



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

- PONTO FOCAL -

BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DO FITOL COMO AGENTE ANTITUMORAL

MARCUS VINÍCIUS OLIVEIRA BARROS DE ALENCAR

TERESINA – PI

2017

MARCUS VINÍCIUS OLIVEIRA BARROS DE ALENCAR

BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DO FITOL COMO AGENTE ANTITUMORAL

Tese 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 obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora:

Profª. Drª. Ana Amélia C. Melo Cavalcante

Área e Linha de Pesquisa

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

TERESINA – PI

2017

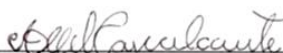
MARCUS VINÍCIUS OLIVEIRA BARROS DE ALENCAR

BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DO FITOL COMO AGENTE ANTITUMORAL

Tese 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 obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovado em 09/11/17

BANCA EXAMINADORA



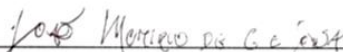
Profª. Drª. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Presidente da Banca – Universidade Federal do Piauí



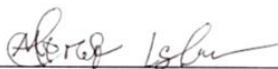
Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Examinador Interno (RENORBIO) – Universidade Federal do Piauí



Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

Examinador Externo – Universidade Federal do Piauí



Prof. Dr. Muhammad Torequl Islam

Examinador Externo – Universidade Federal do Piauí



Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes

Examinador Externo – Universidade Federal do Piauí

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jomalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

A338b Alencar, Marcus Vinícius Oliveira Barros de .
 Bioprospecção farmacológica do fitol como agente
 antitumoral / Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, 2017.
 122f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de
do Piauí, 2017.
"Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Ana Amélia C. Melo Cavalcante."

1. Fitol. 2. Câncer de Mama. 3. Ensaio Cometa. 4. Teste de
Micronúcleos. 5. Apoptose. 6. Necrose. I. Título.

CDD 616.85

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimateia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profª. Dra. Nadir Nascimento Nogueira

PRÓ-REITORA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Profª. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profª. Dra. Carla Maria de Carvalho Leite

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA/RENORBIO –

PONTO FOCAL – UFPI

Profª. Dra. Carla Eiras

Cresça! Embora os estímulos cessem.

Insista! Para que as cadeias se quebrem.

Resista! Até que a vida seja teu limite.

Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, 2017

Com todo meu respeito, admiração e amor, dedico essa tese ao meu pai **Valmir Rodrigues de Alencar**, e minha mãe **Débora Oliveira Barros de Alencar** (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

As vicissitudes da vida, sem dúvidas, moldam o ser humano. E nesse processo de construção, que por vezes parece tão sofrido, contamos com o auxílio de personagens essenciais. São estes indivíduos que merecem todo o crédito. A seguir, faço breves reconhecimentos nominais, que podem ser estendidos a todos que contribuíram com esta obra.

“Ó profundidade da riqueza, da sabedoria e do conhecimento de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos!” Citando este verso do livro de Romanos 11:33, agradeço a **Jesus Cristo**, pelo entendimento, paciência, vigor e saúde concedida, acompanhada de muitas bênçãos durante esta etapa de minha vida.

À minha orientadora *sui generis* **Profª. Drª. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante**, por seus esforços para me transformar num pesquisador. Sua liderança, humanidade e confiança são modelos, doravante, que levarei por toda a vida.

Aos meus pais **Valmir Alencar** e **Débora Alencar** (*in memoriam*), pelos ensinamentos transmitidos com muito amor. Não há palavras suficientes neste mundo, que expressem minha gratidão a eles.

À minha família, a qual agradeço em nome dos meus irmãos **Felipe Alencar** e **Daniele Alencar**, nossa cumplicidade e companheirismo nos manteve firmes frente às tempestades. Estamos sempre em marcha!

Aos meus amigos do **Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica – LAPGENIC**, sem eles, não seria possível concluir esta obra. Destaco a essencial contribuição do meu irmão científico **Muhammad Torequl Islam**, por seus esforços no desenvolvimento de artigos e pelos momentos de filosofia gratuita.

Às minhas irmãs científicas **Márcia Fernanda Correia Jardim Paz**, **Kátia Machado**, **Keylla Machado** e **Ana Maria da Mata**, uma equipe eficiente para todo estudo. Vos amo com todo o coração.

Aos meus amigos **José Victor**, **Rosália Lima**, **Antonielly Reis**, **José Williams**, **Júnior Gomes** e **Débora Cássia**. Vivemos “aventuras e desventuras”, mas sobrevivemos.

Às minhas alunas **Luiza Alves, Caroline Milanez, Bárbara Cavalcante, Joselha Cássia e Ana Maria Gomes**, que tiveram participação fundamental nos experimentos realizados neste trabalho.

Ao meu amigo **Dr. Germano Pinho de Moraes**, pela ajuda a tempo e fora de tempo, mesmo antes de iniciar o doutorado. Uma amizade por toda a vida.

Aos professores **Dr. João Marcelo de Castro e Sousa, Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira e Dr. Gilberto Santos Cerqueira**, pelas colaborações fundamentais para esta obra.

Às minhas amigas do RENORBIO, **Deusilene e Eliane**, pela ajuda na resolução dos mais variados problemas.

À agência de fomento para pesquisa **CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro para realização dos experimentos neste estudo.

Por fim, faço menção aos animais experimentais. Por meio deles, conseguimos resultados que cedo, ou tarde, impactam na nossa vida.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A-549: linhagem de carcinoma pulmonar humano
ABL1: Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ACMSD: aminocarboxymuconate semialdehyde decarboxylase
AIF: fator indutor de apoptose
ALT: alanina aminotransferase
AST: aspartato aminotransferase
ATM: ataxia telangiectasia mutada
ATP: trifosfato de adenosina
BRIP1: BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
BUB1: budding uninhibited by benzimidazoles 1
CA: teste de campo aberto
C-6: linhagem de glioma humano
CB: combretastatinas
CCR: câncer colorretal
CM: câncer de mama
CPA: ciclofosfamida
CPT: camptotecinas
DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
Dox: doxorubicina
ERN's: espécies reativas de nitrogênio
ERO's: espécies reativas de oxigênio
FA: ácido fitânico
FD: frequência de danos
FDA: Food and Drug Administration
FIT: fitol
GSH: glutationa
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HAP: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HCM: hemoglobina corpuscular média
HHT: homoharringtonine

HL-60: leucemia promielocítica aguda
ID: índice de danos
IDN: índice de divisão celular
IDNC: índice de divisão nuclear considerando apoptose e necrose
MN: micronúcleos
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OH: grupo hidroxila
•OH: radical hidroxila
PARP: poli-(ADP-ribose) polimerase
PPAR α : receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa
OR: odds ratio
RR: teste rota rod
S180: sarcoma 180
SOD: superóxido dismutase
TP53: tumor protein P53
VCM: volume corpuscular médio

LISTA DE TABELAS E QUADROS

REFERENCIAL TEÓRICO	
Quadro 1. Processos de resposta aos danos ao DNA envolvidos na carcinogênese.	31
CAPÍTULO 1	
Tabela 1. Efeitos citotóxicos, anticancerígenos e antitumorais atribuídos ao FIT e AF <i>in vitro</i> .	118
Tabela 2. Atividades tóxica, citotóxica, imunomoduladora e imunoestimulante atribuídas ao FIT e AF em estudos <i>in vivo</i> .	121
CAPÍTULO 2	
Tabela 1. Perfil de ração diária após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos <i>Wistar</i> .	137
Tabela 2. Perfil comportamental e locomotor após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos <i>Wistar</i> .	138
Tabela 3. Parâmetros hematológicos após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos <i>Wistar</i> .	140
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos <i>Wistar</i> .	141
Tabela 5. Perfil do peso de órgãos após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos <i>Wistar</i> .	143
Tabela 6. Relatório do sumário de urina após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos <i>Wistar</i> .	144
Tabela 7. Avaliação genotóxica e capacidade de reparo de DNA em linfócitos de sangue periférico e medula óssea de ratos tratados de forma aguda (300 e 2000 mg/kg) com fitol.	145
Tabela 8. Correlação de <i>Pearson</i> entre os parâmetros comportamentais e biomarcadores citogenéticos para instabilidade genética induzida pelo fitol em ratos tratados de forma aguda e subcrônica.	148
CAPÍTULO 3	
Tabela 1. Danos citogenéticos do FIT avaliados em cultura primária de S180 após 72h de exposição por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.	171
Tabela 2. Danos citogenéticos do FIT avaliados em linhagem HL-60 após 72h de exposição por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.	172
CAPÍTULO 4	
Tabela 1. Perfil comportamental e atividade locomotora de camundongos fêmeas, durante 7 semanas de tratamento com azeite e DMBA, e terapias com CPA e FIT.	192
Tabela 2. Perfil hematológico e bioquímico de camundongos fêmeas, após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com FIT.	193
Tabela 3. Estudo de reparo de danos ao DNA, em linfócitos de sangue periférico de camundongos fêmeas, durante a indução do câncer de mama com DMBA (avaliação da 1ª, 3ª e 7ª semanas de tratamento) e terapia com FIT (6ª e 7ª semanas).	199

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	
Figura 1. Esquema representativo da subdivisão da tese.	22
REFERENCIAL TEÓRICO	
Figura 1. Esquema ilustrativo de um microambiente tumoral típico.	32
Figura 2. Principais agentes quimioterapêuticos derivados de organismos marinhos.	49
Figura 3. Principais agentes quimioterapêuticos derivados de micro-organismos.	53
Figura 4. Principais agentes quimioterapêuticos derivados de plantas terrestres.	56
Figura 5. Principais efeitos do diterpenoide FIT em modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	67
CAPÍTULO 1	
Figura 1. Estratégia de seleção dos estudos.	106
Figura 2. <i>Forest plot</i> da associação entre FIT e citotoxicidade em estudos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> .	107
Figura 3. Atividades do FIT em estudos <i>in vitro</i> (A) e <i>ex vivo</i> (B).	108
Figura 4. Mecanismos de ação descritos para o FIT em estudos <i>in vitro</i> .	109
Figura 5. Mecanismos de ação descritos para o FIT em estudos <i>ex vivo</i>	110
Figura 6. <i>Forest plot</i> da associação entre FIT e toxicidade em estudos <i>in vivo</i> .	111
Figura 7. Atividades do FIT em estudos <i>in vivo</i> .	112
Figura 8. Mecanismos de ação descritos para o FIT em estudos <i>in vivo</i> .	113
Figura 9. Biossíntese de ácido fitânico.	114
Figura 10. Resumo dos mecanismos propostos para indução de apoptose e necrose pelo FIT, a partir de diferentes estudos.	117
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Análise histopatológica do efeito do tratamento agudo e subcrônico do fitol em fígado de ratos <i>Wistar</i> .	142
Figura 2. Índice de Danos em ratos tratados com fitol	146
Figura 3. Frequência de Danos em ratos tratados com fitol	146
Figura 4. Genotoxicidade do fitol (4,72; 7,08 e 14,16 mM), em exposição <i>ex vivo</i> a linfócitos de sangue periférico de ratas, pelo aumento do índice (A) e frequência de danos ao DNA (B), em comparação ao peróxido de hidrogênio.	147
CAPÍTULO 3	
Figura 1. Viabilidade celular avaliada pelo teste de exclusão por azul de Tripán em S180 e ensaio MTT em HL-60 após 72 h de exposição.	168
Figura 2. Genotoxicidade em cultura primária de S180 após 72 h de exposição.	169
Figura 3. Perfil fotomicrográfico de cultura primária de S180 no ensaio cometa.	169
Figura 4. Genotoxicidade do fitol, por mecanismos associados a danos oxidativos, em cultura primária de S180 cotratada com peróxido de hidrogênio.	170
Figura 5. Perfil fotomicrográfico de Sarcoma 180 tratada com fitol (14,16 μ M) no teste CBMN.	171
Figura 6. Perfil fotomicrográfico de linhagem HL-60 tratadas com fitol (14,16 μ M) no teste CBMN.	172
Figura 7. Apoptose e necrose induzidas pelo fitol em cultura primária de S180 e linhagem HL-60, após 72h de exposição	173
CAPÍTULO 4	
Figura 1. Perfil histopatológico da mama direita de camundongos fêmeas, após 7 semanas de tratamento com DMBA (A, B e C) e terapia com fitol (D, E e F).	195
Figura 2. Perfil imuno-histoquímico de proliferação celular (Ki-67), analisado em mama direita de camundongos, após 7 semanas de indução do câncer com DMBA e terapia com fitol (14 mM/kg)	196
Figura 3. Perfil do peso de órgãos de camundongos fêmeas, após 7 semanas de tratamento com DMBA e terapia com fitol.	197
Figura 4. Estudo de genotoxicidade em células neoplásicas (mama) e não neoplásicas (medula óssea, fígado e linfócitos de sangue periférico) de camundongos fêmeas, após 7 semanas de indução do câncer com DMBA (6 mg/kg) e terapia com fitol (14 mM/kg).	198
Figura 5. Perfil de modulação induzido pelo fitol, na genotoxicidade produzida pelo DMBA em linfócitos de sangue periférico.	200
Figura 6. Avaliação do percentual de apoptose em diferentes tecidos de camundongos fêmeas, após 7 semanas de indução do câncer de mama com DMBA e terapia com fitol	200

