE, M. Strategies for the follow-up of positive results in the in vitro genotoxicity assays—An international collaborative initiative. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 52, n. 3, p.174-6. 2011.
- GONZALEZ, K. D.; BUZIN, C.; NOLTNER, K. A.; GU, D.; LI, W.; MALKIN, D.; SOMMER, S. High frequency of de novo mutations in Li-Fraumeni syndrome. **Journal of medical genetics**, p.1-17, jun., 2009.
- GOYAL, S.; BHADU, I.; KAPOOR, A.; RAJ, N. R. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients: A possible tool for early diagnosis. **Journal of**

**Thoracic Oncology**, v.11, n.4, p.S86-S78, abr., 2016.

GRAGNANI, A.; MORGAN, J.R.; FERREIRA, L.M. Experimental model of cultured keratinocytes. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.18,n. spe, p.4-14, 2003.

GRAHAM, M.A.; RILEY, R.J.; KERR, D.J. Drug metabolism in carcinogenesis and cancer chemotherapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v.51, n.2, p.275-289, 1991.

GREM, J.L. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. **Seminars in Radiation Oncology**, v.7, n.4, p. 249-259, out, 1997.

GRIFFITH, L.G.; SWARTZ, M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, p.211–224, mar., 2006.

GUERREIRO, P. S.; FERNANDES, A. S.; COSTA, J. G.; CASTRO, M.; MIRANDA, J. P.; OLIVEIRA, N. G. Differential effects of methoxyamine on doxorubicin cytotoxicity and genotoxicity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Mutation Research**, v.757, n.2, p.140-147, out., 2013.

GUILLÉN D.R.; COCKERELL C.J. Cutaneous and subcutaneous sarcomas. **Clinics in Dermatology**, v.19, n.3, p. 262-268, mai-jun, 2001.

GUIMARÃES, J.R.Q. **Manual de Oncologia**, São Paulo: BBS Editora, 2004.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G.V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of clinical and diagnostic research**,v.9, n.3, p.GE01-GE05, mar., 2015.

GUNDERT-REMY, U.; DAMM, G.; FOTH, H.; FREYBERGER, A.; GEBEL, T.; GOLKA, K.; RÖHL, C.; SCHUPP, T.; WOLLIN, K.M.; HENGSTLER, J.G. High exposure to inorganic arsenic by food: the need for risk reduction. **Archives of toxicology**, v. 89, n. 12, p.2219-27, 2015.

GUZMAN, M.L.; JORDAN, C.T. Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia. **Cancer Control**, v.11, n.2, p. 97 -104, mar-abr, 2004.

HAENEN, G.R. Activation of the microsomal glutathione-S-transferase and reduction of the glutathione dependent protection against lipid peroxidation by acrolein. **Biochemical Pharmacology**, v.37, n. 10, p.1933-1938, maiO, 1988.

HALDAR, M., HANCOCK, J. D., COFFIN, C. M., LESSNICK, S. L., & CAPECCHI, M. R. A conditional mouse model of synovial sarcoma: insights into a myogenic origin. **Cancer Cell**, v.11, n.4, p.375-388, abr, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. **The lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-724, 1994.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of câncer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, mar, 2011.

HANAHAN, D.;WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70, jan, 2000.

- HANNA, A.D. et al. Adverse Effects of Doxorubicin and Its Metabolic Product on Cardiac RyR2 and SERCA2A. **Molecular Pharmacology**, v.86, p.438–449, ago, 2014.
- HAYASHI, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p.18, 2016.
- HEIDELBERGER, C.; CHAUDHURI, N. K.; DANNEBERG, P.; MOOREN, D.; GRIESBACH, L.; DUSCHINSKY, R.; SCHEINER, J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. **Nature**, v.179, p.663-666, mar.,1957.
- HELMAN, L.; MELTZER, P. Mechanisms of sarcoma development. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 685-694, set, 2003.
- HENGSTLER, J. G.; HENGST, A.; FUCHS, J.; TANNER, B.; POHL, J.; OESCH, F. Induction of DNA crosslinks and DNA strand lesions by cyclophosphamide after inactivation by cytochrome P-450 2B1. **Mutation Research**, v.373, n.2, p.215-223, fev. 1997.
- HENNINGS, H.; GLICK, A. B.; LOWRY, D. T.; KRSMANOVIC, L. S.; SLY, L. M.; YUSPA, S. H. FVB/N mice: an inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin. **Carcinogenesis**, v.14, n.11, p.2353-2358, nov., 1993.
- HERCEG, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. **Mutagenesis**, v.22, n.2, p.91-103, 2007.
- HERNÁNDEZ, L.G.; VAN BENTHEM, J.; JOHNSON, G.E. A mode-of-action approach for the identification of genotoxic carcinogens. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p.e64532, 2013.
- HERRERO, Ó.; RAMÓN, D.; OREJAS, M. Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for de novo production of aromatic monoterpenes in wine. **Metabolic engineering**, v. 10, n. 2, p. 78-86, 2008.
- HERZOG, C.E. Overview of sarcomas in the adolescent and young adult population . **Journal of Pediatric Hematology Oncology**, v.27, n.4, p. 215 – 218, abr, 2005.
- HERZON, S.B. The Mechanism of Action of (-)-Lomaivitin A. **Accounts of Chemical Research**, v.50, n.10, p.2577-2588, set, 2017.
- HEUSER, V. D., DE ANDRADE, V. M., PERES, A., DE BRAGA, L. M. G. M., & CHIES, J. A. B. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biology International**, v.32, n10, p.1223-1229, out, 2008.
- HEUSER, V.D. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. **Toxicology**, v.232, n.3, p.235–247, abr, 2007.
- HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; LUMBSCH, H. T. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n.5, p. 509–547, mai, 2007.
- HOEIJMAKERS, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v.411, n.6835, p.366-374, mai, 2001.
- HOEIJMAKERS, J.H. DNA damage, aging, and cancer. **New England Journal of Medicine**, v.361, n.15, p.1475-1485, 2009.

- HUANG, S. Genetic and non-genetic instability in tumor progression: link between the fitness landscape and the epigenetic landscape of cancer cells. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 3-4, p. 423-448, 2013.
- HUANG, D.; SHI, X.; QIAN, Y.; TANG, W.; LIU, L.; XIANG, N.; NI, Z. Rapid separation of human breast cancer cells from blood using a simple spiral channel device. **Anal Methods**, v. 8, n. 30, p. 5940-5948, 2016.
- HUGO, H. J.; GUNASINGHE, N. P. A. D.; HOLLIER, B. G.; TANAKA, T.; BLICK, T.; TOH, A.; THOMPSON, E. W. Epithelial requirement for in vitro proliferation and xenograft growth and metastasis of MDA-MB-468 human breast cancer cells: oncogenic rather than tumor-suppressive role of E-cadherin. **Breast Cancer Research**, v.19, n.1, p.86-111, 2017.
- HUNT, K.K.; MITTENDORF, E.A.; . Diseases of the breast. **Sabiston Textbook of Surgery**, 20th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017.
- IMAM, M.; ZHANG, S.; MA, J.; WANG, H.; WANG, F. Antioxidants mediate both iron homeostasis and oxidative stress. **Nutrients**, v.9, n.7, p.671, jun., 2017.
- IMITIAJ, A; LEE, T.S. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.3, n.3, p. 316-321, 2007.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 3. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: **INCA**, p. 108, 2017.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimate 2018: Cancer Incidence in Brazil, **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 64, n. 1, p. 119-120, 2018.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: **INCA**, 124p. il. col., mapas, 2014.
- ISAKOFF, M. S.; BIELACK, S. S.; MELTZER, P.; GORLICK, R. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success. **Journal of clinical oncology**, v. 33, n. 27, p. 3029, 2015.
- ISHIHARA, H.; SHIBASAKI, Y.; KIZUKI, N.; WADA, T.; YAZAKI, Y.; ASANO, T.; OKA, Y. Type I Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinases cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.15, p.8741-8, abr., 1998.
- ISHIKAWA, N. K.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.3, p. 206-10, ago-out, 2001.
- ISSELS, R. D.; LINDNER, L. H.; VERWEIJ, J.; WESSALOWSKI, R.; REICHARDT, P.; WUST, P.; VUJASKOVIC, Z. Effect of Neoadjuvant Chemotherapy Plus Regional Hyperthermia on Long-term Outcomes Among Patients With Localized High-Risk Soft Tissue Sarcoma: The EORTC 62961-ESHO 95 Randomized Clinical Trial. **JAMA Oncology**, v.4, n.4, p.483-492, 2018.