ALENCAR, M.V.O.B. **Bioprospecção farmacológica do fitol como agente antitumoral**. Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 2017. 222 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

RESUMO

O fitol, (E,7R,11R) - 3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol, é um diterpenoide com diversas atividades farmacológicas e aplicabilidades biotecnológicas. Este estudo objetivou realizar uma revisão sistemática e meta-análise da associação do fitol com mecanismos antitumorais e avaliar seus efeitos toxicogenéticos em estudos experimentais em ratos *Wistar*, fêmeas, por meio dos testes de toxicidade aguda (300 e 2000 mg/kg, v.o.) e subcrônica (30, 60 e 90 mg/kg, v.o.), durante 14 e 28 dias, respectivamente, bem como suas atividades antitumorais *in vitro* em cultura primária de Sarcoma 180, em linhagem leucêmica HL-60 e em linfócitos de sangue periférico de ratos. O efeito antitumoral também foi verificado *in vivo* em modelo de carcinogênese induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno, por meio de análises da patologia clínica, anatomo e histopatológica, imunohistoquímica (Ki-67) e mecanismos citotóxicos e citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose, em células neoplásicas e não neoplásicas. Os resultados demonstraram associação entre fitol e toxicidade (OR: 1,47; IC 95% = 0,86-2,48), identificada entre estudos *in vivo*; e citotoxicidade (OR: 1,81; IC 95% = 1,12-2,65, $p < 0,05$), em estudos *in vitro* e *ex vivo*. Em estudos *in vitro*, 24% indicaram que o fitol, em altas concentrações, induz apoptose por vários mecanismos, enquanto que 40% dos estudos *ex vivo* apontaram sua ação na geração de espécies reativas de oxigênio. Nos estudos *in vivo*, 24% destacaram, entre os mecanismos de apoptose, a expressão de proteína *Bcl2* ou mutações na proteína pró-apoptótica *Bax*. Além disso, 8% dos estudos também apontaram necrose e hepatotoxicidade. No entanto, em 24% dos artigos, os mecanismos de toxicidade e citotoxicidade ainda não são bem compreendidos. No estudo toxicogenético do fitol, os resultados demonstraram que a administração aguda, em ratos, não produziu morte com DL_{50} acima de 2000 mg/kg. Entretanto, algumas alterações toxicológicas foram observadas em parâmetros da patologia clínica e neurofarmacológica, embora sem lesões histopatológicas hepáticas. Por outro lado, o fitol induziu genotoxicidade em todos os tratamentos em medula óssea, fígado, rim e sangue periférico, com ausência de atividade de reparo. Concomitantemente, não foi observada mutagenicidade em medula óssea, no tratamento agudo. Nos estudos em cultura primária de Sarcoma 180, linhagem HL-60 e linfócitos de sangue periférico de ratos, o fitol (4,72; 7,08 e 14,16 μ M), induziu citotoxicidade pela redução da viabilidade celular e dos índices de divisão celular, incluindo a apoptose e necrose. A genotoxicidade foi pontuada pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA, nos modelos testados. Similarmente, o fitol induziu mecanismos aneugênicos e/ou clastogênicos em Sarcoma 180 e em HL-60, por indução de micronúcleos e outras alterações nucleares, como também mecanismos relacionados à indução de danos oxidativos, como observado em linfócitos de sangue periférico. O fitol, em modelo animal de câncer de mama, não apresentou alterações hipocráticas e comportamentais, bem como não induziu alterações histopatológicas malignas em mama, nem expressiva marcação para Ki-67, comparado ao carcinógeno. Além disso, comparado à ciclofosfamida, o fitol induziu menos efeitos toxicogenéticos em células não tumorais, mas com significantes indução de apoptose e necrose em células neoplásicas de mama. Diante dos mecanismos citogenéticos evidenciados nos estudos não clínicos, é possível sugerir que o fitol tem potencial para formulações farmacêuticas antitumorais.

Palavras-chave: fitol, câncer de mama, ensaio cometa, teste de micronúcleos, apoptose, necrose.

ALENCAR, M.V.O.B. **Pharmacological bioprospection of phytol, as antitumoral agent**. Doctoral advisor: Prof^a. Dr^a. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 2017. 222 p. Doctoral thesis. Post-Graduate Program in Biotechnology. Northeast Network of Biotechnology – RENORBIO. Federal University of Piauí, Teresina.

ABSTRACT

Phytol, (E,7R,11R)-3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol, is a diterpenoid with various pharmacological activities and biotechnological applications. The aim of this study was to perform a systematic review and meta-analysis of the association of phytol with antitumor mechanisms and to assess their toxicogenic effects in experimental studies in female *Wistar* rats using acute toxicity tests (300 and 2000 mg/kg, p.o.) and (30, 60 and 90 mg/kg, p.o.) for 14 and 28 days, respectively, as well as their *in vitro* antitumor activities in primary culture of Sarcoma 180, leukemic HL-60 and rat peripheral blood lymphocytes. The antitumor effect was also verified *in vivo* in a 7,12-dimethylbenzanthracene-induced carcinogenesis model, through clinical, anatomical and histopathological pathology, immunohistochemical (Ki-67) analyzes and cytotoxic and cytogenetic mechanisms indicative of genotoxicity, mutagenicity, apoptosis and necrosis in neoplastic and non-neoplastic cells. The results showed an association between phytol and toxicity (OR: 1.47; 95% CI = 0.86-2.48), identified among *in vivo* studies; and cytotoxicity (OR: 1.81; 95% CI = 1.12-2.65, $p < 0.05$) in *in vitro* and *ex vivo* studies. In *in vitro* studies, 24% indicated that phytol in high concentrations induces apoptosis by several mechanisms, while 40% of the *ex vivo* studies indicated their action in the generation of reactive oxygen species. In *in vivo* studies, 24% highlighted, among apoptosis mechanisms, the expression of Bcl2 protein or mutations in the pro-apoptotic Bax protein. In addition, 8% of the studies also indicated necrosis and hepatotoxicity. However, in 24% of the articles, the mechanisms of toxicity and cytotoxicity are still not well understood. In the toxicogenic study of phytol, the results demonstrated that acute administration in rats did not produce death with LD₅₀ above 2000 mg/kg. However, some toxicological changes were observed in parameters of clinical and neuropharmacological pathology, although without histopathological liver lesions. On the other hand, phytol induced genotoxicity in all treatments in bone marrow, liver, kidney and peripheral blood, with absence of repair activity. Concomitantly, no mutagenicity was observed in bone marrow in acute treatment. In the primary culture studies of Sarcoma 180, HL-60 line and peripheral blood lymphocytes from rats, phytol (4.72, 7.08 and 14.16 μ M) induced cytotoxicity by reducing cell viability and division indices including apoptosis and necrosis. Genotoxicity was scored by increased index and frequency of DNA damage in the models tested. Similarly, phytol induced aneugenic and/or clastogenic mechanisms in Sarcoma 180 and HL-60, by induction of micronuclei and other nuclear alterations, as well as mechanisms related to the induction of oxidative damage, as observed in peripheral blood lymphocytes. Phytol, in an animal model of breast cancer, did not present hippocampic and behavioral alterations, nor did it induce malignant histopathological changes in breast, nor expressive marking for Ki-67, compared to the carcinogen. In addition, compared to cyclophosphamide, phytol induced fewer toxicogenic effects in non-tumor cells, but with significant induction of apoptosis and necrosis in neoplastic breast cells. In view of the cytogenetic mechanisms evidenced in non-clinical studies, it is possible to suggest that phytol has potential for antitumor pharmaceutical formulations.

Keywords: phytol, breast cancer, comet assay, micronucleus test, apoptosis, necrosis.

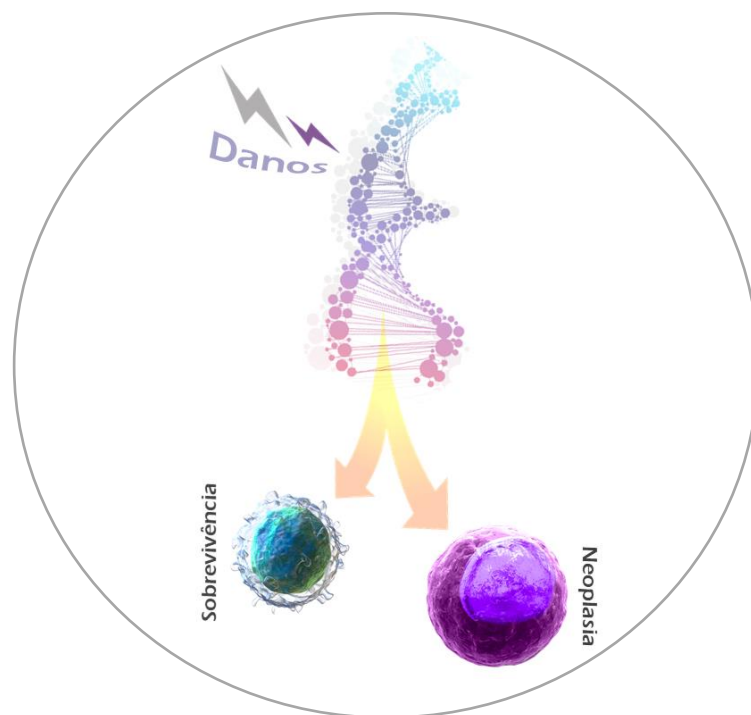
SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
LISTA DE TABELAS E QUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1 INTRODUÇÃO	17
REFERÊNCIAS	23
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 REFERENCIAL TEÓRICO	29
3.1 Câncer: uma breve abordagem de seus aspectos genéticos, sociais e econômicos	30
3.1.1 Câncer de mama	36
3.1.2 Leucemia	39
3.1.3 Sarcomas	41
3.1.4 Modelos de estudo em oncologia: abordagens in vivo e in vitro	43
3.2 Produtos Naturais	47
3.2.1 Agentes quimioterapêuticos derivados de organismos marinhos	47
3.2.1.1 Citarabina e análogos nucleosídeos	50
3.2.1.2 Trabectedinas	50
3.2.1.3 Halicondrina B e Eribulina	51
3.2.1.4 Vedotina	51
3.2.2 Agentes quimioterapêuticos derivados de fungos e bactérias	52
3.2.2.1 Rapamicinas	52
3.2.2.2 Epoxomicin	54
3.2.2.3 Midostaurin	54
3.2.3 Agentes quimioterapêuticos derivados de plantas terrestres	55
3.2.3.1 Alcaloides da vinca	57
3.2.3.2 Podofilotoxinas	57
3.2.3.3 Taxanos	58
3.2.3.4 Camptotecinas	59
3.2.3.5 Combretastatinas	59
3.2.3.6 Homoharringtonine	60
3.2.3.7 Ingenol (ingenol-3-angelato)	60
3.3 Diterpenos: agentes promissores na oncologia	61
3.3.1 Mecanismos antitumorais evidenciados em diterpenos	62
3.3.1.1 Indução de parada do ciclo celular, apoptose e autofagia	62
3.3.1.2 Citotoxicidade	63
3.3.1.3 Atividade antiproliferativa e inibição de diferenciação	63
3.3.1.4 Atividade pró-oxidante	64
3.3.1.5 Inibição de migração, invasão e metástase	65
3.3.1.6 Atividade imunossupressora e quimiopreventiva	66
3.3.2 Fitol (FIT)	66
3.4 Estudos toxicológicos e toxicogenéticos	68
REFERÊNCIAS	71
4 CAPÍTULO 1	102
Resumo	103
1 INTRODUÇÃO	104
2 METODOLOGIA	105
2.1 Estratégia de pesquisa	105
2.2 Critérios de inclusão e exclusão	105
2.3 Análise estatística	106
3 RESULTADOS	106
3.1 Identificação dos estudos	106