- JANA, S.; PATRA, K.; MUKHERJEE, G.; BHATTACHARJEE, S.; MANDAL, D.P. Antitumor potential of anethole singly and in combination with cyclophosphamide in murine Sarcoma-180 transplantable tumor model. **RSC Advances**, v. 5, n. 70, p.56549-59, 2015.
- JAIN, S.; XU, R.; PRIETO, V. G.; LEE, P. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 3, n. 4, p. 416-429, abr., 2010.
- JAMIESON, D.J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 14(16), pp.1511-1527, 1998.
- JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P.A.; GERALDINE, P. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **Innovaive Food Science and Emerging Technologies**, v.10, n.2, p.228-234, abr, 2009.
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; SMIGAL, C.; THUN, M. J. Cancer statistics, 2006. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 56, n.2, p. 106-130, 2006.
- JESUS, L. G.; CICCHELLI, M.; MARTINS, G. B.; PEREIRA, M. C. C.; LIMA, H. S.; MEDRADO, A. R. A. P. Repercussões orais de drogas antineoplásicas: uma revisão de literatura. **RFO UPF**, v.21, n.1, p.130-135, 2016.
- JIRICNY, J. The multifaceted mismatch-repair system. **Nature reviews Molecular cell biology**, v.7, n.5, p.335-346, abr, 2006.
- JONES, G.M.; STALKER, J.; HUMPHRAY, S.; WEST, A.; COX, T.; ROGERS, J.; DUNHAM, I.; PRELICH, G. A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature methods**, v. 5, n. 3, p. 239, 2008.
- JOLLY, N.P.; AUGUSTYN, O.P.R.; PRETORIUS, I.S. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 24, n. 2, p. 55-62, 2017.
- JUNG, K. O.; KANG-YOUN LEE, S. K. R.; PARK, K. Y. Effects of various kinds of salt on the tumor formation, NK cell activity and lipid peroxidation in Sarcoma-180 cell transplanted mice. **Journal of Korean Association of Cancer Prevention**, v.7, p. 134-142, jun, 2002.
- JÚNIOR, A. L. G.; PAZ, M. F. C. J.; SILVA, L. I. S. D.; SOBRAL, A. L. P.; MACHADO, K. D. C.; FERREIRA, P. M. P.; CAVALCANTE, A. A. D. C. M. Serum Oxidative Stress Markers and Genotoxic Profile Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Pilot Study. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2015, p.1-11. 2015.
- JUNOD, S.W. U.S. Food and Drug Administration. FDA and Clinical Drug Trials: A Short History, 2013.
- KAGER, L.; ZOUBEK, A.; DOMINKUS, M.; LANG, S.; BODMER, N.; JUNDT, G.; COSS STUDY GROUP. Osteosarcoma in very young children: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group. **Cancer**, v.116, n.22, p.5316-5324, nov., 2010.
- KANG, S.H.; KWON, J.Y.; LEE, J.K.; SEO, Y.R. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal of cancer prevention**, v. 18, n. 4, p. 277, 2013.

KANG, C.; XU, Q.; MARTIN, T. D.; LI, M. Z.; DEMARIA, M.; ARON, L.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. **Science**, v.349, n.6255, p. aaa5612, set, 2015.

KALLEL, M.; ELLOUMI, F.; KHABIR, A.; GHORBAL, L.; CHAABOUNI, S.; AMOURI, H.; DAOUD, J. Breast cancer in young women in southern Tunisia: Anatomical study and clinical prognostic factors: About a series of 83 patients. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v.20, n.3, p.155-160, mai-jun, 2015.

KANOKMEDHAKUL, S.; LEKPHROM, R.; KANOKMEDHAKUL, K.; HAHNVAJANAWONG, C.; BUA-ART, S.; SAKSIRIRAT, W.; KONGSAEREE, P. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. **Tetrahedron**, v.68, n.39, p.8261- 8266, set, 2012.

KASAPOVIĆ, J.; PEJIĆ, S.; STOJILJKOVIĆ, V.; TODOROVIĆ, A.; RADOŠEVIĆ-JELIĆ, L.; SAIČIĆ, Z. S.; PAJOVIĆ, S. B. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages after chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. **Clinical Biochemistry**, v.43, n.16-17, p.1287-1293, nov, 2010.

KASPER, B.; D'HONDT, V.; VEREECKEN, P.; AWADA, A. Novel treatment strategies for malignant melanoma: a new beginning?. **Critical reviews in oncology/hematology**, v.62, n.1, p.16-22, abr, 2007.

KAUSHAL, A.; CITRIN, D. The role of radiation therapy in the management of sarcomas. **Surgical Clinics of North America**, v.88, n.3, p.629-646, jun, 2008.

KELLER, D.A.; JUBERG, D.R.; CATLIN, N.; FARLAND, W.H.; HESS, F.G.; WOLF, D.C.; DOERRER, N.G. Identification and characterization of adverse effects in 21st century toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 126, n. 2, p.291-7, 2012.

KHANNA A. DNA damage in cancer therapeutics: a boon or a curse? **Cancer Research**, v.75, p.2133–2138, abr, 2015.

KHUSHBAKTOVA, Z. A.; YUSUPOVA, S. M.; BADAL'YANTS, K. L.; SYROV, V. N.; BATIROV, É. K. Isolation of hispidin from a walnut-tree fungus and its antioxidant activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v.32, n.1, p.27–29, jan, 1996.

KIM, E. J.; KIM, S. Y.; KIM, S. M.; LEE, M. A novel topoisomerase 2a inhibitor, cryptotanshinone, suppresses the growth of PC3 cells without apparent cytotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.330, p.84-92, set, 2017.

KIM, J.B.; STEIN, R.; O'HARE, M.J. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer – a review. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.85, n.3, p.281-91, jun, 2004.

KIM, T. H.; SHIN, Y. J.; WON, A. J.; LEE, B. M.; CHOI, W. S.; JUNG, J. H.; KIM, H. S. Resveratrol enhances chemosensitivity of doxorubicin in multidrug-resistant human breast cancer cells via increased cellular influx of doxorubicin. **Biochim et Biophysica Acta**, v.1840, n.1, p.615-625, jan, 2014.

KIM, Y.O.; HAN, S.B.; LEE, H.W.; AHN, H.J.; YOON, Y.D.; JUNG, J.K.; KIM, H.M.; SHIN, C.S. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. **Life Sciences**, v. 77, n. 19, p.2438-56, 2005.

KING, A. A., DEBAUN, M. R., RICCARDI, V. M., & GUTMANN, D. H. Malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. **American journal of medical genetics**, v.93, n.5, p.388-92, ago, 2000.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Dictionary of the Fungi**, 10th ed. CABI, Wallingford, UK. 2008.

KIRKLAND, D.; AARDEMA, M.; MÜLLER, L.; HAYASHI, M. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 608, n. 1, p.29-42, 2006

KLEINERMAN, R. A.; TUCKER, M. A.; TARONE, R. E.; ABRAMSON, D. H.; SEDDON, J. M.; STOVALL, M.; FRAUMENI JR, J. F. Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 10, p. 2272-9, 2005.

KOBAYASHI, N.; HIRAMATSU, A.; AKATSUKA, T. Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 883-890, 1997

KOZARSKI, M.; KLAUS, A.; JAKOVLJEVIC, D.; TODOROVIC, N.; VUNDUK, J.; PETROVIĆ, P.; VAN GRIENSVEN, L. Antioxidants of edible mushrooms. **Molecules**, v.20, n.10, p.19489-19525, 2015.

KRISHNAMOORTHY, D.; SANKARAN, M. Modulatory effect of *Pleurotus ostreatus* on oxidant/antioxidant status in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene induced mammary carcinoma in experimental rats - A dose-response study. **Journal of cancer research and therapy**, v.12, n.1, p.386-394, abr., 2016.

KUMAR, R.; KUMAR, M.; MALHOTRA, K.; PATEL, S. Primary Osteosarcoma in the Elderly Revisited: Current Concepts in Diagnosis and Treatment. **Current Oncology Reports**, v.20, n.13, p.1-6, fev., 2018.

KUMAR, S.; BAJAJ, S.; BODLA, R.B. Preclinical screening methods in cancer. **Indian journal of pharmacology**, v.48, n.5, p.481-486, set-out, 2016.

KUMP, L.R. The rise of atmospheric oxygen. **Nature**, v.451, n.7176, p. 277–278, jan, 2008.

KUROZUMI, S.; INOUE, K.; TAKEI, H.; MATSUMOTO, H.; KUROSUMI, M.; HORIGUCHI, J.; OYAMA, T. ER, PgR, Ki67, p27 Kip1, and histological grade as predictors of pathological complete response in patients with HER2-positive breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy using taxanes followed by fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide concomitant with trastuzumab. **BMC cancer**, v.15, n.1, p.622, 2015.

KYRTOPOULOS, S. A.; SARRIF, A.; AUTRUP, H.; FARMER, P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; KLEINJANS, J. C.; VRIJHOF, H. Biomarkers and molecular epidemiology-present state and future trends: Introduction and overview. **Mutation Research**, v.600, n.1-2, p.77-78, ago., 2006.

LADANYI, M.; ANTONESCU, C. R.; LEUNG, D. H.; WOODRUFF, J. M.; KAWAI, A.; HEALEY, J. H.; GOLDSMITH, J. D. Impact of SYT-SSX fusion type on the clinical

behavior of synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective study of 243 patients. **Cancer Research**, v.62, n.1, p.135–140, jan., 2002.

LADEIRA, C.; VIEGAS, S.; CAROLINO, E.; GOMES, M.C.; BRITO, M. Correlation between the genotoxicity endpoints measured by two different genotoxicity assays: comet assay and CBMN assay. **Frontiers in Genetics**, 2015.

LAKHANI, S. R.; ELLIS, I. O.; SCHNITT, S. J.; TAN, P. H.; VAN DE VIJVER, M. J. WHO classification of tumors of the breast. **Lyon: IARC Press**, p.100-103, 2012

LAWRENCE, M. S.; STOJANOV, P.; MERMEL, C. H.; ROBINSON, J. T.; GARRAWAY, L. A.; GOLUB, T. R.; GETZ, G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. **Nature**, v.505, p.495–501, jan., 2014.

LEAL, J.F.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, V.; MONEO, V.; DOMINGO, A.; BUEREN-CALABUIG, J.A.; NEGRI, A.; GAGO, F.; GUILLÉN-NAVARRO, M.J.; AVILÉS, P.; CUEVAS, C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, L.F. Molecular pharmacology and antitumor activity of Zalypsis® in several human cancer cell lines. **Biochemical pharmacology**, v. 78, n. 2, pp.162-170, 2009.

LEBRUN, A.; MYHAL, G.; CENESTON, N.; CONSTANZO-YANEZ, J.; GRÉGOIRE, Y.. **Transfusion of Sickle Cell Anemia Patients in Quebec: Challenges and Opportunities**, 2017.

LEE, Y. L.; KIM, H. J.; LEE, M. S.; KIM, J. M.; HAN, J. S.; HONG, E. K.; LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Experimental animals**, v. 52, n. 5, p. 371-375, 2003.

LEWIS, J. J.; LEUNG, D.; WOODRUFF, J. M.; BRENNAN, M. F. Retroperitoneal soft-tissue sarcoma: analysis of 500 patients treated and followed at a single institution. **Annals of surgery**, v. 228, n. 3, p. 355, 1998.