3.2 Associação entre fitol e citotoxicidade em modelos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	107
3.3 Associação entre FIT e toxicidade em estudos <i>in vivo</i>	110
4 DISCUSSÃO	114
4.1 Mecanismos de toxicidade e citotoxicidade do FIT e AF em estudos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	114
4.2 Mecanismos de toxicidade e citotoxicidade do FIT e AF em estudos <i>in vivo</i>	119
5 CONCLUSÃO	122
REFERÊNCIAS	122
5 CAPÍTULO 2	128
Resumo	129
1 INTRODUÇÃO	130
2 MATERIAIS E MÉTODOS	131
2.1 Reagentes e químicos	131
2.2 Animais experimentais	131
2.3 Administração de FIT e triagem toxicológica	132
2.4 Procedimentos experimentais	132
2.4.1 Hábitos gerais	132
2.4.2 Teste de campo aberto	133
2.4.3 Teste de rota rod	133
2.4.4 Eutanásia e coleta dos órgãos	133
2.4.5 Análises bioquímica, hematológica, histopatológica e urinária	134
2.4.6 Ensaio cometa em diferentes tecidos	134
2.4.7 Avaliação <i>ex vivo</i> de danos oxidativos do FIT em linfócitos de ratos fêmeas	135
2.4.8 Teste de micronúcleos em medula óssea	135
2.4.9 Análise estatística	136
3 RESULTADOS	136
3.1 Avaliação toxicológica	136
3.2 Análise comportamental (neurofarmacológica)	137
3.3 Avaliação do perfil hematológico	139
3.4 Avaliação do perfil bioquímico, peso de órgãos e análise histopatológica	140
3.5 Avaliação de alterações patológicas	141
3.6 Urinálise	143
3.7 Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade	144
3.8 Avaliação da genotoxicidade do fitol em comparação ao peróxido de hidrogênio	146
3.9 Correlações entre parâmetros comportamentais e genotóxicos	147
4 DISCUSSÃO	148
5 CONCLUSÃO	153
REFERÊNCIAS	154
6 CAPÍTULO 3	161
Resumo	162
1 INTRODUÇÃO	163
2 MATERIAIS E MÉTODOS	164
2.1 Reagentes químicos utilizados no estudo	164
2.2 Cultura primária de Sarcoma 180	164
2.3 Cultivo de linhagem HL-60	165
2.4 Viabilidade celular por azul de Tripan em cultura primária de S180	165
2.5 Viabilidade celular pelo método do MTT em linhagem HL-60	165
2.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese	166
2.7 Ensaio cometa	166
2.8 Estudo de mecanismo para genotoxicidade pelo cotratamento com H ₂ O ₂	167
2.9 Análise estatística	167
3 RESULTADOS	168
3.1 Efeito do FIT na viabilidade celular em cultura primária de S180 e em linhagem HL-60	168
3.2 Efeitos genotóxicos do FIT em cultura primária de S180 avaliados pelo ensaio cometa	168
3.3 Avaliação da indução de danos oxidativos como mecanismo para genotoxicidade do FIT em cultura primária de S180 em cotratamento com H ₂ O ₂	170

3.4 Efeitos citogenéticos do FIT em cultura primária de S180 e linhagem HL-60 avaliados pelo teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese	170
3.5 Indução de apoptose e necrose pelo FIT em cultura primária de S180 e linhagem HL-60 avaliada por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese	173
4 DISCUSSÃO	174
5 CONCLUSÃO	177
REFERÊNCIAS	177
7 CAPÍTULO 4	184
Resumo	185
1 INTRODUÇÃO	186
2 MATERIAIS E MÉTODOS	187
2.1 Reagentes e químicos	187
2.2 Animais	188
2.3 Indução do câncer de mama com o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA)	188
2.4 Avaliação histopatológica	188
2.5 Perfil imuno-histoquímico (Ki-67)	189
2.6 Monitoramento toxicológico durante a indução do câncer de mama e terapia com FIT	189
2.6.1 Análise hipocrática	189
2.6.2 Campo aberto	190
2.6.3 Rota rod	190
2.6.4 Eutanásia e coleta dos órgãos	190
2.6.5 Análise bioquímica e hematológica	190
2.6.6 Ensaio cometa em diferentes tecidos	191
2.6.7 Análise estatística	191
3 RESULTADOS	192
3.1 Análise toxicológica durante a indução do câncer de mama e terapia com FIT	192
3.1.1 Monitoramento hipocrático e comportamental	192
3.1.2 Perfil hematológico e bioquímico após indução do câncer de mama e terapia com FIT	193
3.1.3 Perfil histopatológico e imuno-histoquímico (Ki-67) em mama de animais tratados com DMBA e terapia com FIT	193
3.1.4 Peso de órgãos após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com FIT	196
3.1.5 Genotoxicidade em células tumorais e não tumorais durante a indução do câncer de mama com DMBA e terapia com FIT	197
3.1.6 Avaliação da capacidade de reparo de danos ao DNA em linfócito de sangue periférico após tratamento com DMBA e terapia com FIT	199
3.1.7 Avaliação do possível efeito antigenotóxico do FIT em relação ao tratamento com DMBA	199
3.1.8 Avaliação de efeitos apoptóticos após indução de câncer de mama com DMBA e terapias com FIT e CPA	200
4 DISCUSSÃO	201
5 CONCLUSÃO	204
REFERÊNCIAS	205
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	214
ANEXO A – CARTA DE ACEITE DE ARTIGO EM PERIÓDICO INDEXADO	216
ANEXO B – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO	217
ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – UFPI	218
ANEXO D – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO	219
ANEXO E – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – UFPI	220
ANEXO F – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO	221
ANEXO G – ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO À TESE	222

1 Introdução



Alencar, M. V. O. B.

"*Omnis cellula e cellula*" – Toda célula procede de outra célula (Rudolf Virchow, 1821-1902)



O uso medicinal de produtos naturais – compostos derivados de fontes naturais, como plantas, animais ou micro-organismos – precede os registros da história humana, provavelmente, por milhares de anos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Os produtos naturais possuem uma enorme diversidade estrutural e química, a qual não podem ser acompanhadas por bibliotecas sintéticas, pelo contrário, participam do progresso científico continuamente inspirando novas descobertas em química, biologia e medicina (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; ZHANG et al., 2017).

A participação dos produtos naturais, oriundos de plantas, organismos marinhos e micro-organismos, durante a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, produzem ativos eficazes contra uma pluralidade de doenças (KINGHORN; CHIN; SWANSON, 2009; SMANSKI et al., 2016). Várias revisões destacaram as contribuições de produtos naturais, especialmente oriundos de plantas terrestres, para a descoberta de medicamentos e, sem dúvidas, o potencial desempenhado por estes na área oncológica (HARVEY, 2010; SHEN, 2015).

As plantas sintetizam muitos metabólitos secundários e milhares destes foram posteriormente explorados pelos seres humanos por seus diversificados efeitos biológicos (KATYAR et al., 2012). Vários terpenoides têm seus papéis na defesa das plantas contra estresses biótico e abiótico ou são utilizados como moléculas sinalizadoras, atraindo insetos polinizadores (SINGH; SHARMA, 2015). Figurando como uma das maiores classes de produtos naturais, os terpenoides consistem em cerca de 40.000 estruturas químicas (ROHDICH; BACHER; EISENREICH, 2005; WITHERS; KEASLING, 2007). Com base em suas estruturas, os terpenoides são compostos por várias subclasses, incluindo monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (HUANG et al., 2012).

Vários terpenoides demonstraram atividade farmacológica contra doenças humanas, como o câncer. Os taxanos, uma classe de diterpenos, extraído de *Taxus brevifolia* e alcaloides indólicos terpenoides, incluindo vincristina e vimblastina de *Catharanthus roseus* (CRAGG; NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA et al., 2005; PADUCH et al., 2016), são exemplos formidáveis de produtos naturais amplamente utilizados na atual terapia oncológica. Os diterpenos, por sinal, representam um grande grupo de terpenoides com uma ampla gama de atividades biológicas, isolados de uma variedade de organismos (ISLAM et al., 2016). Um dos diterpenos acíclicos mais simples e importantes é o fitol (FIT), uma forma reduzida de geranilgeraniol, presente na estrutura da clorofila (ISLAM et al., 2015).

Diversas atividades farmacológicas foram atribuídas ao FIT, por exemplo, efeitos neurofarmacológicos (antiepiléptico (COSTA et al., 2012), ansiolítico (COSTA et al., 2014), antidepressivo (COSTA et al., 2011) e antinociceptivo (SANTOS et al., 2013), antioxidante (COSTA et al., 2016), anti-inflamatório (SILVA et al., 2014), hipolipemiante (BRUCKERT; ROSENBAUM; LOWERING, 2011), imunomodulador (CHOWDHURY; GHOSH, 2012), antidiabético (ELMAZAR et al.,



2013) e antimicrobiano (PEJIN et al., 2014). Em especial, o composto também demonstrou potencial para a terapia do câncer, considerando que as neoplasias malignas ainda necessitam de mais estudos sobre compostos antitumorais (GUO et al., 2014; ISLAM, et al., 2015).

Cabe enfatizar que dados da *Global Burden of Disease Cancer Collaboration* (2017), destacaram que em 2015, cerca de 17,5 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer em todo o mundo e no mesmo ano, aproximadamente 8,7 milhões de mortes foram registradas por conta da doença. Entre 2005 e 2015, os casos de câncer aumentaram 33%, com o envelhecimento da população contribuindo com 16%, crescimento populacional 13% e mudanças nas taxas específicas de idade contribuindo com 4%. O aumento alarmante da incidência de novos casos de câncer, acompanhado de seus problemas sociais e econômicos, representam uma crise real para a saúde pública e sistemas de saúde em todo o mundo (MA; YU, 2006). Em muitos países, o câncer é a segunda causa mais comum de morte, após doenças cerebrovasculares (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

Para homens, o câncer mais comum no mundo é o de próstata (1,6 milhão de casos em 2015), e para as mulheres, o mais comum é o câncer de mama (2,4 milhões de casos em 2015) (*Global Burden of Disease Cancer Collaboration*, 2017). Embora as terapias atuais tenham demonstrado resultados promissores contra muitos tipos de cânceres, ainda não existe uma cura eficaz para a maioria dos pacientes nos estágios avançados da doença, especialmente o câncer de mama (KO; MOON, 2015; GHONCHEH; POURNAMDAR; SALEHINIYA, 2016). A quimioterapia, irradiação e imunoterapia são as abordagens padrão ouro para o tratamento de câncer em todo o mundo (URRUTICOECHEA et al., 2010; BAUDINO, 2015). No entanto, o desenvolvimento de agentes eficazes para retardar, reduzir ou reverter a incidência desta lesão em mulheres de alto risco é necessário (JOHNSON; BROWN, 2010).

Uma estratégia importante para o desenvolvimento de agentes antitumorais eficazes, pode ser estudada a partir de produtos derivados de fontes naturais (MONDAL et al., 2012; ALI et al., 2012). A quimioprevenção ou quimioterapia do câncer de mama com drogas derivadas de produtos naturais é vantajosa, considerando que muitos desses compostos têm poucos efeitos colaterais e baixa toxicidade em células não neoplásicas, comparado a compostos sintéticos (RABI; BISHAYEE, 2009; PRATHEESHKUMAR et al., 2012).

Portanto, há uma necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos anticancerígenos ou quimiopreventivos com efeitos colaterais mínimos (DEMAIN; VAISHNAV, 2011). Devido a toxicidade da terapêutica atualmente utilizada para o tratamento de vários tipos de tumores, diversos produtos naturais estão sendo testados como alternativa terapêutica, alguns destes em estágios avançados de pesquisa clínica (PATIL et al., 2015; PATRIDGE et al., 2016).

Análises detalhadas de vias, mecanismos envolvidos e estrutura dos compostos antitumorais, em diferentes modelos da doença, levaram ao enorme progresso da compreensão da biologia do câncer



(MAK; EVANIEW; GHERT, 2014; TALMADGE et al., 2017). O estabelecimento de linhagens celulares tumorais e a análise do efeito de muitos compostos antitumorais naturais e sintéticos, em estudos de carcinogênese química induzidas em animais, auxiliaram o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes e continuam como excelentes ferramentas no contexto oncológico, para a descoberta de novos ativos (LOVITT; SHELPER; AVERY, 2014; KEMP, 2015).