LI, Y., YAO, J., HAN, C., YANG, J., CHAUDHRY, M.T., WANG, S., LIU, H. AND YIN, Y. Quercetin, inflammation and immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p.167, 2016.

LIAO, W.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W.G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p.46-53, 2009.

LIN, L.; HUTZEN, B.; ZUO, M.; BALL, S.; DEANGELIS, S.; FOUST, E.; LI, P. K. Novel STAT3 phosphorylation inhibitors exhibit potent growth-suppressive activity in pancreatic and breast cancer cells. **Cancer research**, p. 0008-5472. CAN-09-2468, 2010.

LIN, Z.; LIN, Z. Juncao technology: fungi cultivation with juncao. **Fujian Agricultural University Jun-Cao Research Center: Fuzhou**. 130p. 1997.

LIU, Y., YIN, T., FENG, Y., CONA, M. M., HUANG, G., LIU, J.G., et al., Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 5, n.5, p. 708-729,out, 2015.

LORD, C. J.; TUTT, A. N. J; ASHWORTH, A. Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors. **Annual review of medicine**, v. 66, p. 455-470, 2015.

- LU, Y.; JOHNSON, T. P.; WHEELER, L. W.; LLOYD, A. M.; CROSS, V. A.; WESTRICK, E. M.; LEAMON, C. P. Treatment of epithelial ovarian cancer with folate receptor ( $\alpha/\beta$ ) targeted chemotherapy is enhanced by CTLA-4 blockade: **Learning from animal models**, 2017.
- LUETKE, A.; MEYERS, P. A.; LEWIS, I.; JUERGENS, H. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review. **Cancer Treatment Reviews**, v.40, n.4, p. 523-532, mai, 2014.
- LEVINE, D.A.; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. **Nature**,
- LEWIS, J. J.; LEUNG, D.; WOODRUFF, J. M.; BRENNAN, M. F. Retroperitoneal soft-tissue sarcoma: analysis of 500 patients treated and followed at a single institution. **Annals of surgery**, v. 228, n. 3, p. 355, 1998.
- LI, Y., YAO, J., HAN, C., YANG, J., CHAUDHRY, M.T., WANG, S., LIU, H. AND YIN, Y. Quercetin, inflammation and immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p.167, 2016.
- LIAO, W.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W.G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p. 46-53, 2009.
- LIN, Z.; LIN, Z. Juncao technology: fungi cultivation with juncao. Fujian Agricultural University Jun-Cao Research Center: **Fuzhou**. 130p. 1997.
- LIU, Yewei et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative imaging in medicine and surgery**, v. 5, n. 5, p. 708, 2015.
- LOPEZ-GARCIA, M. A.; GEYER, F. C.; LACROIX-TRIKI, M.; MARCHIÓ, C.; REIS-FILHO, J. S. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. **Histopathology**, v.57, n.2, p.171–192, ago, 2010.
- LORD, C. J.; TUTT, A. N. J; ASHWORTH, A. Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors. **Annual review of medicine**, v. 66, p. 455-470, 2015.
- LU, Y.; JOHNSON, T. P.; WHEELER, L. W.; LLOYD, A. M.; CROSS, V. A.; WESTRICK, E. M.; LEAMON, C. P. Treatment of epithelial ovarian cancer with folate receptor ( $\alpha/\beta$ ) targeted chemotherapy is enhanced by CTLA-4 blockade: **Learning from animal models**, 2017.
- LUJAN, H. J.; PLASENCIA, G.; JACOBS, M.; VIAMONTE, M.; HARTMANN, R. F. Long-term survival after laparoscopic colon resection for cancer: complete five-year follow-up. **Diseases of the Colon & Rectum**, v.45, n.4, p.491-501, abr, 2002.
- LYMAN, G.H.; DALE, D. C.; TOMITA, D.; WHITTAKER, S.; CRAWFORD, J. A retrospective evaluation of chemotherapy dose intensity and supportive care for early-stage breast cancer in a curative setting. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.139, n.3, p.863–872, jun, 2013.
- MAGNUSSON, S.; GISSELSSON, D.; WIEBE, T.; KRISTOFFERSSON, U.; BORG, Å.; OLSSON, H. Prevalence of germline TP53 mutations and history of Li–Fraumeni syndrome

in families with childhood adrenocortical tumors, choroid plexus tumors, and rhabdomyosarcoma: A population-based survey. **Pediatric blood & cancer**, v. 59, n. 5, p. 846-53, 2012.

MAHER, C. M.; THOMAS, J. D.; LONGEN, C. G.; HAAS, D. A.; OYER, H. M.; TONG, J. Y.; KIM, F. J. "Pharmacologic modulation of Sigma1 induces autophagic degradation of programmed death-ligand 1 in cancer cells." **Cancer Research**, v.77,p.3202, 2017.

MAHONEY, S.E.; DAVIS, J.M.; MURPHY, E.A.; MCCLELLAN, J.L.; PENA, M.M. Dietary Quercetin Reduces Chemotherapy-Induced Fatigue in Mice. **Integrative Cancer Therapies**, v.13, p. 417-24, 2014.

MAK, I.W.; EVANIEW, N.; GHERT, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. **American journal of translational research**, v. 6, n. 2, p. 114, 2014.

MAKKI, J. Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, p. CPath-S31563, 2015.

MALKIN, D.; LI, F.P.; STRONG, L.C.; FRAUMENI, J.F.JR.; NELSON, C.E.; KIM, D.H.; KASSEL, J. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1233-1238, 1990.

MAGRO, M.C.D.S.; VATTIMO, M.D.F.F. Evaluation of renal function: creatinine and other biomarkers. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 19, n. 2, p. 182-5, 2007.

MALUF, S.W.; ERDTMANN, B. **Biomonitoração do dano genético em humanos**. Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP, organizadores. Genética toxicológica. 1a ed. Porto Alegre (RS): Alcance, 2003.

MARCON, A.E.; NAVONI, J.A.; DE OLIVEIRA GALVÃO, M.F.; GARCIA, A.C.F.S.; DO AMARAL, V.S.; PETTA, R.A.; DA COSTA CAMPOS, T.F.; PANOSSO, R.; QUINELATO, A.L.; DE MEDEIROS, S.R.B. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. **Chemosphere**, v. 167, p. 36-43, 2017.

MARIÑO-ENRÍQUEZ, A. Advances in the Molecular Analysis of Soft Tissue Tumors and Clinical Implications. **Surgical Pathology Clinics**, v. 8, n.3, p. 525-37, 2015.

MARIÑO-ENRÍQUEZ, A.; BOVÉE, J.V. Molecular Pathogenesis and Diagnostic, Prognostic and Predictive Molecular Markers in Sarcoma. **Surgical Pathology Clinics**, v. 9, n.3, p. 457-73, 2016.

MARSH S, LIU G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p.381-7, 2009.

MATTILA, P.H., MARNILA, P.; PIHLANTO, A. "Wild and Cultivated Mushrooms." **Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health**, v.2, p.1279-304, 2018.

MATSUMOTO, S.; KAWAGUCHI, N.; MANABE, J.; MATSUSHITA, Y. "In situ preparation": new surgical procedure indicated for soft-tissue sarcoma of a lower limb in close proximity to major neurovascular structures. **International journal of clinical oncology**, v. 7, n. 1, p. 51-6, 2002.

- MATSUZAKI,P.; AKISUE,G.; OLORIS,S.C.S.; GORNIAK,S.L.; DAGLI, M.L.Z. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on th Ehrlich tumor in its ascetic form. *Life Sciences*, v.74, p573-579, 2004.
- MEI, Y.; ZHU, H.; HU, Q.; LIU, Y.; ZHAO, S.; PENG, N.; LIANG, Y. A novel polysaccharide from mycelia of cultured *Phellinus linteus* displays antitumor activity through apoptosis. **Carbohydrate Polymers**, v.124, p.90–97. 2015.
- MEHDI, K.; PENNINCKX, M.J. An important role for glutathione and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**Microbiology**, v. 143, n. 6, p.1885-9, 1997.
- MENG, X.; LIANG, H.; LUO, L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. **Carbohydrate research**, v. 424, p. 30-41, 2016.
- MINARI, J.B.; OKEKE, U. Chemopreventive effect of *Annona muricata* on DMBA-induced cell proliferation in the breast tissues of female albino mice. **Egyptian Journal of Medical. Human Genetics**, v.15, p.327-334, 2014.
- MINOTTI G.; MENNA P.; SALVATORELLI E.; CAIRO G.; GIANNI L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacology Reviews**, v. 56, p. 185-229, 2004.
- MIZUNO, T.; SAITO, H.; NISHITOBA, T.; KAWAGISHI, H. Antitumour-active substances from mushrooms, **Food Reviews International**, v.11, p.23-61,1995.
- MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.;SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990.
- MOON, C.K., KIM, D.W., JIN, S.Y. AND LEE, D.W. The Effect of Pentosan Polysulfate and Androgen on Angiogenesis in 9, 10-Dimethyl-1, 2-benzanthracene Induced Rat Mammary Carcinoma. **Journal of the Korean Cancer Association**, v. 28, n. 3, p. 461-72, 1996.
- MOUW, K. W.; GOLDBERG, M. S.; KONSTANTINOPOULOS, P. A.; D'ANDREA, A. D. DNA damage and repair biomarkers of immunotherapy response. **Cancer discovery**, 2017.
- MORADALI, M.F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G.A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 701-24, 2007.
- MÜLLER, P.; MARTIN, K.; THEURICH, S.; SCHREINER, J.; SAVIC, S.; TERSZOWSKI, G. et al. Microtubule-depolymerizing agents used in antibody-drug conjugates induce antitumor immunity by stimulation of dendritic cells. **Cancer Immunologic Research**, v. 2, p. 741-55, 2014.
- NA, Q.; XIANGYANG, S.; XINHUI, Q.; ZHOU, Y. Effects of Peat and Mushroom Residues on Removing Ammonia-Nitrogen and Total Phosphorus in Wastewater. **Nature Environ. Pollution Technol**, v.15, p.1373-1380, 2016.

- NASTKE, M. D.; GAUR, N.; DOWAL, L.; FOWLER, S.; DIERS, A.; GESTA, S.; SARANGARAJAN, R. BPM31510, an anti-cancer agent selectively causes activation and proliferation of T cells, demonstrating potential utility in an immune-oncology setting. **Cancer Research**, v.77, p. 1680, 2017.
- NERSESYAN, A.; FENECH, M.; BOLOGNESI, C.; MIŠÍK, M.; SETAYESH, T.; WULTSCH, G.; BONASSI, S.; THOMAS, P.; KNASMÜLLER, S. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p.1-11, 2016.
- NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; FENECH, M.; BOLOGNESI, C.; MISIK, M.; WULTSCH, G.; HARTMANN, M.; KNASMUELLER, S. Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): a review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 762, p. 7-51, 2014.
- NESSLANY, F.; ZENNOUCHE, N.; SIMAR-MEINTIÈRES, S.; TALAHARI, I.; NKILIMBOUI, E.N.; MARZIN, D. *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutation Research**, v. 630, p. 28-41, 2007.
- NERY, L.H.R.. **Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos BALB/c**. [Tese] Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 2004
- NEVES, L.; DE PAULA, M. T.; BRITO, M.; BRAVO. M.; DINIZ, N. **Taxonomia de criptógmias fungos: filo basidiomycota**. Belo Horizonte, 2013.
- NEWSAM, J. M.; KING-SMITH, D.; JAIN, A.; KARANDE, P.; FEYGIN, I.; BURBAUM, J.; MITRAGOTRI, S. Screening soft materials for their effect on skin barrier function by high throughput experimentation. **Journal of Materials Chemistry**, v.15, 3061-8, 2005.
- NICOLAEV, A.; YANG, E.S. The Impact of DNA Repair Pathways in Cancer Biology and Therapy. **Cancers**, v. 9, n.126, p. 1-4, 2017.
- NIEDERMEYER, T.H.; LINDEQUIST, U.; MENTEL, R.; GÖRDES, D.; SCHMIDT, E.; THUROW, K.; LALK, M. Antiviral Terpenoid Constituents of Ganoderma pfeifferi. **Journal of Natural products**, v. 68, n. 12, p.1728-31, 2005.
- NIKITAKI, Z.; NIKOLOV, V.; MAVRAGANI, I.V.; PLANTE, I.; EMFIETZOGLOU, D.; ILLIAKIS, G.; GEORGAKILAS, A.G.. Non-DSB clustered DNA lesions. Does theory colocalize with the experiment? **Radiation Physics Chemistry**, v. 128, p. 26–35, 2016.
- NOVAES, M. R. C. G.; NOVAES, L. C. G.; MELO, A. L.; RECÔVA, V. L. Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo *Agaricus sylvaticus*. **Ciências Saúde**, v.18, p.227-236, 2007.
- NORTH, M.; TANDON, V.J.; THOMAS, R.; LOGUINOV, A.; GERLOVINA, I.; HUBBARD, A.E.; ZHANG, L.; SMITH, M.T.; VULPE, C.D.; Genome-wide functional profiling reveals genes required for tolerance to benzene metabolites in yeast. **PloS one**, v. 6, n. 8. p. e24205, 2011.

NYONGBELA, K. D.; LANNANG, A. M.; AYIMELE, G. A.; NGEMENYA, M. N.; BICKLE, Q.; EFANGE, S. Isolation and identification of an antiparasitic triterpenoid estersaponin from the stem bark of *Pittosporum mannii* (Pittosporaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.3, p.389–392, 2013.

O'CONNOR, M. J. Targeting the DNA damage response in cancer. **Molecular cell**, v. 60, n. 4, p. 547-60, 2015

OBA, Y.; SUZUKI, Y.; MARTINS, G. N.; CARVALHO, R. P.; PEREIRA, T. A.; WALDENMAIER, H. E.; PINTO, E. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. **Photochemical & Photobiological Sciences - Royal Society of Chemistry**, v.16,p.1435, 2017.

OLDENBURG, R.A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found?. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 63, n. 2, p.125-49, 2007.

OLIVEIRA, A. G.; CARVALHOII, R.P.; WALDENMAIERII, H.E.; STEVANI, C.V. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. **Química Nova**, v. 36 n. 2, 2013.

OLIVEIRA, B. M. Mecanismo de ação de agentes quimioterápicos em neoplasias do cólon e reto. 51 f. **Monografia** (Curso de Biomedicina) - Faculdade de Americana, Americana, 2015.

OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, P.; LUIS, F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p.593-616, 2007.

OLSON, R.D.; HEADLEY, M.B.; HODZIC, A.; WALSH, G.M.; WINGETT, D.G. In vitro and in vivo immunosuppressive activity of a novel anthracycline, 13-deoxy, 5-iminodoxorubicin. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 734-43, 2007.

OTTAVIANI, G.; JAFFE, N. The epidemiology of osteosarcoma. **Cancer Treatment Research**, v. 152, p. 3–13, 2010.

OHTAKE, Y.; SATOU, A.; YABUUCHI, S. Isolation and characterization of glutathione biosynthesis-deficient mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **Agricultural and biological chemistry**, v. 54, n. 12, p. 3145-50, 1990.

PANTALEÃO C.; LUCHS A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 69, n. 4, p. 439-4, 2010.

PARKER, W.B.; CHENG, Y.C. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 48, p. 381–95, 1990.

PASCUAL, G.; AVGUSTINOVA, A.; MEJETTA, S.; MARTÍN, M.; CASTELLANOS, A.; ATTOLINI, C. S. O.; BESCÓS, C. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. **Nature**, v. 541, p. 41-5, 2017.

PASTOR, S.; CREUS, A.; PARRÓN, T.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; SIFFEL, C.; PIPERAKIS, S.; MARCOS, R. Biomonitoring of four European populations occupationally

exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 249-58, 2003.

PASSOS, H.; EGAL, E.; SHINOMIA, S.; ALEXANDRE, G.; CINTRA, M.L.; AMSTALDEN, E.; ALTEMANI, A.; MARIANO, F. 76 Retrospective Study of Sarcomas in a Brazilian Institution: Clinical-Pathological Analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 149, suppl. 1, pp.S33-S33, 2018.

PATTERSON, R.E.; ROCK, C.L.; KERR, J.; NATARAJAN, L.; MARSHALL, S.J.; PAKIZ, B. et al. Metabolism and breast cancer risk: frontier and research and practice. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 113, p. 288-96, 2013.

PATWARDHAN, P. P.; IVY, K. S.; MUSI, E.; DE STANCHINA, E.; SCHWARTZ, G. K. Significant blockade of multiple receptor tyrosine kinases by MGCD516 (Sitravatinib), a novel small molecule inhibitor, shows potent anti-tumor activity in preclinical models of sarcoma. **Oncotarget**, v. 7, p. 4093-109, 2016.

PELMUS, M.; GUILLOU, L.; HOSTEIN, I.; SIERANKOWSKI, G.; LUSSAN, C.; COINDRE, J.M. Monophasic fibrous and poorly differentiated synovial sarcoma: immunohistochemical reassessment of 60 t(X;18)(SYT-SSX)-positive cases . **American Journal of Surgical Pathology**, v. 26, p. 1434-40, 2002.

PAZ, M.F.C.J.; SOBRAL, A.L.P.; PICADA, J.N.; GRIVICICH, I.; JÚNIOR, A.L.G.; DA MATA, A.M.O.F.; DE ALENCAR, M.V.O.B.; DE CARVALHO, R.M.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; ISLAM, M.T.; DE CARVALHO MELO CAVALCANTE, A.A.. Persistent Increased Frequency of Genomic Instability in Women Diagnosed with Breast Cancer: Before, during, and after Treatments. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2018.

PELTOMÄKI P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 4, p. 299-310, 2012.

PENA-CASTILLO, L.; HUGHES, T. R. Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes?. **Genetics**, v. 176, n. 1, p. 7-14, 2007.

PERRONE, S.; LOTTI, F.; GERONZI, U.; GUIDONI, E.; LONGINI, M.; BUONOCORE, G. Oxidative Stress in Cancer-Prone Genetic Diseases in Pediatric Age: The Role of Mitochondrial Dysfunction. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E.R.; LEMOS, T.L.G.; WETMORE, L.A.; MORAES, M.O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 3, p.187-91, 2000.

PETER, Y.Y; DENIS, C.G. Chapter Nine - Dysregulated Myogenesis in habdomyosarcoma. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 126, p.285-297, 2018

PINEDO, H.M.; PETERS, G.F. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 6, p. 1653-64, 1988.

PIRIE, A. D.; DAVIES, N. W.; AHUJA, K. D.; ADAMS, M. J.; SHING, C. M.; NARKOWICZ, C.; GERAGHTY, D. P. Hypolipidaemic effect of crude extract from *Carpobrotus rossii* (pigface) in healthy rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.66, p.134-139, 2014.

PISTERS, P.W.T.; CASPER, E.S.; MANN, G.N.; O'SULLIVAN, B. Soft-tissue sarcomas. In: PAZDUR, R.; COIA, L.R.; HOSKINS, W.J.; WAGMAN, L.D. **Cancer management: A multidisciplinary approach**. 8 ed. New York: CMP Healthcare media, 2004.

PITOT, H.C. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. **The Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 859-60, 2001.

PLESZCZYŃSKA, M.; WIATER, A.; SIWULSKI, M.; LEMIESZEK, M. K.; KUNASZEWSKA, J.; KACZOR, J.; SZCZODRAK, J. Cultivation and utility of *Piptoporus betulinus* fruiting bodies as a source of anticancer agents. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 32, p.1-9, 2016.

POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 27, n. 4, p. 311-333, 2006.

POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; KOLLAR, V.; RHODES, C.J.; VALKO, M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017.