Os modelos de câncer de mama, induzidos quimicamente, são amplamente utilizados ao longo dos anos para mimetizar a carcinogênese da mama humana. Neste prospecto, todos os modelos em ratos e camundongos têm vantagens e limitações específicas (LIU et al., 2015). Os tumores mamários podem ser induzidos em camundongos após doses de agentes cancerígenos, como por exemplo, 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) ou nitrosometilureia (NMU). O DMBA é um hidrocarboneto aromático policíclico utilizado para induzir câncer de mama em modelos animais. Este potente carcinógeno, indutor de danos ao DNA é amplamente utilizado em pesquisas não clínicas, para investigação de compostos com propriedades antitumorais (BASKARAN et al., 2010; ARROYO-ACEVEDO et al., 2015; ABBA et al., 2016).

Assim como os modelos *in vivo* respondem por muitos avanços na terapia oncológica, as linhagens celulares, derivadas de câncer humano ou animal, são modelos fundamentais, utilizados em laboratórios para estudo da biologia do câncer e teste de eficácia terapêutica de novos agentes anticancerígenos (GILLET; VARMA; GOTTESMAN, 2013). Desde a primeira linhagem humana cultivada – HeLa em 1951 – centenas de linhagens celulares de câncer foram estabelecidas e cultivadas *in vitro* (LUCEY; NELSON-REES; HUTCHINS, 2009), como HL-60 (leucemia promielocítica aguda, derivada de *Homo sapiens*) (BIRNIE, 1988) ou *in vivo*, como xenoenxertos em camundongos (CHEN et al., 2015), bem como culturas primárias de tumores em animais, como o Sarcoma 180 derivado de *Mus musculus* (LIMA et al., 2014).

Sem dúvidas, estes modelos propiciaram o desenvolvimento de melhores e inovadoras estratégias terapêuticas contra uma série de cânceres (LANGDON, 2012; RUGGERI; CAMP; MIKNYOCZKI, 2014). No entanto, a doença tem a capacidade de desenvolver resistência às terapias tradicionais e a crescente prevalência desses cânceres resistentes a fármacos exige mais pesquisas e desenvolvimento de novos tratamentos (BIEMAR; FOTI, 2013; HOLOHAN et al., 2013). Os avanços no desenvolvimento de medicamentos oncológicos requerem diferentes modelos animais, bem como esforços contínuos na avaliação de biomarcadores, com a finalidade de acessar os reais efeitos terapêuticos e tóxicogenéticos no organismo (STEELE; LUBET, 2010; VANDAMME, 2015).

Assim, considerando a relevância dos produtos naturais e suas aplicabilidades biotecnológicas, este estudo objetivou avaliar o fitol quanto a seus efeitos antitumorais associados a danos toxicogenéticos em células neoplásicas e não neoplásicas, com aplicação de biomarcadores

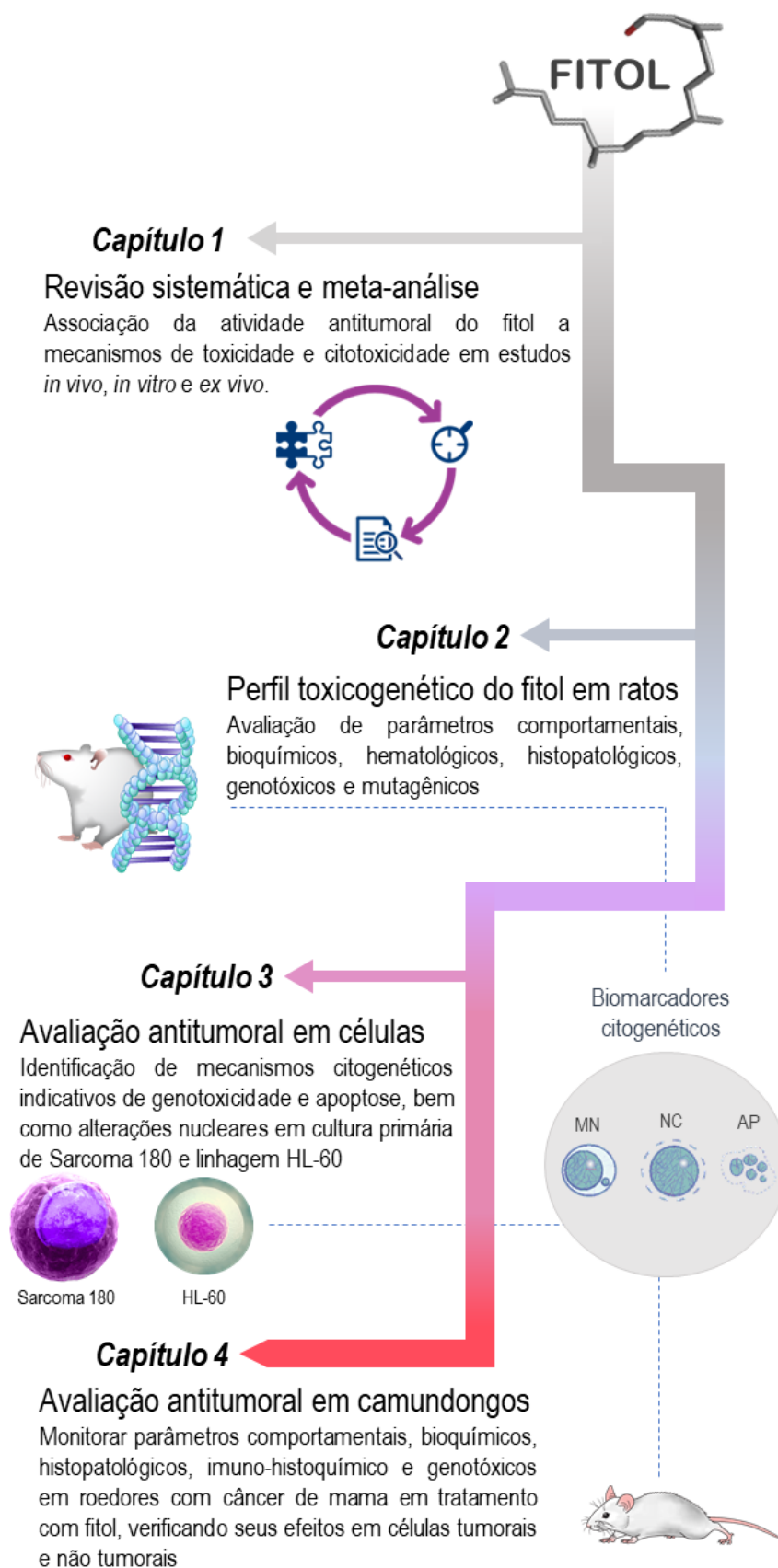


comportamentais, bioquímicos, hematológicos, histopatológicos, imuno-histoquímico e citogenéticos, considerando que o composto representa uma fonte promissora para o arsenal contra o câncer.

Esta tese está dividida em 4 capítulos (Figura 1). O primeiro versa sobre uma revisão sistemática e meta-análise das atividades antitumorais do fitol associadas a mecanismos tóxico e citotóxico em diferentes modelos de estudos; o segundo capítulo aborda os efeitos toxicogenéticos do fitol em ratos; o terceiro capítulo expõe os efeitos antitumorais do fitol em cultura primária de Sarcoma 180 e em linhagem leucêmica HL-60; por fim, o quarto capítulo reporta os efeitos antitumorais do fitol em células neoplásicas e não neoplásicas de camundongos fêmeas com câncer de mama.



Figura 1. Esquema representativo da subdivisão da tese. MN: micronúcleos. NC: necrose. AP: apoptose.





REFERÊNCIAS

- ABBA, M. C.; ZHONG, Y.; LEE, J.; KIL, H.; LU, Y.; TAKATA, Y.; SIMPER, M. S.; GADDIS, S.; SHEN, J.; 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, 2016.
- ALI, R.; MIRZA, Z.; ASHRAF, G. M.; KAMAL, M. A.; ANSARI, S. A.; DAMANHOURI, G. A.; ABUZENADAH, A. M.; CHAUDHARY, A. G.; SHEIKH, I. A. New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. **Anticancer Research**, v. 32, n. 7, p. 2999-3005, 2012.
- 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, 2015
- BASKARAN, N.; MANOHARAN, S.; BALAKRISHNAN, S.; PUGALENDHI, P. Chemopreventive potential of ferulic acid in 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague–Dawley rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 637, n. 1, p. 22-29, 2010
- BAUDINO, T. A. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 12, n. 1, p. 3-20, 2015.
- BIEMAR, F.; FOTI, M. Global progress against cancer—challenges and opportunities. **Cancer Biology & Medicine**, v. 10, n. 4, p. 183, 2013.
- BIRNIE, G. D. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. **The British Journal of Cancer. Supplement**, v. 9, p. 41, 1988.
- CHEN, Y. L.; CHUEH, F. S.; YANG, J. S.; HSUEH, S. C.; LU, C. C.; CHIANG, J. H.; CHUNG, J. G. 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.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 72-79, 2005.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687-699, 2011.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.
- GHONCHEH, M.; POURNAMDAR, Z.; SALEHINIYA, H. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 17, n. Spec No, p. 43-6, 2016.
- 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, 2013.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, FITZMAURICE, C.; ALLEN, C.; BARBER, R. M.; BARREGARD, L.; BHUTTA, Z. A.; BRENNER, H.; DICKER, D. J. Global regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.



- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19, p. 894-901, 2008.
- 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.
- HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714, 2013.
- HUANG, M.; LU, J. J.; HUANG, M. Q.; BAO, J. L.; CHEN, X. P.; WANG, Y. T. Terpenoids: natural products for cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 12, p. 1801-1818, 2012.
- JOHNSON, K. A.; BROWN, P. H. Drug development for cancer chemoprevention: focus on molecular targets. In: **Seminars in Oncology**. WB Saunders, 2010. p. 345-358.
- Katiyar, C.; Gupta, A.; Kanjilal, S.; Katiyar, S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. **Ayu**, v. 33, n. 1, p. 10, 2012.
- 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. pdb. top069906, 2015.
- KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 12, n. 2, p. 189, 2009.
- KO, E. Y.; MOON, A. Natural products for chemoprevention of breast cancer. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 4, p. 223, 2015.
- LANGDON, S. P. Animal modeling of cancer pathology and studying tumor response to therapy. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 12, p. 1535-1547, 2012.
- LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; ALMEIDA, M. A. P.; MELLO, F. M. S.; PIRES, W. C.; PINTO, T. M.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium (II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e105865, 2014.
- LIU, Y.; YIN, T.; FENG, Y.; CONA, M. M.; HUANG, G.; LIU, J.; SONG, S.; JIANG, Y.; XIA, Q.; SWINNEN, J. V.; BORMANS, G.; HIMMELREICH, U.; OYEN, R.; NI, Y. 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.
- LOVITT, C. J.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. **Biology**, v. 3, n. 2, p. 345-367, 2014.
- LUCEY, B. P.; NELSON-REES, W. A.; HUTCHINS, G. M. Grover M. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, n. 9, p. 1463-1467, 2009.
- MA, Xiaomei; YU, Herbert. Cancer issue: global burden of cancer. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 79, n. 3-4, p. 85, 2006.
- 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.
- MONDAL, S.; BANDYOPADHYAY, S.; K GHOSH, M.; MUKHOPADHYAY, S.; ROY, S.; MANDAL, C. Natural products: promising resources for cancer drug discovery. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 49-75, 2012.