PRABHU, S.; ANANTHANARAYANAN, P.; AZIZ, S. K.; RAI, S.; MUTALIK, S.; SADASHIVA, S. R. B. Enhanced effect of geldanamycin nanocomposite against breast cancer cells growing in vitro and as xenograft with vanquished normal cell toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 320, p. 60-72, 2017.

PRZYBYL, J.; SCIOT, R.; WOZNIAK, A.; SCHOFFSKI, P.; VANSPAUVEN, V.; SAMSON, I.; et al. Metastatic potential is determined early in synovial sarcoma development and reflected by tumor molecular features. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 53, p. 505-13, 2014.

PUIGVERT, J.C.; SANJIV, K.; HELLEDAY, T.. Targeting DNA repair, DNA metabolism and replication stress as anti-cancer strategies. **The FEBS journal**, v. 283, n. 2, p. 232-245, 2016.

PUTTARAJU, Nethravathi Guthalu et al. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9764-9772, 2006.

QI, L.; XU, Z. *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 16, p. 4243-45, 2006.

QUEIROZ, A. C.; ALVES, H. D. S.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; DIAS, T. D. L. M. F.; SANTOS, M. D. S.; MELO, G. M. D. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. **Natural product research**, v. 28, n. 6, p. 403-406, 2014.

QUESADA, J.; AMATO, R. The molecular biology of soft-tissue sarcomas and current trends in therapy. **Sarcoma**, 2012.

RADHAKRISHNAN, S.K.; JETTE, N.; LEES-MILLER, S.P. Non-homologous end joining: emerging themes and unanswered questions. **DNA repair**, v. 17, p. 2-8, 2014.

RAHANGDALE, L.; LIPPMANN, Q. K.; GARCIA, K.; BUDWIT, D.; SMITH, J. S.; VAN LE, L. Topical 5-fluorouracil for treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2: a

randomized controlled trial. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 210, n. 4, p. 314. e1-314. e8, 2014.

RAKHA, E.A.; REIS-FILHO, J.S.; BAEHNER, F.; DABBS, D.J.; DECKER, T.; EUSEBI, V.; FOX, S.B.; ICHIHARA, S.; JACQUEMIER, J.; LAKHANI, S.R.; PALACIOS, J. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 4, p.207, 2010.

RAUSCH, L. K.; NETZER, N. C.; HOEGEL, J.; PRAMSOHLER, S. The linkage between breast cancer, hypoxia, and adipose tissue. **Frontiers in oncology**, v. 7, p. 211, 2017.

RAVI, V.; PATEL, S.; BENJAMIN, R.S. Chemotherapy for soft-tissue sarcomas. **Oncology**, v.29, p. 43, 50, 2015

RAVINDRA, K.; SOKHI, R.; GRIEKEN, R.V. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. **Atmos Environ**, v.42, p. 2895–2921, 2008.

RAY, A.; NAGARAJAN, B.; SANKPAL, U. T.; SHELAKE, S.; BOWMAN, W. P.; LACKO, A.; BASHA, R. M. Mithramycin induces the antiproliferative activity of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma cells. **Cancer Research**, v.77, p.1532-1532, 2017.

RAYMOND, A.K.; JAFFE, N. Osteosarcoma multidisciplinary approach to the management from the pathologist's perspective. **Cancer Treatment Research**, v.152, p. 63–84, 2009.

REICHARDT, P. Soft tissue sarcomas, a look into the future: different treatments for different subtypes. **Future Oncology**, v.10, p.19-27, 2014

REIS-FILHO, J. S.; WESTBURY, C.; PIERGA, J. Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 59, n. 3, p. 225-231, 2006.

REIS, F.S.; MARTINS, A.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1201-1207, 2012.

REIS-FILHO, J.S.; LAKHANI, S.R. Breast cancer special types: why bother?. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 216, n. 4, p. 394-8, 2008.

REVIRIEGO, I. D.; FERNÁNDEZ-LLAMAZARES, Á.; SALPETEUR, M.; HOWARD, P. L.; REYES-GARCÍA, V. Gendered medicinal plant knowledge contributions to adaptive capacity and health sovereignty in Amazonia. **Ambio**, v. 45. p. 263-75, 2016.

RIBEIRO, A. A.; DELUQUE, A. L.; FAGUNDES, D. L. G.; FRANCA, E. L.; HONORIO-FRANCA, A. C. " Basic Clin Pharmacol Toxicol." **Current drug delivery**, v. 15, p. 227-234, 2018.

RIBEIRO, D. R., ALVES, Â. V. F., DOS SANTOS, E. P., PADILHA, F. F., GOMES, M. Z., RABELO, A. S., DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Inhibition of DMBA-induced Oral

Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 117, n. 2, p. 85-95, 2015.

RIBIC, C. M.; SARGENT, D. J.; MOORE, M. J.; THIBODEAU, S.N., AMY J. FRENCH; GOLDBERG R. M.; HAMILTON, S. R. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. **New England Journal of Medicine** v. 349, n. 3, p. 247-257, 2003.

RIGGI, N.; CIRONI, L.; SUVÀ, M.L.; STAMENKOVIC, I. Sarcomas: genetics, signalling, and cellular origins. Part 1: The fellowship of TET. **Journal of Pathology**, v. 213, n.1, p. 4-10, 2007.

RIUL DA SILVA, S.; GARCIA DO NASCIMENTO, T. Leucocitúria em pacientes submetidas a quimioterapia e coleta de urina. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 63, n. 4, 2010.

RODRIGUES, S.B.; JABOR, I.A.S.; MARQUES-SILVA, G.G.; DE ROCHA, C.L. Detection of antimutagenic potential of sun mushroom (*Agaricus blazei*) in mehtG1 system in *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 513-517, 2003.

ROOS, W.P.; THOMAS, A.D.; KAINA, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 20, 2016.

ROSCHKE, A. V.; TONON, G.; GEHLHAUS, K. S.; MCTYRE, N.; BUSSEY, K. J.; LABABIDI, S.; KIRSCH, I. R. Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. **Cancer Research**, v.63, p. 8634-47,2003.

ROHR, P.; DA SILVA, J.; DA SILVA, F.R.; SARMENTO, M.; PORTO, C.; DEBASTIANI, R.; DOS SANTOS, C.E.; DIAS, J.F; KVITKO, K. Evaluation of genetic damage in open-cast coal mine workers using the buccal micronucleus cytome assay. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 54, n. 1, p.65-71, 2013.

ROSENFELD, R. **Hemograma**. J. Bras. Patol. Med. Lab., v. 48, n. 4, p. 244, 2012.

RUBEL, R. **Produção de compostos bioativos de Ganoderma lucidum por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica**. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, UFPR, Curitiba, 2006.

RUBIN, J.B.; KUNG, A.L.; KLEIN, R.S.; CHAN, J.A.; SUN, Y.; SCHMIDT, K.; KIERAN, M.W.; LUSTER, A.D.; SEGAL, R.A. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 23, p.13513-13518, 2003.

RUBINO, C.; SHAMSALDIN, A.; LÊ, M.G.; LABBÉ, M.; GUINEBRETIERE, J.M.; CHAVALAUDRA, J.; DE VATHAIRE, F. Radiation dose and risk of soft tissue and bone sarcoma after breast cancer treatment. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 89, n. 3, p. 277-288, 2005.

RUGGE, M.; FASSAN, M.; GRAHAM, D.Y. Epidemiology of gastric cancer. In Gastric Cancer (pp. 23-34). **Springer, Cham**, 2015

SABIANI, L.; HOUVENAEGHEL, G.; HEINEMANN, M.; REYAL, F.; CLASSE, J. M.; COHEN, M.; ROUZIER, R. Breast cancer in young women: Pathologic features and molecular phenotype. **The Breast**, v. 29, p. 109-116, 2016.

SAHA, S.K.; ROY, S.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Ultra-highly diluted plant extracts of *Hydrastis canadensis* and *Marsdenia condurango* induce epigenetic modifications and alter gene expression profiles in HeLa cells *in vitro*. **Journal of Integrative Medicine**, v. 13, p. 400-11, 2012.

SALEH, A.M.; AL-QUDAH, M.A.; NASR, A.; RIZVI, S.A.; BORAI, A.; DAGHISTANI, M. Comprehensive Analysis of the Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic Mechanisms of *Pallines Spinosa* Flower and Leaf Essential Oils Against Breast Cancer Cells. **Cell Physiol Biochem**, v. 42, p. 2043-65, 2017.

SALMON, S.E.; SARTORELLI, A.C. Quimioterapia do Câncer. In: Katzung, B.G.; (8 Ed.) **Farmacologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. v. 24, p. 803-832, 2003.

SAMUEL, P.; PRINCE, L; PRABAKARAN, P. Antibacterial activity of marine derived fungi collected from South East Coast of Tamilnadu, India. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 4, p. 86-94, 2017.

SÁNCHEZ, C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. **Synthetic and systems biotechnology**, v. 2, n.1, p. 13-22, 2017.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; PEÑARROJA-FLORES, R.; TOLEDO-GARCÍA, J.; BRAVO, J.L., et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutat Res**, v. 640, p. 8-15, 2008.

SANCHEZ-VEGA, F.; MINA, M.; ARMENIA, J.; CHATILA, W.K.; LUNA, A.; LA, K.C.; DIMITRIADOY, S.; LIU, D.L.; KANTHETI, H.S.; SAGHAFINIA, S.; CHAKRAVARTY, D. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. **Cell**, v. 173, n. 2, p.321-337, 2018.

SANTOS, C.L.V.; POURRUT, B.; DE OLIVEIRA, J.M.P.F. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 1-18, 2015.

SILVA, M. R.; DE CASTRO, M. C. R. Fundamentos de dermatologia. Cap. **Sarcomas de partes moles**. Editora Atheneu 3º ed., 2009.

SAWAIZUMI, M.; IMAI, T.; MATSUMOTO, S. Recent advances in reconstructive surgery for bone and soft tissue sarcomas. **International journal of clinical oncology**, v. 18, n. 4, p.566-73, 2013.

SCHWARZ, R.; BRULAND, O.; CASSONI, A.; SCHOMBERG, P.; BIELACK, S. The role of radiotherapy in oseosarcoma. **Cancer Treatment and Research**, v.152, p. 147–164, 2009.

SEGAL, N.H.; PAVLIDIS, P.; ANTONESCU, C.R.; MAKI, R.G.; NOBLE, W.S.; DESANTIS, D.; ... & CORDON-CARDO, C. Classification and subtype prediction of adult soft tissue sarcoma by functional genomics. **The American journal of pathology**, v. 163, n. 2, p. 691-700, 2003.

SHARMA, D.; SINGH, V.P.; SINGH, N.K. A review on phytochemistry and pharmacology of medicinal as well as poisonous mushrooms. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, 2017.

SHARIF, A.; ASHRAF, M.; ANJUM, A.A.; JAVEED, A.; ALTAF, I.; AKHTAR, M.F.; ABBAS, M.; AKHTAR, B.; SALEEM, A. Pharmaceutical wastewater being composite mixture of environmental pollutants may be associated with mutagenicity and genotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 3, p. 2813-20, 2016.

SHENG, J.Y.; MOVVA, S. Systemic Therapy for Advanced Soft Tissue Sarcoma. **Surgical Clinics of North America**, v. 96, n. 5, p. 1141-56, 2016.

SHIBATA, A.; MOIANI, D.; ARVAI, A.S.; PERRY, J.; HARDING, S.M.; GENOIS, M.M.; MAITY, R.; VAN ROSSUM-FIKKERT, S.; KERTOKALIO, A.; ROMOLI, F.; ISMAIL, A. DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. **Molecular cell**, v. 53, n. 1, p. 7-18, 2014.

SHIBU, M.A.; AGRAWAL, D.C.; HUANG, C.Y. Mushrooms: A Pandora Box of Cardioprotective Phytochemicals. In *Medicinal Plants and Fungi: Recent Advances in Research and Development* (pp. 337-362). **Springer, Singapore**, 2017.

SHIRMILA, J.G.; RADHAMANY, P.M. Identification and determination of antioxidant constituents of bioluminescent mushroom. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S386-S391, 2012.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, p.7-30, 2017.

SIGMA-ALDRICH,. 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene at Sigma-Aldrich, 2014.

SILVA P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. c. 107. p.1055-1070, 2006.

SILVA, S. R.; NASCIMENTO, T. G. Leucocitúria em pacientes submetidas a quimioterapia e coleta de urina. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 63, n. 4, 2010.

SILVA, T. D. S.; Atividade antitumoral *in vitro e in vivo* do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (líquen). 2014. 82 f. **Dissertação** (Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SINANOGLOU, V.J. et al. Lipid and fatty acid profile of the edible fungus *Laetiporus sulphureus*. Antifungal and antibacterial properties. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 6, p. 3264-3272, 2015.

SINGAL, P. K.; DEALLY, C. M. R.; WEINBERG, L. E. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 19, n. 8, p. 817-828, 1987.

SKONECZNA, A.; KANIAK, A.; SKONECZNY, M. Genetic instability in budding and fission yeast—sources and mechanisms. **FEMS microbiology reviews**, v. 39, n. 6, p. 917-967, 2015.

SKUBITZ, K. M.; D'ADAMO D. R. Sarcoma. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 82, p. 1409–1432, 2007.

SLOTKIN, E. K.; PATWARDHAN, P. P.; VASUDEVA, S. D.; DE STANCHINA, E.; TAP, W. D.; SCHWARTZ, G. K. "MLN0128, an ATP-competitive mTOR kinase inhibitor with potent in vitro and in vivo antitumor activity, as potential therapy for bone and soft-tissue sarcoma." **Molecular cancer therapeutics**, v.14, p.395-406, 2015.

SMELAND, S.; BRULAND, Ø. S.; HJORTH, L.; BROSIÖ, O.; BJERKEHAGEN, B.; ÖSTERLUNDH, G.; ALVEGAARD, T. A. Results of the Scandinavian Sarcoma Group XIV protocol for classical osteosarcoma: 63 patients with a minimum follow-up of 4 years. **Acta orthopaedica**, v. 82, n. 2, p. 211-216, 2011.

SMETANINA, O.F. Indole alkaloids produced by a marine fungus isolate of *Penicillium janthinellum* Biourge. **Journal of Natural Products**, v. 70, p.906-9, 2007.

SPEYER, C. L.; NASSAR, M. A.; HACHEM, A. H.; BUKHSH, M. A.; JAFRY, W. S.; KHANSA, R. M.; GORSKI, D. H. Riluzole mediates anti-tumor properties in breast cancer cells independent of metabotropic glutamate receptor-1. **Breast cancer research and treatment**, v. 157, n. 2, p. 217-228, 2016.

SOLONESKI, S.; NIKOLOFF, N.; LARRAMENDY, M. L. Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulations: Endo III and Fpg alkaline comet assays in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 797, p. 46-52, 2016.

SONG, H.; WANG, R.; WANG, S.; LIN, J. A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 13, p. 4700-5, 2005.

SOUZA, B. A. de O.; SIQUEIRA, C. S. Abordagem das neoplasias malignas com enfoque nos sarcomas de partes moles do tipo rabdomiossarcoma. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 35, n. 2, p. 19-25, 2014.

SPARANO, JA.; KILUK, JV; WINDLE, ML; BRADEN, CD. Breast Cancer Treatment Protocols. **Medscape**. 2018.

SPORN, M. B.; LIBY, K. T. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 2, n. 10, p. 518, 2005.

SPRAGUE, B.L.; TRENTHAM-DIETZ, A.; REMINGTON, P.L. The contribution of postmenopausal hormone use cessation to the declining incidence of breast cancer. **Cancer Causes & Control**, v. 22, n. 1, p.125-134, 2011.

SPURRELL, E.L.; FISHER, C.; THOMAS, J.M.; JUDSON, I.R. Prognostic factors in advanced synovial sarcoma: an analysis of 104 patients treated at the Royal Marsden Hospital. **Annals of Oncology**, v. 16, p. 437 – 44, 2005.

STANG, M.; BRENDAMOUR, M.; SCHUNCK, C.; WITTE, I. Automated analysis of DNA damage in the high-throughput version of the comet assay. **Mutation Research**, v. 698, p. 1-5, 2010.

- STEPHEN, D.W.; JAMIESON, D.J. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology letters**, v. 141, n. 2-3, p.207-212, 1996.
- STEEN, S.; STEPHENSON, G. Current treatment of soft tissue sarcoma. **In Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 21, n. 4, p. 392-396, 2008.
- STEENKAMP, E.T; WRIGTH, J.; BALDAUF, S.L. The prokaryotic origins of animals and fungi. **Molecular Biology and Evolution**, v.23, p.93-106, 2006.
- STILLER, C.A.; TRAMA, A.; SERRAINO, D.; ROSSI, S.; NAVARRO, C.; CHIRLAQUE, M.D.; CASALI, P.G.; RARECARE Working Group. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 3, p. 684-95, 2013.
- STRAUSS, S.J.; WHELAN, J.S. Current questions in bone sarcomas. **Current Opinion in Oncology**, v.30, p. 252-9, 2018.
- SUIZU, T.; TSUTSUMI, H.; OHTAKE, Y.; KAWADO, A.; IMAYASU, S.; KIMURA, A.; MURATA, K. Absolute glutathione requirement for sporulation of a yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 205, n. 2, p.1151-1155, 1994.
- SUGIURA, K.; STOCK, C.C. Studies in a tumor spectrum. I. Comparison of the action of methylbis (2-chloroethyl)amine and 3-bis(2-chloroethyl)aminomethyl-4-methoxymethyl -5-hydroxy-6-methylpyridine on the growth of a variety of mouse and rat tumors. **Cancer**, v.5, p.382-402,1952.
- SULTAN, I.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; SAAB, R.; YASIR, S.; CASANOVA, M.; FERRARI, A. Comparing children and adults with synovial sarcoma in the Surveillance, Epidemiology, and End Results program, 1983 to 2005: an analysis of 1268 patients. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 115, n. 15, p. 3537-3547, 2009.
- SULTAN, I.; CASANOVA, M.; AL-JUMAILY, U.; MEAZZA, C.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; FERRARI, A. Soft tissue sarcomas in the first year of life. **European Journal of Cancer**, v.46, n.13, p.2449–2456, 2010.
- SULLIVAN, R.; SMITH, J.E.; ROWAN, N.J. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. **Perspectives in biology and medicine**, v. 49, n. 2, p.159-170, 2006.
- SUZUKI, K.; NAKAMURA, S.; MORIMOTO, M.; FUJII, K.; NODA, N.N.; INAGAKI, F.; OHSUMI, Y. Proteomic profiling of autophagosome cargo in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS one**, v. 9, n. 3, p. 91651, 2014.
- SUNG, J. E.; KIM, J. E.; LEE, H. A.; YUN, W. B.; CHOI, J. Y.; LEE, M. R.; KIM, K. S. Comparison of therapeutic responses to an anticancer drug in three stocks of ICR mice derived from three different sources. **Laboratory Animal Research**, v.33, p. 187-194, 2007.
- TA, H.T.; DASS, C.R.; CHOONG, P.F.; DUNSTAN, D.E. Osteosarcoma treatment: state of the art. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.28, p.247–263, 2009.

TAKAMIZAWA, A.; MATSUMOTO, S.; IWATA, T.; TOCHINO, Y.; KATAGIRI, K.; YAMAGUCHI, K. Studies on cyclophosphamide metabolites and their related compounds. 2. Preparation of an active species of cyclophosphamide and related compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 376-83, 1975.

TAKASAWA, H.; TAKASHIMA, R.; NARUMI, K.; KAWASAKO, K.; HATTORI, A.; KAWABATA, M. et al. Results of the International Validation of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: Individual data for 1,2-dibromoethane, p-anisidine, and o-anthranilic acid in the 2nd step of the 4th phase Validation Study under the JaCVAM initiative. **Mutation Research**, v.786–788, p. 144-150, 2015.