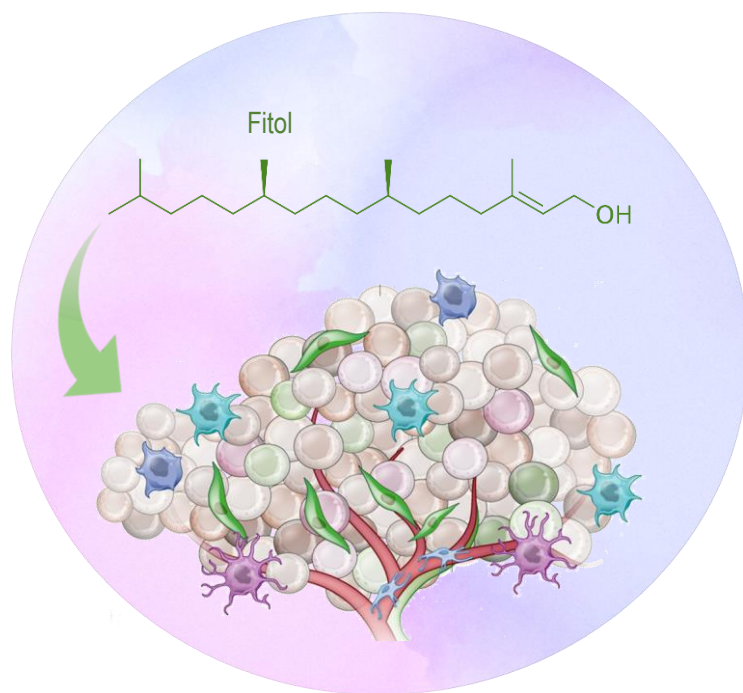
- Paduch, R.; Trytek, M.; Król, S. K.; Kud, J.; Frant, M.; Kandefer-Szerszeń, M., & Fiedurek, J. Biological activity of terpene compounds produced by biotechnological methods. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 1096-1107, 2016.
- PATIL, P. O.; Patil, A. G.; RANE, R. A.; PATIL, P. C., DESHMUKH, P. K.; BARI, S. B.; PATIL, D. A.; NAPHADE, S. S. Recent advancement in discovery and development of natural product combretastatin-inspired anticancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 15, n. 8, p. 955-969, 2015.
- PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug discovery today**, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016.
- PRATHEESHKUMAR, P.; SREEKALA, C.; ZHANG, Z.; BUDHRAJA, A.; DING, S.; SON, Y. O.; WANG, X.; HITRON, A.; HYUN-JUNG, K.; WANG, L.; LEE, J. C.; SHI, X. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1159-1184, 2012.
- RABI, T.; BISHAYEE, A. Terpenoids and breast cancer chemoprevention. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 115, n. 2, p. 223-239, 2009.
- ROHDICH, F.; BACHER, A.; EISENREICH, W. Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. 2005.
- RUGGERI, B. A.; CAMP, F.; MIKNYOCZKI, S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 150-161, 2014.
- SHEN, Ben. A new golden age of natural products drug discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297-1300, 2015.
- SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.
- SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129-151, 2015.
- SMANSKI, M. J.; ZHOU, H.; CLAESEN, J.; SHEN, B.; FISCHBACH, M.; VOIGT, C. A. Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 135, 2016.
- SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M. M.; KHANUJA, S. P. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 5892-5908, 2005.
- STEELE, V. E.; LUBET, R. A. The use of animal models for cancer chemoprevention drug development. In: **Seminars in Oncology**. WB Saunders, 2010. p. 327-338.
- TALMADGE, J. E.; SINGH, R. K.; FIDLER, I. J.; RAZ, A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.
- URRUTICOECHEA, A.; ALEMANY, R.; BALART, J.; VILLANUEVA, A.; VINALS, F.; CAPELLA, G. Recent advances in cancer therapy: an overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p. 3-10, 2010.
- VANDAMME, T. F. Rodent models for human diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 84-89, 2015.



WITHERS, S. T.; KEASLING, J. D. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 980-990, 2007.

ZHANG, M. M.; QIAO, Y.; ANG, E. L.; ZHAO, H. Using natural products for drug discovery: the impact of the genomics era. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 475-487, 2017.

2 Objetivos



Alencar, M.V.O.B.

"Um conjunto de doenças, mas um só objetivo"



2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos antitumorais do fitol associados a danos toxicogênicos em células tumorais e não tumorais, com aplicação de biomarcadores comportamentais, bioquímicos, hematológicos, histopatológicos, imuno-histoquímico e citogenéticos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão sistemática e meta-análise relativa às atividades antitumorais do fitol associadas a mecanismos tóxico e citotóxico em estudos *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, bem como identificar os mecanismos de indução de apoptose e/ou necrose;
- Avaliar os efeitos toxicogênicos do fitol em ratos por meio da aplicação de testes comportamental, enzimático, hematológico e histopatológico;
- Analisar os efeitos genotóxicos, capacidade de reparo e risco de mutagenicidade do fitol em ratos, com aplicação do ensaio cometa e teste de micronúcleo;
- Analisar os efeitos antitumorais do fitol em cultura primária de Sarcoma 180 e em linhagem leucêmica, por mecanismos citogenéticos indicativos de genotoxicidade e apoptose, com aplicação do ensaio cometa;
- Determinar os efeitos antitumorais do fitol em cultura primária de Sarcoma 180 e em linhagem leucêmica, por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese, para caracterização de mecanismos associados a alterações nucleares;
- Monitorar parâmetros comportamentais, bioquímicos, histopatológicos e imuno-histoquímico, durante a indução do câncer de mama e tratamento com fitol em camundongos fêmeas;
- Pontuar os efeitos antitumorais do fitol em células tumorais e não tumorais de camundongos fêmeas com câncer de mama, por meio da aplicação do ensaio cometa, com avaliação dos níveis de reparo e apoptose.

3 Referencial Teórico



Ilustração de Lara Crow, adaptada do periódico *Nature Reviews Cancer* (2014).

“Vislumbre da heterogeneidade tumoral”



3.1 Câncer: uma breve abordagem de seus aspectos genéticos, sociais e econômicos

“O todo é mais do que a soma de suas partes” (Aristóteles, *Metafísica*, v.8, 1045a).

A célebre citação do antigo filósofo grego, Aristóteles, pode não ser aplicável a todas as situações; mas, certamente, está se tornando verdadeira no campo da oncologia. Embora o câncer tenha sido estudado como um conjunto de doenças de caráter clonal por muitas décadas, alguns estudos anteriores revelaram que subpopulações celulares, de diferentes regiões em um mesmo tumor, variam na taxa de crescimento, imunogenicidade, resposta às drogas e capacidade metastática, demonstrando heterogeneidade fenotípica (ZHANG et al., 2016; MORII, 2017). A pluralidade destes eventos nos distancia da compreensão da dinâmica que opera entre as subpopulações heterogêneas e seu papel na progressão da doença e resposta terapêutica (SCHNEIDER et al., 2017). Compreender esses mecanismos subjacentes, certamente acarretará no desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes, reduzindo o impacto da doença no Brasil e no mundo (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

O câncer é visto como um complexo processo resultante do acúmulo de mutações na progênie de uma célula normal, levando ao crescimento seletivo das células mutadas e à proliferação descontrolada (BLACKADAR, 2016). Os primeiros modelos da doença propuseram a noção de um evento mutacional, mesmo antes da descoberta da estrutura do DNA por James Watson e Francis Crick (DAVID; ZIMMERMAN, 2010).

Vários fatores contribuem para a carcinogênese, os quais incluem agentes biológicos, alterações epigenéticas, agentes químicos prejudiciais ao DNA, estresse da maquinaria de replicação e estresse oxidativo (HANAHA; WEINBERG, 2011). Os passos iniciais da carcinogênese, imputados à geração de mutações, suscitam os conceitos de mutagênicos e na falha da maquinaria de reparo do DNA, que por sua vez, induzem a progressão tumoral (BERTRAM, 2000). Nessa etapa, a regulação negativa de mecanismos de sinalização de danos (resposta aos danos ao DNA) e do aumento da instabilidade genética e epigenética são propulsores da proliferação irrestrita e da adaptabilidade associada aos tumores, de maneira geral, com caráter agressivo (JIN; ROBERTSON, 2013). Algumas informações sobre os processos de resposta aos danos ao DNA, relacionados ao câncer, estão apresentadas no Quadro 1.



Quadro 1. Processos de resposta aos danos ao DNA envolvidos na carcinogênese.

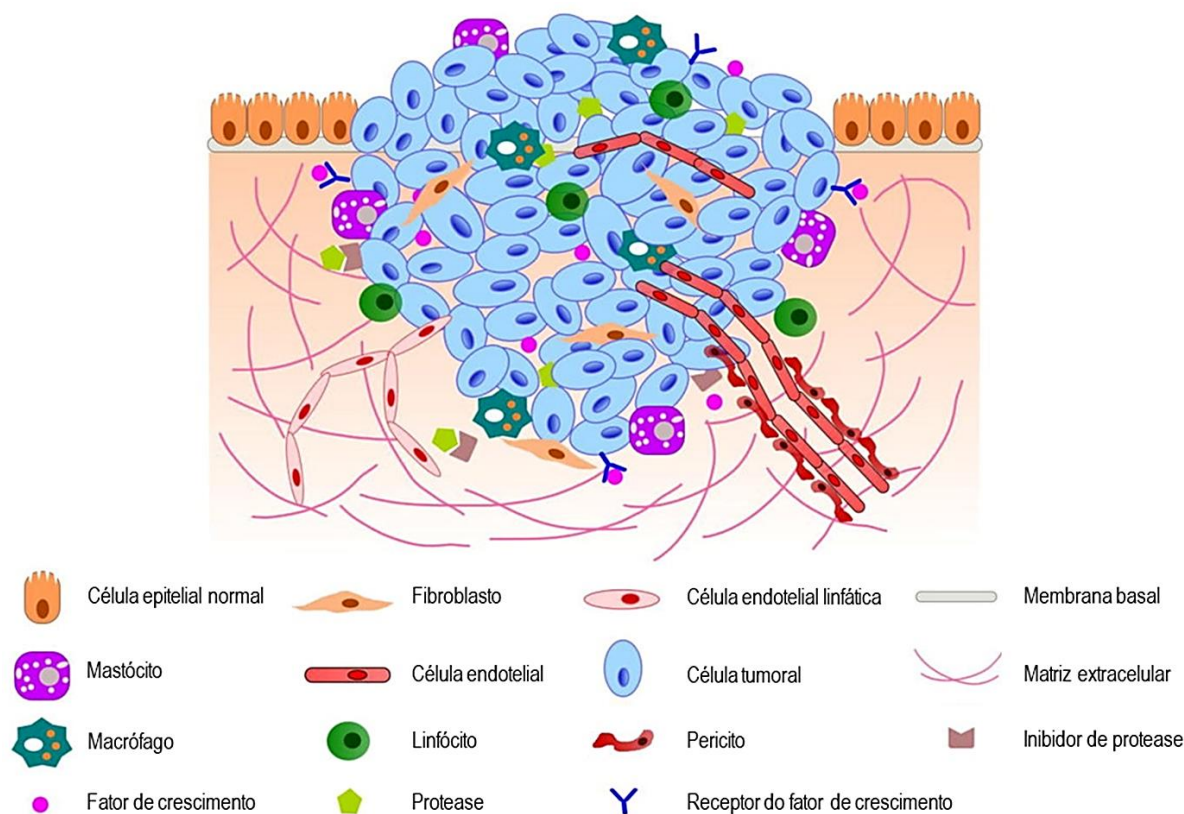
Reparo de DNA
Há uma pluralidade de vias de reparo do DNA; algumas, inclusive, fornecendo especificidade à lesão. O reparo de excisão de nucleotídeos remove lesões volumosas no DNA; os reparos por recombinação homóloga e não-homóloga corrigem quebras de fitas duplas (QFD) da cadeia; o “ <i>Mismatch repair</i> ” repara pares de bases incompatíveis; e o reparo por excisão de bases age reparando bases danificadas e <i>links</i> entre a fita simples. Mutações nestas vias aumentam a susceptibilidade ao câncer (GAVANDE et al., 2016; MAJIDINIA; YOUSEFI, 2017).
Sinalização de resposta aos danos ao DNA
Há duas vias de sinalização de resposta aos danos ao DNA: sinalização dependente de Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM), ativada por QFD; e sinalização dependente de Ataxia Telangiectasia e RAD3 (ATR), ativada por regiões de cadeia simples do DNA. A sinalização de resposta aos danos ao DNA pode ativar a apoptose e a parada nos <i>checkpoints</i> , podendo, também, influenciar o reparo do DNA. Mutações em componentes da sinalização destas vias conferem susceptibilidade ao câncer (O'CONNOR, 2015; RUNDLE et al., 2017).
Checkpoints do ciclo celular
A integridade do DNA é constantemente monitorada contra os danos ao DNA, desencadeando, por exemplo, parada do ciclo celular nos <i>checkpoints</i> , prevenindo a progressão do ciclo celular. Essa parada pode ser permanente ou transitória. Os <i>checkpoints</i> impedem a progressão da fase G1 para S e da fase G2 para M. Além disso, um <i>checkpoint</i> intra-S regula a progressão da forquilha ou origem de replicação. Muitos tumores têm respostas de <i>checkpoints</i> inativados (TAMURA, 2015; VISCONTI et al., 2016).
Apoptose
A apoptose representa uma via de morte celular programada com diferentes caminhos bioquímicos e genéticos. Tais eventos desempenham papel crítico no desenvolvimento e homeostase nos tecidos normais, evitando, também, a proliferação de células lesionadas. A apoptose pode ser dependente ou independente de p53. O <i>TP53</i> é mutado em 50% dos cânceres (WONG, 2011; MULLER; VOUSDEN, 2013; SU et al., 2015).
Fidelidade de replicação
Múltiplos processos atuam para manter a precisão da forquilha de replicação, bem como a recuperação deste mecanismo, evitando colapso na estrutura do DNA. A recombinação homóloga tem um papel fundamental nesta maquinaria e os genes envolvidos neste evento são geralmente mutados em cânceres (PRESTON; ALBERTSON; HERR, 2010; LANGE; TAKATA; WOOD, 2011).
Re-replicação do DNA
Estes eventos podem causar aneuploidia e, posteriormente, instabilidade genômica, que está intimamente relacionada à carcinogênese. Vários mecanismos impedem a re-replicação do DNA. Por exemplo, o aumento da atividade da cinase dependente de ciclina é necessário para a ativação do disparo da origem de replicação, mas é inibida quando ocorre o licenciamento das origens de replicação do DNA (MUÑOZ et al., 2017; VASSILEV; DEPAMPHILIS, 2017).
Comprimento dos telômeros
O encurtamento dos telômeros leva à senescência celular e, portanto, as células cancerosas precisam manter o comprimento dos telômeros para sobreviver. A ativação da telomerase ou uma via alternativa a fim de manter o comprimento dos telômeros é comum em cânceres (UZIEL et al., 2015; JAFRI et al., 2016).



As pesquisas oncológicas, nas últimas décadas, caracterizaram os eventos celulares e moleculares indutores de transformação maligna, por meio de alterações em genes de importância (PEDRAZA-FARIÑA, 2006; GILBERTSON, 2011; SU et al., 2015). Estes eventos incluem a proliferação descontrolada; evasão da supressão tumoral; inibição da morte celular (apoptose); criação de um microambiente particular contendo vasos sanguíneos, estromas e células imunes (detalhes a seguir); e a aquisição de potencial invasivo e metastático (QUAIL; JOYCE, 2013; BAIG et al., 2016).

As células tumorais residem em um microambiente complexo contendo várias células de suporte (Figura 1) (células epiteliais, fibroblastos – associados ou não ao tumor, pericitos, macrófagos e células endoteliais no local do tumor primário); matriz extracelular e um conjunto de moléculas de sinalização (incluindo fator de crescimento endotelial vascular [VEGF], quimiocinas CC, fator de necrose tumoral [TNF], fator estimulante de colônias de macrófagos [M-CSF], proteína quimiotática de monócitos 1 [MCP-1], fator de crescimento transformante β [TGF- β], fator de crescimento derivado de plaquetas [PDGF], entre outros). Esses componentes, no microambiente contribuem para a interação tumor-estroma, progressão tumoral, como também fenótipos de invasão e metástase (KOONTONGKAEW, 2013; XU; FARACH-CARSON; JIA, 2014).

Figura 1. Esquema ilustrativo de um microambiente tumoral típico.



Fonte: Adaptado de Koontongkaew (2013) e Xu, Farach-Carson e Jia (2014).



Além disso, uma característica fundamental de quase todas as células cancerosas é a instabilidade genômica, causada por mutações hereditárias em genes que monitoram a integridade do genoma ou mutações que são adquiridas em células somáticas, durante o desenvolvimento do tumor (VOGELSTEIN et al., 2013). As alterações genéticas podem ocorrer em vários níveis, por exemplo, em nucleotídeos simples, pequenas regiões do DNA (microssatélites), genes inteiros, componentes estruturais de cromossomos ou cromossomos completos (TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017).

Algumas mutações em linhagem germinativa foram relacionadas a síndromes de câncer familiar. Por exemplo, indivíduos afetados por xeroderma pigmentoso desenvolvem múltiplos cânceres de pele pela ausência de reparo de mutações em nucleotídeos, induzidas por radiação ultravioleta (GARBER; OFFIT, 2005; MENCK; MUNFORD, 2014). Mutações somáticas em genes de *mismatch repair*, como o *MLH1*, *MSH2* ou *MSH6*, podem ter sérias consequências se o alvo de microssatélites estiver localizado em um importante gene de controle de crescimento, como o *BAX*, que medeia a morte celular; ou o gene que codifica o receptor TGF- β tipo II, que controla a proliferação celular (NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010; STANISLAW; XUE; WILCOX, 2016).

A nível cromossômico, a perda do controle de regiões teloméricas e alterações genéticas em genes que controlam a segregação cromossômica, como *BUB1*, *MAD2*, *BUB1R* e *APC* ou no gene que codifica a cinase associada ao centrôssoma, *STK6*, são características marcantes em diferentes cânceres (YATES; CAMPBELL, 2012). Além disso, as mutações no *TP53*, os genes de susceptibilidade ao câncer de mama *BRCA1* e *BRCA2* e o gene *ATM*, da Ataxia Telangiectasia podem afetar a estabilidade genética em vários níveis (VENKATESAN; BIRKBAK; SWANTON, 2017).

As consequências da instabilidade do genoma nos cânceres são vistas nas muitas aberrações que ativam ou inativam os vários genes que afetam o comportamento das células tumorais (GUO et al., 2014a). E, embora muito complexo, o conhecimento sobre esses genes reguladores (oncogenes e genes supressores de tumores) foi enriquecido pelo desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de genes mutados em diferentes tipos de cânceres (LEE; MULLER, 2010; ZHU et al., 2015).

Mesmo que esta informação seja crítica na compreensão das bases genéticas do desenvolvimento e progressão do câncer, a ordem de aquisição dessas mutações e as células em que se acumulam, a fim de desencadear a doença, ainda permanecem mal compreendidas (MORAES; NETO; MENCK, 2011). No complexo aspecto genético da carcinogênese, sem dúvidas, "há mais do que os olhos podem ver", conforme sugere a revisão de Glover, Wilson e Arlt (2017).

Embora "a compreensão da biologia" seja, frequentemente, dada como justificativa para estudos genéticos do câncer, a prevenção e tratamento também são objetivos importantes (HIATT; BREEN, 2008). Tratamentos novos e eficazes certamente são necessários. Mas, há ganhos substanciais a serem adquiridos pela aplicação de informações genéticas atuais para um uso mais eficaz dos tratamentos já



disponíveis (ARRUEBO et al., 2011), considerando que o câncer impacta, profundamente, suas vítimas nos mais diversos aspectos (SURMAN; JANIK, 2017).

Comparado a indivíduos sem histórico de câncer, adultos com câncer (ou com história familiar) relataram com mais frequência uma saúde debilitada (cerca de 30%), outras condições médicas crônicas (42%), uma ou mais limitações na capacidade de realizar atividades da vida diária (11%), outras deficiências funcionais (58%); e, em indivíduos menores de 65 anos, incapacidade de trabalhar por causa da condição de saúde (17%), de acordo com o estudo realizado por Hewitt, Rowland e Yancik (2003). Esses números podem refletir, em parte, a idade mais avançada de indivíduos com diagnóstico de câncer; cerca de 60% das pessoas com história de câncer têm mais de 65 anos (IOM; NRC, 2006).

No entanto, um terço daqueles indivíduos com história familiar de câncer, que relataram limitações em atividades da vida diária ou outras áreas funcionais, identificam o câncer como a causa de sua limitação. E os sobreviventes de câncer, em todas as faixas etárias, relataram taxas mais elevadas de doenças crônicas em comparação com os indivíduos sem história familiar da doença (HEWITT; ROWLAND; YANCIK, 2003).

Os dados do *National Health Interview Survey* (NHIS, USA) em 1998, 1999 e 2000, indicam que uma história médica de câncer duplica, pelo menos, a probabilidade de um indivíduo ter uma saúde debilitada. Indivíduos com história de câncer também têm taxas significativamente maiores de outras doenças crônicas, como doenças cardiovasculares. E quando o câncer e outra doença crônica coexistem no mesmo indivíduo, refletem em saúde debilitada e incapacidade cerca de 5 a 10 vezes maiores do que o esperado.

Os sobreviventes de câncer pediátrico têm taxas elevadas de doenças crônicas, comparados aos adultos jovens (DILLER et al., 2009). A deficiência cognitiva também é relatada em algumas crianças e adultos tratados da doença. Estudos com pacientes pediátricos tratados da leucemia linfoblástica aguda e tumores cerebrais, os dois tipos de câncer pediátrico mais comuns, por exemplo, relataram ser comum o comprometimento das habilidades cognitivas. Por exemplo, atenção e concentração, memória, velocidade de processamento da informação, capacidade de sequenciamento e integração visomotora (IOM; NRC, 2003; BUTLER; MULHERN, 2005). Estes efeitos tardios do câncer e do tratamento podem contribuir para problemas de leitura, desenvolvimento de linguagem e habilidade para realizar tarefas (IOM; NRC, 2003).

A fadiga é outro sintoma comumente relatado em pacientes oncológicos, sendo identificada como a principal responsável na interferência das atividades diárias dos pacientes (BERGER et al., 2015). No entanto, as estimativas de taxas de fadiga entre os indivíduos com câncer variam muito. Por exemplo, de 4% em pacientes com câncer de mama, antes do início da quimioterapia, para 91% em pacientes com câncer de mama após cirurgia e quimioterapia. As taxas de prevalência são difíceis de



interpretar, pois não há consenso sobre uma definição padrão de fadiga. Além disso, os estudos utilizam critérios diferentes para definir sua presença e gravidade (CARR et al., 2002; BARSEVICK et al., 2013). Também, estima-se que um terço dos pacientes submetidos a tratamento oncológico ativo experimentaram dor resultante da doença, do tratamento ou doenças que ocorrem de forma conjunta. Esta dor, geralmente, não é totalmente eliminada, apesar da administração de analgésicos e outras terapias; e, que pode continuar a ser um problema, mesmo quando já não há nenhum sinal de câncer (CARR et al., 2002).

O estresse emocional da vida com um diagnóstico de câncer e seu tratamento, o medo da recorrência e as dificuldades impostas pela situação, com os problemas físicos do dia a dia, podem criar problemas psicológicos novos ou amplificar os já existentes (SURMAN; JANIK, 2017). Os problemas físicos e psicológicos descritos acima podem ser exacerbados ou produzirem novos problemas sociais e econômicos significativos (NAUGHTON; WEAVER, 2014). O estresse financeiro, resultante da baixa renda, o custo dos cuidados de saúde ou a falta de plano de saúde podem resultar em estresse substancial (TU, 2004; YABROFF et al., 2011). As necessidades financeiras podem surgir dos elevados custos de algumas modalidades terapêuticas e outras necessidades de saúde, como suprimentos médicos que não são cobertos pelo plano de saúde e/ou estão além do nível de renda do indivíduo (KENT et al., 2013). Este estresse financeiro é agravado quando um paciente perde o emprego, ou não está trabalhando durante os períodos de tratamento. Outro problema a se pontuar é o elevado custo de certos medicamentos oncológicos (SIDDIQUI; RAJKUMAR, 2012).

O alto custo de determinadas drogas antitumorais estão relacionados a vários fatores. Primeiro, é muito caro gerenciar a descoberta e realização de todos os estudos regulatórios, incluindo testes clínicos de fase 1, 2 e 3, para, então, obter aprovação. Segundo, a maioria dos cânceres são incuráveis, os pacientes são tratados com determinados agentes aprovados (sequencialmente ou em combinação), criando um monopólio virtual, porque o uso de um medicamento não significa, automaticamente, que os outros não serão mais necessários. Terceiro, mesmo que o monopólio seja interrompido, com a chegada de versões "novas e melhoradas" de uma droga aprovada, o medicamento mais antigo, e agora visto como genérico, tende a ser relacionado a um tratamento de qualidade inferior, perpetuando a situação (MCKEE et al., 2010; PRASAD; DE JESÚS; MAILANKODY, 2017).

O quarto fator reside na própria natureza do câncer e a gravidade do diagnóstico, que desempenha um papel importante na medida em que os pacientes e os médicos geralmente estão dispostos a pagar o alto preço dos tratamentos inovadores, mesmo para melhorias marginais no resultado. Finalmente, há incentivo para administrar mais quimioterapia e existem barreiras legais que impedem que agências, como a *Food and Drug Administration* (FDA), levem em consideração aspectos econômicos ao aprovarem novas drogas (SIDDIQUI; RAJKUMAR, 2012).



O aumento de 20% na incidência global de câncer, de 2000 a 2020, previsto em estudos está impulsionando a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de medicamentos mais eficazes e certamente mais caros (EATON, 2003; WEIR et al., 2015). Nos últimos 15 anos, o tratamento de muitos tipos de cânceres foi revolucionado com o desenvolvimento e aprovação de mais de oitenta novos medicamentos. Esta revolução tecnológica e regulamentar ocorreu, concomitantemente, ao aumento substancial no preço dos novos tratamentos, que ultrapassou 300% durante esse período (SAVAGE, 2017). A situação ainda é mais grave se considerarmos a quantidade de drogas promissoras que falham em estágios finais da P&D (aproximadamente 90%) (ADAMS, 2012).