TAME, M.A.; MANJÓN, A.G.; BELOKHVOSTOVA, D.; RAAIJMAKERS, J.A.; MEDEMA, R.H. TUBB3 overexpression has a negligible effect on the sensitivity to taxol in cultured cell lines. **Oncotarget**, v. 8, p. 71536–47, 2017.

TAMULSKI, T.S.; MORREAL, C.E.; DAO, T.L. Comparative metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in liver and mammary tissue. **Cancer Research**, v.33, p. 3117-3122, 1973.

TAMURA, G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 12, n. 2, p. 192, 2006.

TAN, C.S.; GILLIGAN, D.; PACEY, S. Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 9, p.e447-e459, 2015.

TARNOWSKI, G.S.; MOUNTAIN, I.M.; STOCK, C.C. Influence of genotype of host on regression of solid and ascitic forms of sarcoma 180 and effect of chemotherapy on the solid form. **Cancer Research**, v.33, p. 1885-1888, 1973.

TAVASSOLI, F.; DEVILEE, P. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, **Breast Cancer Breast Care**, v.12, p.1-7, 2017.

TAVASSOLI, F.; DEVILEE, P., 2017. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, **Breast Cancer Breast Care**, v. 12, p. 1-7, 2003.

TAYLOR, B.S.; BARRETINA, J.; MAKI, R.G.; ANTONESCU, C.R.; SINGER, S.; LADANYI, M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 8, p. 541-557, 2011.

TEICHER, B.A. Tumor models for efficacy determination. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p.2435-2443, 2006.

TEICHER, B.A.; FREI, E. Laboratory models to evaluate new agents for the systemic treatment of lung cancer. In: Skarin AT, editor. Multimodality treatment of lung cancer. **New York: Marcel Dekker, Inc.** p. 301–36, 2000.

TELES, K. A.; MEDEIROS-SOUZA, P.; LIMA, F. A. C.; ARAÚJO, B. G. D.; LIMA, R. A. C. Cyclophosphamide administration routine in autoimmune rheumatic diseases: a review. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 57, n. 6, p. 596-604, 2017.

THOMAS, P.; WU, J.; DHILLON, V.; FENECH, M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 69-76, 2011.

THOMPSON, H. J.; SINGH, M. Rat models of premalignant breast disease. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 5, n. 4, p. 409-420, 2000.

TOKUNAGA, E.; ODA, S.; FUKUSHIMA, M.; MAEHARA, Y.; SUGIMACHI, K. Differential growth inhibition by 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cell lines. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 15, p.1998-2006, 2000.

TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L.; JIANG, R.; TIAN, D.; SUN, X. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p.1682-1686, 2009.

TICE R. Editorial Preface. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 1, p. 786–788, 2015.

TODOROVA, M.; TRENDAFILOVA, A. *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. **J Ethnopharmacol**, v.152, p.256-265, 2014.

TOMASETTI, C.; LI, L.; VOGELSTEIN, B.. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330-1334, 2017.

TORRES-BUGARÍN, O.; ZAVALA-CERNA, M. G.; NAVA, A.; FLORES-GARCÍA, A.; RAMOS-IBARRA, M. L. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. **Disease markers**, 2014.

TOUAHRI, H.G.; BOUTIBA, Z.; BENGUEDDA, W.; SHAPOSHNIKOV, S. Active biomonitoring of mussels *Mytilus galloprovincialis* with integrated use of micronucleus assay and physiological indices to assess harbor pollution. **Marine pollution bulletin**, v. 110, n. 1, p. 52-64, 2016.

TRAHAIR, T.; ANDREWS, L.; COHN, R.J. Recognition of Li Fraumeni syndrome at diagnosis of a locally advanced extremity rhabdomyosarcoma. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 48, n. 3, p. 345-348, 2007.

TSARKOVA, A.S.; DUBINNYI, M.A.; BARANOV, M.S.; OGUIENKO, A.D.; YAMPOLSKY, I.V.. Nambiscalarane, a novel sesterterpenoid comprising a furan ring, and other secondary metabolites from bioluminescent fungus *Neonothopanus nambi*. **Mendeleev Communications**, v. 26, n. 3, 191-2, 2016.

TUBBS, A.; NUSSENZWEIG, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. **Cell**, v. 168, p. 644-56, 2017.

TVEIT, K.M.; PIHL, A. Do cell lines in vitro reflect the properties of the tumours of origin? A study of lines derived from human melanoma xenografts. **British Journal of Cancer**, v. 44, p.775-86, 1981.

URIOL, E.; SIERRA, M.; COMENDADOR, M.A.; FRA, J. Long-term biomonitoring of breast cancer patients under adjuvant chemotherapy: the comet assay as a possible predictive factor. **Mutagenesis**, v. 28, p. 39-48, 2013.

VAGHEF, H.; NYGREN, P.; EDLING, C.; BERGH, J.; HELLMAN, B. Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. **Mutation Research**, v. 395, p. 127-38, 1997.

VAIDYA, A.M.; CHETLEN, A.L.; SCHETTER, S.E. Does a High-Risk Recommendation in Mammography Reports Increase Attendance at a Breast Cancer Risk Assessment Clinic **Journal of the American College of Radiology**, v. 12, p. 923-9, 2015.

VALADARES, M.C.; CASTRO, N.C.D.; CUNHA, L.C.D. Synadenium umbellatum: cytotoxicity and DNA damage to bone marrow cells from mice. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 631-8, 2007.

VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; RANGEL, J.; RIBEIRO, B.; SILVA, B. M.; BAPTISTA, P.; SEABRA, R. M. Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4925-31, 2005.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research**, v. 681, p. 93-109, 2009.

VANEL, D.; SHAPEERO, L. G.; DE BAERE, T.; GILLES, R.; TARDIVON, A.; GENIN, J.; GUINEBRETIERE, J. M. MR imaging in the follow-up of malignant and aggressive soft-tissue tumors: results of 511 examinations. **Radiology**, v.190, p. 263–268, 1994.

VAYSSE, C.; LØMO, J.; GARRED, Ø.; FJELDHEIM, F.; LOFTEROED, T.; SCHLICHTING, E.; FAGERLAND, M. W. Inflammation of mammary adipose tissue occurs in overweight and obese patients exhibiting early-stage breast cancer. **NPJ Breast Cancer**. v.3, 2017.

VAZ, J. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; SANTOS-BUELGA, C.; VASCONCELOS, M. H.; FERREIRA, I. C. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 610–616, 2011.

VENTURA, F.F.; SILVA, R.T.P.; STEVANIA, C.V. História do Fungo Bioluminescente Flor-de-Coco (*Neonothopanus gardneri*) e Efeitos das Condições de Cultura Sobre a Emissão de Luz. **Revista Virtual de Química**. v. 7, n.1, p. 41-55. 2015.

VETA, M.; PLUIM, J.P.; VAN DIEST, P.J.; VIERGEVER, M.A. Breast cancer histopathology image analysis: A review. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 61, n. 5, p.1400-11, 2014.

VEYRAND, B.; SIROT, V.; DURAND, S.; POLLONO, C.; MARCHAND, P.; DERVILLY-PINEL, G.; LE BIZEC, B. Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Results of the second French total diet study. **Environment international**, v.54, p.11-17, 2013.

VILLELA, I.V. ; LAU, A. ; SILVEIRA, J. ; PRA, D. ; ROLLA, H.C. ; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP (Orgs.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. p.145-163, 2003.

- VINCENT T.L.; GATENBY R.A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, v. 32, p. 729-37, 2008.
- VINOTHINI, G.; MURUGAN, R.S; NAGINI, S. Evaluation of molecular markers in a rat model of mammary carcinogenesis. **Oncology Research**. v.17, p. 483–493, 2009.
- VON MINCKWITZ, G. Neoadjuvant Therapy: What are the Lessons so far? **Hematology/Oncology Clinics**, v. 27. n. 4, p. 767-784, 2013.
- VOROBIOF, D.A.; RAPOPORT, B.L.; CHASEN, M.R.; SLABBER, C.; MCMICHAEL, G.; EEK, R.; MOHAMMED, C. First line therapy with paclitaxel (Taxol) and pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in patients with metastatic breast cancer: a multicentre phase II study. **Breast**, v. 13, n. 3, p. 219-26, 2004.
- VOULGARIDOU, G.P.; ANESTOPOULOS, I.; FRANCO, R.; PANAYIOTIDIS, M.I.; PAPPA, A. DNA damage induced by endogenous aldehydes: current state of knowledge. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1-2, p. 13-27, 2011.
- VRIENS, B. E.; AARTS, M. J.; DE VRIES, B.; VAN GASTEL, S. M.; WAL, J.; SMILDE, T. J.; TJAN-HEIJNEN, V. C. Doxorubicin/cyclophosphamide with concurrent versus sequential docetaxel as Doxorubicin/cyclophosphamide with concurrent versus sequential docetaxel as neoadjuvant treatment in patients with breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 15, p. 3102-3110, 2013.
- WAL, R.; SATO, D.; OLIVEIRA, C.C.; LOPES, L.; OLIVEIRA, S.M; DIBERNARDI, R.P; GEHRKE, S.; PALAURO, F.R.; BUCHI, D.F. Immunomodulation in Sarcoma-180 Bearing Mice. **Cell and Molecular Biology of Cancer**, v. 34, 2002.
- WALLACH, J.; KANNAAN, S. **Interpretação de Exames Laboratoriais**, 7 edição. *Sao Paulo: Editora Medsi.*, 2003.
- WANG, X.; LI, S. Protein mislocalization: mechanisms, functions and clinical applications in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1846, n. 1, p. 13-25, 2014.
- WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 3, p. 293-300, 2001.
- WANG, J.; CHEN, S.; XU, S.; YU, X.; MA, D.; HU, X.; CAO, X. In vivo induction of apoptosis by fucoxanthin, a marine carotenoid, associated with down-regulating STAT3/EGFR signaling in sarcoma 180 (S180) xenografts-bearing mice. **Marine drugs**, v. 10, n. 9, p. 2055-2068, 2012
- WARDELMANN, E.; SCHILDHAUS, H.U.; MERKELBACH-BRUSE, S.; HARTMANN, W.; REICHARDT, P.; HOHENBERGER, P.; BÜTTNER, R. Soft tissue sarcoma: from molecular diagnosis to selection of treatment. Pathological diagnosis of soft tissue sarcoma amid molecular biology and targeted therapies. **Annals of Oncology**, v.21, n.7, pp. 265-269, 2010.
- WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 10, p. 13-32, 2002.