As razões para este elevado percentual de falha incluem a falta de compreensão sobre o mecanismo de ação da droga, a complexidade da fisiologia do paciente, a caracterização inadequada dos tumores dos pacientes, a falha na utilização de biomarcadores para elucidar o estágio clínico precocemente, esquema inapropriado de dose dos medicamentos, limitações da metodologia de ensaios não clínicos, pré-clínicos e clínicos e desafios regulatórios (MARTELL et al., 2013; SERUGA et al., 2015).

O custo médio do desenvolvimento de uma nova droga oncológica, do laboratório para os pacientes, foi estimado em cerca de US\$ 1,3 bilhão de dólares, em 2007 (DIMASI; GRABOWSKI, 2007). Portanto, o custo da P&D em oncologia é insustentável, sendo essencial que o desenvolvimento de medicamentos oncológicos se torne mais rentável e produtivo, a fim de recuperar tamanho investimento (PRASAD; DE JESÚS; MAILANKODY, 2017). É vital que as estratégias para melhorar a produtividade do desenvolvimento de medicamentos oncológicos sejam identificadas e implementadas. Isso assegura que os tratamentos mais eficazes, contra a multiplicidade de faces assumidas pelo câncer estejam disponíveis no futuro (ADAMS, 2012).

Existem mais de 100 diferentes tipos de câncer, e cada um é classificado pelo tipo de célula inicialmente afetada (SUDHAKAR, 2009). As seções a seguir apresentam brevemente três tipos de câncer, o de mama, leucemia e sarcoma, os quais foram instrumentos de pesquisa no presente estudo.

3.1.1 Câncer de mama

É o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do de pele não melanoma. O câncer de mama (CM), também acomete homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença. A estimativa de casos novos para o Brasil, no ano de 2016, foi de 57.960 (INCA, 2015). Com quase 1,7 milhões de novos casos diagnosticados em 2012, representa cerca de 12% de todos os novos casos de câncer e 25% de todos os cânceres em mulheres (FERLAY et al., 2015). É a quinta causa mais comum de morte por câncer em mulheres (GHONCHEH; POURNAMDAR; SALEHINIYA, 2016).



Estatísticas indicam aumento da sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Cabe ressaltar, no entanto, que os países em desenvolvimento enfrentam restrições de recursos e infraestrutura que desafiam o objetivo de reduzir o número de vítimas desta doença, por meio de detecção precoce, diagnóstico e tratamento (ANDERSON et al., 2006; YIP et al., 2015).

Diferentes fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do CM em mulheres. A idade, sem dúvidas, aumenta o risco de desenvolver a doença (MCGUIRE et al., 2015). Por exemplo, a probabilidade de uma mulher, nos Estados Unidos, desenvolver CM é de 1 em 202, do nascimento até a idade de 39 anos; 1 em 26, dos 40-59 anos; e 1 em 28, dos 60-69 anos (ANDERS et al., 2009). A história pessoal de CM também é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de um segundo CM ipsilateral ou contralateral (DEMICHELI et al., 2013). Os fatores associados a um risco aumentado de um segundo CM incluem um diagnóstico inicial de carcinoma ductal *in situ*, estágio IIB, câncer receptor hormonal negativo e idade jovem (HOWELL et al., 2014).

As doenças proliferativas da mama estão também associadas a um risco aumentado de CM (KAMIŃSKA et al., 2015). Lesões de mama proliferativas sem atipia, incluindo hiperplasia ductal usual, papilomas intraductais, adenose esclerosante e fibroadenomas conferem apenas um pequeno risco aumentado de desenvolvimento de CM, aproximadamente duas vezes maior que a população em geral (WORSHAM et al., 2009). A hiperplasia atípica, incluindo ductal e lobular, geralmente encontrada incidentalmente na mamografia de triagem, confere um risco, significativamente, aumentado de CM. As mulheres com atipia têm um risco, aproximadamente, 4,3 vezes maior de desenvolver câncer em comparação com a população em geral (WORSHAM et al., 2009; CASTELLS et al., 2015).

Além disso, o risco de CM aumenta se houver história familiar da doença (HEISEY; CARROLL, 2016). O maior risco está associado ao aumento do número de parentes de primeiro grau diagnosticados com CM em uma idade jovem (menores de 50 anos). Comparado a mulheres sem história familiar, pacientes que possuíam um, dois ou três parentes de primeiro grau afetadas apresentam razão de risco (*odds ratio*) aumentado para CM (BREWER et al., 2017).

Aproximadamente 20 a 25% dos pacientes com CM têm uma história familiar positiva. Mas, apenas 5 a 10% dos casos demonstram uma herança autossômica dominante. Os alelos de predisposição genética foram descritos em termos de significância clínica (MELVIN et al., 2016). Os alelos de predisposição de alto risco, que conferem risco de 40 a 85% de CM, incluem mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, *TP53*, resultando em síndrome de Li-Fraumeni, *PTEN* resultando em síndrome de Cowden, *STK11* causando a síndrome de Peutz-Jegher, *NF1*, neurofibromatose Tipo 1 e *CDH-1*, para E-Caderina (EASTON et al., 2015).



Metade das síndromes de predisposição ao CM estão associadas a mutações em *BRCA1* e *BRCA2*. As mulheres com mutações deletérias nestes genes, têm um risco, significativamente, maior de desenvolver CM (MEHRGOU; AKOUCHEKIAN, 2016). O risco ao longo da vida varia de 65 a 81%, para portadores de mutação em *BRCA1*; e 45 a 85%, para portadores de *BRCA2* (KAMIŃSKA et al., 2015). Os genes de risco moderado, incluindo mutações homozigóticas de *ATM*, mutações somáticas nos genes supressores de tumores *CHEK2*, *BRCA1* e *BRCA2* e os genes modificadores *BRIP1* e *PALB2* conferem um risco de 20 a 40% (DE JONG et al., 2002).

Não obstante, os ciclos de níveis endógenos de estrogênio ao longo da vida de uma mulher têm implicações para o desenvolvimento ou proteção contra o CM, bem como fatores reprodutivos, como menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gravidez, amamentação e idade na menopausa. Além disso, fatores de risco relacionados ao estilo de vida, incluindo o uso excessivo de álcool, obesidade e inatividade física, respondem a 21% de todas as mortes por CM em todo o mundo (MCDONALD; GOYAL; TERRY, 2014; DIETERICH et al., 2014).

Após diagnosticado, há várias formas de intervenção para o CM, que dependem do tipo e do estágio da lesão. Os tratamentos locais, também chamados de terapias locais, tratam o tumor sem afetar o resto do corpo (HOWARD; BLAND, 2012). Os tipos de terapia local utilizados para o CM incluem cirurgia e radioterapia. Essas intervenções são norteadas pelo resultado histopatológico, que conduzem a uma terapêutica adequada. Além destas, há também os tratamentos sistêmicos, realizados por meio de drogas, que podem ser administradas por via oral ou diretamente na corrente sanguínea. Estas terapias são chamadas de sistêmicas, uma vez que podem atingir células cancerosas em qualquer região do corpo (SHARMA et al., 2010). Dependendo do tipo de CM, diferentes drogas podem ser usadas, incluindo quimioterapia, hormonioterapia e terapia alvo molecular (RUBOVSKY; HORVÁTH, 2017).

No entanto, a resistência terapêutica, a recorrência e a falta de tratamento nas metástases são os principais desafios que precisam ser abordados. Evidências têm sugerido a presença de células-tronco em populações heterogêneas de tumores mamários. Estas são capazes de auto-renovação e diferenciação, sendo consideradas responsáveis pela resistência às drogas e recorrência (ZARDAVAS et al., 2015; BECA; POLYAK, 2016). Portanto, compostos que possam atingir células bem diferenciadas, bem como células-tronco cancerosas, podem fornecer uma melhor estratégia de tratamento ao CM (SIDDIQUI et al., 2015).



3.1.2 Leucemia

A leucemia é o câncer dos tecidos formadores de sangue, incluindo a medula óssea. Caracteriza-se pela rápida produção de glóbulos brancos anormais, os quais prejudicam a capacidade da medula óssea em produzir glóbulos vermelhos e plaquetas (DAVIS; VIERA; MEAD, 2014). Para o Brasil, no ano de 2016, estimou-se 5.540 casos novos de leucemia em homens; e, 4.530, em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,63 casos novos a cada 100 mil homens; e 4,38 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2015). No mundo, corresponde a 2,5% de todos os cânceres, excluindo o de pele não melanoma (FERLAY et al., 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

As anormalidades cromossômicas não aleatórias, por exemplo, deleções e translocações são identificadas em, aproximadamente, 52% de todos os pacientes primários de leucemia mieloide aguda (LMA) e foram reconhecidos como eventos genéticos que causam e promovem esta doença (BYRD et al., 2002). Certas anormalidades citogenéticas, incluindo as $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q12)$ e $inv(16)(p13.1;q22)$ estão associadas à remissão e sobrevida mais longas. Enquanto alterações dos cromossomos 5, 7, cariótipo complexo, descrito como acima de 3 anormalidades cromossômicas, e 11q23 estão associados a um prognóstico ruim (DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015).

A doença pode ser aguda ou crônica. A leucemia crônica progride mais lentamente do que a leucemia aguda, o que requer tratamento imediato. Além disso, também pode ser classificada como linfocítica ou mielogênica (GREAVES, 1997). A leucemia linfocítica se refere ao crescimento celular anormal nas células da medula que se tornam linfócitos. Na mieloide, o crescimento celular anormal ocorre nas células da medula que amadurecem nos glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas (VOGEL; FISHER, 1993). Há, pelo menos, quatro grandes classificações de leucemia: linfocítica aguda (LLA), mieloide aguda (LMA), linfocítica crônica (LLC) e mieloide crônica (LMC) (SZCZEPAŃSKI et al., 2003; DAVIS; VIERA; MEAD, 2014).

A LLA afeta crianças e adultos, com prevalência máxima entre as idades de 2 e 5 anos. Em adultos, 75% dos casos de LLA se desenvolvem a partir de precursores da linhagem de células B, sendo o restante dos casos constituído por precursores malignos de células T (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). Tradicionalmente, a estratificação de risco se baseou em fatores clínicos como idade, contagem de glóbulos brancos e resposta à quimioterapia. No entanto, a identificação de alterações genéticas recorrentes ajudou a refinar o prognóstico individual e orientar o manejo de pacientes (PUI; ROBISON; LOOK, 2008).

Apesar dos avanços na gestão destes pacientes, o cerne da terapêutica continua a ser uma quimioterapia multiagente com vincristina, corticosteroides e uma antraciclina, com transplante de células-tronco alogênicas. Os pacientes idosos, geralmente, não conseguem tolerar tais regimes e



apresentam um prognóstico, particularmente, ruim (PUI; EVANS, 2006; INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013). A LLC é a leucemia mais comum nos países ocidentais. A doença geralmente ocorre em pacientes idosos e possui um curso clínico altamente variável (HALLEK, 2015). A transformação leucêmica é iniciada por alterações genômicas específicas que prejudicam a apoptose das células B clonais. O diagnóstico é estabelecido por contagem de sangue, esfregaços de sangue e imunofenotipagem de linfócitos B circulantes, que identificam uma população clonal de células B com antígenos CD5 e marcadores de células B (SEIFERT et al., 2012).

Para pacientes fisicamente aptos, uma das modalidades de quimioimunoterapia combina o uso de fludarabina, ciclofosfamida e rituximab (HALLEK, 2017). Por outro lado, para os pacientes debilitados, a evidência atualmente disponível sustenta algumas opções terapêuticas de primeira linha, como clorambucil combinado com um anticorpo anti-CD20 (obinutuzumab ou rituximab ou ofatumumab) ou uma terapia contínua com ibrutinib (BARRIENTOS, 2016). Na recaída, o tratamento inicial pode ser repetido, se o intervalo livre de tratamento exceder 3 anos. Se houver nova recaída, a terapia passa a empregar agentes alternativos, como bendamustina (mais rituximab), alemtuzumab, lenalidomida, ofatumumab, ibrutinib, idelalisib ou venetoclax. Os pacientes com mutação em *TP53* ou *del(17p)*, podem ser tratados com ibrutinib, venetoclax ou uma combinação de idelalisib e rituximab (CRAMER et al., 2016; HALLEK, 2017).