WASSER, S.P.; WEIS, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews™ in Immunology**, v.19, p.65-96, 1999.

WASSER, S.P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 12, n. 1, 2010.

WEBER, A.M.; RYAN, A.J. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. **Pharmacology & therapeutics**, v. 149, p. 124-138, 2015.

WEIGELT, B.; BAEHNER, F.L.; REIS-FILHO, J.S. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 220, n. 2, p. 263-80, 2010.

WEIGELT, B.; GEYER, F.C.; HORLINGS, H.M.; KREIKE, B.; HALFWERK, H.; REIS-FILHO, J.S. Mucinous and neuroendocrine breast carcinomas are transcriptionally distinct from invasive ductal carcinomas of no special type. **Modern Pathology**, v. 22, n. 11, p. 1401, 2009.

WEIGELT, B.; KREIKE, B.; REIS-FILHO, J. S. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. **Breast cancer research and treatment**, v. 117, n. 2, p. 273-280, 2009.

WEISS, S.W.; GOLDBLUM, J.R. Enzinger and Weiss's soft tissue tumors. **Mosby, St. Louis, MO**, p.1622, 2001.

WHO- World Health Organization - **Cancer Country Profiles**, 2014.

WHO, U. UNFPA, The World Bank. **Trends in maternal mortality: 1990 to 2010**. World Health Organization, UNICEF, UNFPA, and The World Bank., 2012.

WOLIN, K.Y.; CARSON, K.; COLDITZ, G.A. Obesity and cancer. **The oncologist**, v. 15, n. 6, p. 556-65, 2010.

WOO, J.R.; LISS, M.A.; MULDONG, M.T.; PALAZZI, K.; STRASNER, A.; AMMIRANTE, M.; VARKI, N.; SHABAIK, A.; HOWELL, S.; KANE, C.J.; KARIN, M. Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 30, 2014.

WU, S.; POWERS, S.; ZHU, W.; HANNUN, Y.A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, v.529, p. 43–7, 2016.

YAHAYA, N.F.M.; RAHMAN, M.A.; ABDULLAH, N. Therapeutic potential of mushrooms in preventing and ameliorating hypertension. **Trends in food science & technology**, 39(2), pp.104-115, 2014.

YAMAMOTO, H.; PEREZ-PITEIRA, J.; YOSHIDA, T.; TERADA, M.; ITOH, F.; IMAI, K.; PERUCHO, M. Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features. **Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1348-1357, 1999.

YANG, Y.; LEI, Z.; HUANG, L.; YANG, F.; ZHANG, N.; YUAN, J.; LI, K.; CHEN, J.; ZHANG, J. Antitumor Ability of Berberine Accompanied by Modulation of Gut Microbiome

in Sarcoma-180 Tumor-bearing Mice. **International Journal of Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 460-70, 2018.

YASKO, A.W. Surgical management of primary osteosarcoma. **Cancer Treatment and Research**, v.152, p.125-45, 2009.

YI, R.; QI, Y. C.; ZHAO, X.; PARK, K. Y. Anti-tumor activities of bamboo salt on sarcoma 180 tumor-bearing BALB/c mice. **Biomedical Research**, v.28, 2017.

YOUN, P.; MILANO, M. T.; CONSTINE, L. S. Long-term cause-specific mortality in survivors of adolescent and young adult bone and soft tissue sarcoma: a population-based study of 28,844 patients. **Cancer**, v. 120, p. 2334–2342, 2014.

YUE, P.; LOPEZ-TAPIA, F.; PALADINO, D.; LI, Y.; CHEN, C. H.; NAMANJA, A. T.; TURKSON, J. Ácido hidroxâmico e inibidores STAT3 à base de ácido benzóico suprimem fenótipos de glioma e de cancro da mama in vitro e in vivo. **Cancer Research**, v. 76, p. 652-63, 2016.

ZAIMAN, B.Z.; YASSIN, M.; MAHAJNA, J.; WASSER, S.P. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 4, p. 453-68, 2005.

ZAJICEK, G. Cancer as a systemic disease. **Medical hypotheses**, v. 4. n. 3, p. 193-207, 1978.

ZAPATA, L.M.; BOCK, B.C.; OROZCO, L.Y.; PALACIO, J.A. Application of the Micronucleus Test and Comet Assay in *Trachemys callirostris* Erythrocytes as a Model for in Situ Genotoxic Monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.127, p. 108-16, 2016.

ZEIGER, E.; GOLLAPUDI, B.; AARDEMA, M.J.; AUERBACH, S.; BOVERHOF, D.; CUSTER, L.; DEDON, P.; HONMA, M.; ISHIDA, S.; KASINSKI, A.L.; KIM, J.H.. Opportunities to integrate new approaches in genetic toxicology: An ILSI-HESI workshop report. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 56, n. 3, p. 277-85, 2015.

ZHANG, S.R.; YANG, J.K.; XIE, J.K.; ZHAO, L.C. Long noncoding RNA HOTTIP contributes to the progression of prostate cancer by regulating HOXA13. **Cellular and Molecular Biology**, v. 62, n. 3, p. 84-8, 2016.

ZHANG, J.; ZHAO, X.; ZHAO, L.Q.; ZHAO, J.; QI, Z.; WANG, L.A. A Primary Study of the Antioxidant, Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Antitumor Activities of Ethanol Extract of Brown Slimecap Mushroom, *Chroogomphus rutilus* (Agaricomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 19, n. 10, 2017.

ZHAO, Y.; MOON, E.; CARPENITO, C.; PAULOS, C.M.; LIU, X.; BRENNAN, A.L. et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. **Cancer Research**, v. 70, p.9053-61, 2010.

ZHENG, Y.; WANG, W.D.; LI, Y. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Trametes orientalis*. **Carbohydrate polymers**, v.131, p. 248-54, 2015.

ZHOU, Y.; FU, X.; HE, D.; ZOU, X.; WU, C.; GUO, W, et al. Evaluation of urinary metal concentrations and sperm DNA damage in infertile men from an infertility clinic. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 45, p. 68–73, 2016.

ZHU, W.; WANG, Z.; TANG, W.W.; HAZEN, S.L. Gut microbe-generated trimethylamine N-oxide from dietary choline is prothrombotic in subjects. **Circulation**, v. 135, n. 17, p.1671-3, 2017.

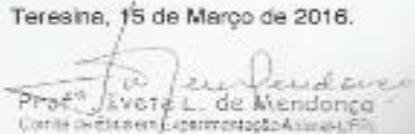
ZHU, Y.W.; FENG, T.B.; ZHOU, X.J.; HU, X.L.; DING, J.; ZHU, W.Y.; QIAN, D.P.; SUN, Y.W. Routine hemostasis and hemogram parameters: valuable assessments for coagulation disorder and chemotherapy in cancer patients. **Chinese medical journal**, v. 129, n. 15, p.1772, 2016.

ZOCHER, R.; WECKWERTH, W.; HACKER, C.; KAMMER, B.; HORNBOKEN, T.; EWALD, D. Biosynthesis of Taxol: enzymatic acetylation of 10 deacetylbaccatin III to baccatin III in crude extracts from roots of it *Taxus baccata*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**.v. 229, p. 16–20, 1996.

# *ANEXOS*

---

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – UFPI

 <b>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO</b> <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ</b> <b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> <b>COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</b> <small>Campus Universitário Ministro Petrônio Portillo, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. CEP 64049-900 Telefone (085) 3215-5734 _e-mail: ceaepl@ufpi.edu.br</small>													
<b>CERTIFICADO</b>													
<p>Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da atividade antileishmania, antiesquistossoma, antitumoral e genotóxica do cogumelo bioluminescente <i>Neonothopanus gardneri</i>", protocolo nº 132/16, sob a responsabilidade da Profa. Dra. <b>ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE</b> – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi <b>Aprovado</b> pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data <b>15/03/2016</b>.</p>													
<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td>Vigência do Projeto</td><td>Abril/ 2016 à Dezembro/ 2017</td></tr><tr><td>Espécie/Linhagem</td><td>1. Camundongo Balb/c; 2. Camundongo Swiss.</td></tr><tr><td>Nº de Animais</td><td>70</td></tr><tr><td>Peso/ Idade</td><td>20 a 30 g/ ±2 meses;</td></tr><tr><td>Sexo</td><td>1.10 (fêmeas); 2.60 (fêmeas).</td></tr><tr><td>Origem</td><td>Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa em plantas Medicinais-NPPM/UFPI.</td></tr></table>	Vigência do Projeto	Abril/ 2016 à Dezembro/ 2017	Espécie/Linhagem	1. Camundongo Balb/c; 2. Camundongo Swiss.	Nº de Animais	70	Peso/ Idade	20 a 30 g/ ±2 meses;	Sexo	1.10 (fêmeas); 2.60 (fêmeas).	Origem	Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa em plantas Medicinais-NPPM/UFPI.	
Vigência do Projeto	Abril/ 2016 à Dezembro/ 2017												
Espécie/Linhagem	1. Camundongo Balb/c; 2. Camundongo Swiss.												
Nº de Animais	70												
Peso/ Idade	20 a 30 g/ ±2 meses;												
Sexo	1.10 (fêmeas); 2.60 (fêmeas).												
Origem	Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa em plantas Medicinais-NPPM/UFPI.												
<p>Teresina, 15 de Março de 2016.</p> <p style="text-align: center;"> Prof.<sup>a</sup> Evete L. de Mendonça Comitê de Ética em Experimentação Animal/UFPI Coordenadora</p> <p style="text-align: right;">116</p>													