A LMA, embora fosse incurável há 50 anos, agora é curada em 35 a 40% dos pacientes adultos com 60 anos de idade ou menos; e em 5 a 15% dos pacientes com idade superior a 60 anos (DÖHNER et al., 2010). No entanto, o desfecho em pacientes com idade avançada, que não conseguem receber quimioterapia resulta numa sobrevida mediana de apenas 5 a 10 meses (SAULTZ; GARZON, 2016). Cerca de 40 a 50% de todos os casos de LMA são citogeneticamente normais, utilizando análises de bandas convencionais (GAIDZIK; DÖHNER, 2008). Embora este grupo tenha um risco intermediário de recaída, uma heterogeneidade substancial é encontrada nesta população em termos de resultado clínico. Assim, a triagem molecular da doença é crítica para a categorização do prognóstico e estratégia de tratamento (DÖHNER et al., 2010; DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015), o qual se baseia na combinação de regimes à base de citarabina e antraciclina, com transplante de células-tronco alogênicas para candidatos elegíveis.

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa com incidência de 1-2 casos por 100.000 adultos. Isso representa cerca de 15% dos recém-diagnosticados casos de leucemia em adultos (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016). A doença é caracterizada por uma translocação genética, *t(9;22)(q34;q11.2)*, em que a região de *cluster* ponto de interrupção (BCR) do cromossomo 22 (22q11.2) é fundida com uma parte do gene Abelson (*ABL1*), no cromossomo 9 (9q34). Esse rearranjo é conhecido como cromossomo Filadélfia (GRANATOWICZ et al., 2015). A consequência molecular dessa translocação é a geração de



um oncogene de fusão *BCR-ABL1*, que, por sua vez, traduz-se em uma oncoproteína BCR-ABL, utilizada como alvo para terapias (PINILLA-IBARZ et al., 2015). A terapêutica envolve três inibidores de tirosina quinase (BCR-ABL1), imatinib, nilotinib e dasatinib, os quais foram aprovados pela FDA como tratamento de primeira linha para pacientes com LMC recém-diagnosticadas em fase crônica (JABBOUR; CORTES; KANTARJIAN, 2011; JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

3.1.3 Sarcomas

Os sarcomas são tumores malignos relativamente raros, que são derivados de tecidos mesenquimatosos – tecidos não epiteliais derivados da camada mesodérmica embrionária e compreendem menos de 10% de todos os tipos de câncer (RIGGI et al., 2007; CHEN et al., 2010). As estimativas 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) (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Nos registros de câncer de base populacional brasileiros, a mediana das taxas de incidência 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. Os sarcomas respondem a uma porcentagem mais elevada de morbidade e mortalidade geral em crianças e adultos jovens do que em adultos (INCA, 2017).

As alterações moleculares identificadas, associadas a subtipos histológicos específicos de sarcomas, indicaram que as classificações anteriores, baseadas no local do tumor (osso ou tecido mole), são menos importantes do que as características moleculares e/ou patológicas (JEMAL et al., 2003). Estas informações são especialmente importantes, uma vez que as terapias direcionadas provaram ter particular eficácia em pacientes com sarcomas específicos (WARDELMANN et al., 2010).

Por exemplo, o fibrossarcoma e nefroma mesoblástico congênito foram considerados tumores não relacionados, até uma análise citogenética revelar a origem genética idêntica desses tumores, indicando que são, simplesmente, o mesmo tumor, mas que se desenvolvem em locais diferentes. Esses dados revolucionaram as abordagens para o tratamento desses cânceres, já que, ao contrário da maioria dos tumores epiteliais, que são definidos pelo órgão de origem, os sarcomas podem ser definidos por sua patologia molecular (MARINO-ENRIQUEZ, 2015; MARIÑO-ENRÍQUEZ; BOVÉE, 2016).

A maioria dos sarcomas é esporádico, com etiologia desconhecida, embora também haja algumas síndromes de predisposição genética e exposições ambientais bem descritas, que estão associadas a sarcomas específicos (FROEHNER; WIRTH, 2001). Muitos, se não todos, os sarcomas têm alterações na via do retinoblastoma (RB) e não é surpreendente que os pacientes com retinoblastoma hereditário, que mantiveram mutações do alelo *RB*, estejam em maior risco de desenvolver sarcomas durante a vida (CHAUVEINC et al., 2001).



Esses pacientes, em particular, apresentam um risco aumentado de desenvolver sarcomas osteogênicos. Por exemplo, a exposição de pacientes com alterações do *RB* à radiação, aumenta o risco de desenvolver sarcomas, levando a mudanças na intervenção desses pacientes (KLEINERMAN et al., 2005). Famílias com síndrome de Li-Fraumeni, causada por mutações em *TP53*, apresentam maior risco de desenvolver rhabdomyosarcoma (TRAHAIR; ANDREWS; COHN, 2007; MAGNUSSON et al., 2012). Na verdade, pacientes com síndrome de Li-Fraumeni têm uma incidência aumentada para uma variedade de sarcomas (MALKIN et al., 1990; GONZALEZ et al., 2009). Além disso, quase metade dos subtipos de sarcoma ocorrem em pacientes com neurofibromatose tipo I, que é causada por uma deleção do gene *NF1* (KING et al., 2000).

Embora uma série de fatores ambientais tenha sido sugerida na sarcomagenese, apenas dois desses fatores foram provados inequivocamente. A 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). O outro fator ambiental associado ao aumento do risco de sarcoma é a radiação ionizante. Os sarcomas pós-radiação, ocorrem pelo menos 3 anos após a finalização da terapia primária. A incidência desses sarcomas está relacionada à dose, pois a maioria ocorre em pacientes que foram expostos a um excesso de 5.000 cGy (RUBINO et al., 2005).

Do ponto de vista genético, os sarcomas se subdividem em dois grupos, que são distinguíveis em nível citogenético. O primeiro é caracterizado por cariótipos de maioria diploides simples, com poucos rearranjos cromossômicos; enquanto o segundo possui cariótipos complexos, que são característicos de um severo distúrbio da estabilidade genômica (HELMAN; MELTZER, 2003). Embora a diversidade genética entre os sarcomas, patologicamente semelhantes, confunda essas distinções, a comparação desses dois grupos fornece um quadro conceitual útil para considerar os mecanismos genéticos subjacentes à sarcomagenese (JAIN et al., 2010; TAYLOR et al., 2011).

A cirurgia tem sido a principal abordagem para tratar a maioria dos sarcomas. No entanto, para aqueles pacientes com tumores não ressecáveis ou residuais após a cirurgia, a radioterapia também é empregada (STEEN; STEPHENSON, 2008). Os pacientes com doença metastática são tratados com quimioterapia sistêmica, geralmente consistindo em doxorubicina e ifosfamida (KASPER et al., 2007). Para certos sarcomas quimiossensíveis – particularmente sarcomas pediátricos – o tratamento evoluiu para incluir quimioterapia seguida de cirurgia e/ou radioterapia (KAUSHAL; CITRIN, 2008). Esta abordagem provou ser efetiva no tratamento de pacientes que possuem tumores localizados, já que porcentagens crescentes de sobreviventes a longo prazo foram observadas (CHA et al., 2004). No entanto, para muitos tumores com níveis marginais de resposta à quimioterapia e para a doença metastática, novas abordagens são necessárias (SHENG; MOVVA, 2016).



Recentemente, duas novas drogas derivadas de produtos naturais, foram aprovadas para tratamento de sarcomas. Eribulina foi aprovada com base na melhoria da sobrevivência global para pacientes com sarcomas adipocíticos; enquanto que a trabectedina, agora é aprovada, nos Estados Unidos, para pacientes com leiomiossarcomas e lipossarcomas (RATAN; PATEL, 2016).

3.1.4 Modelos de estudo em oncologia: abordagens *in vivo* e *in vitro*

Apesar das taxas de sobrevivência dos pacientes com câncer terem melhorado nas últimas décadas, na clínica, muitos obstáculos continuam a se levantar (SERUGA et al., 2014). Um dos principais problemas é o desenvolvimento da resistência a medicamentos. A monoterapia com agentes antitumorais direcionados ou mesmo os quimioterapêuticos convencionais, invariavelmente, resulta em resistência causada por mutações *de novo* ou crescimento de clones pré-existentes resistentes à terapia em tumores heterogêneos (HOUSMAN et al., 2014; ALFAROUK et al., 2015).

Além disso, após tratamentos, aparentemente bem-sucedidos, células tumorais tolerantes às drogas, podem sobreviver, permanecendo dormentes por longos períodos de tempo e, eventualmente, resultar numa doença recorrente, que pode ser fenotipicamente diferente do tumor original (KOTTKE et al., 2013; BLATTER; ROTTENBERG, 2015). Outro grande desafio é a doença metastática, que representa mais de 90% das mortes relacionadas ao câncer (WEIGELT; PETERSE; VAN'T VEER et al., 2005). Esses tumores secundários geralmente não respondem à terapia e quase sempre são incuráveis (VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

O tratamento bem-sucedido do câncer requer uma abordagem multidisciplinar, em que diferentes estratégias, como cirurgia, radiação, terapia citotóxica e imunoterapia são cuidadosamente combinadas (SILBERMANN et al., 2011). Para projetar tais combinações, é fundamental aprimorar os conhecimentos sobre os mecanismos celulares intrínsecos e extrínsecos subjacentes ao desenvolvimento do tumor, metástase e capacidade de resposta terapêutica (WU; HANNUN, 2016). Na busca do tratamento mais eficaz, para diferentes tipos de cânceres, a ciência deposita esperança na pesquisa não clínica, em modelos animais e abordagens *in vitro* (CHEON; ORSULIC, 2011).

Estudos com roedores, baseados em modelos xenográficos ou células de aloenxertos de tumores são os modelos *in vivo* mais utilizados na pesquisa oncológica (JUNG, 2014). Estes modelos de transplante permitem testes rápidos de potenciais genes relacionados ao câncer e metástases, sendo, frequentemente, utilizados para testes de drogas em fase não clínica (LANGDON, 2012). Por exemplo, estudos com xenotransplante elucidaram os mecanismos de resistência intrínseca do câncer colorretal (CCR) ao vemurafenib. Os resultados deste estudo levaram ao início de um ensaio clínico em que os



pacientes com CCR foram tratados com vemurafenib e inibidor de EGFR (PRAHALLAD et al., 2012), ilustrando a utilidade dos modelos animais no estabelecimento de novas estratégias de tratamento.

Esses modelos também revelaram que células de câncer de mama disseminadas residem adjacentes aos vasos sanguíneos, o que poderia fornecer um nicho para regulação da dormência destas células (GHAJAR et al., 2013). Além disso, informações fundamentais sobre a imunidade antitumoral, mecanismos de tolerância das células T e rotas tumorais de fuga do sistema imune provêm de estudos *in vivo* com modelos roedores (LEACH et al., 1996). Essas descobertas sedimentaram as bases para a atual revolução da imunoterapia contra câncer.

Outro nicho de pesquisa são os xenoenxertos de tumores de pacientes (XTP), derivados de biópsias de tumores humanos, os quais são transplantados em camundongos imunodeficientes (CEKANOVA; RATHORE, 2014; LAI et al., 2017). Ao contrário dos modelos de transplante de linhagens celulares, os tumores XTP mantêm a heterogeneidade molecular, genética e histológica observada em pacientes com câncer, mesmo após uma série de passagens em camundongos (HIDALGO et al., 2014). Portanto, os modelos XTP podem ser ferramentas valiosas para a medicina personalizada, como demonstrado em várias abordagens não clínicas de medicamentos em modelos de XTP para câncer de pulmão de não-pequenas células (MERK et al., 2011), câncer de mama (MARANGONI et al., 2007), melanoma (KEMPER et al., 2015; GIROTTI et al., 2016), câncer de próstata (QU et al., 2014) e câncer colorretal (BERTOTTI et al., 2015).

Além disso, os estudos de carcinogênese química, em animais, contribuíram diretamente para a redução da incidência de câncer na população humana, principalmente por sua capacidade de identificar carcinógenos ocupacionais, ambientais e dietéticos (HOENERHOFF et al., 2009). Atualmente, há duas aplicações de modelos animais em carcinogênese química. A primeira é a pesquisa experimental, que envolve a biologia do câncer; e, a segunda aplicação, mais prática, é testar substâncias químicas com potencial carcinogênico (GALLO et al., 2001; STEELE; LUBET, 2010; TSUBURA et al., 2011; KEMP, 2015).

Os modelos da doença em animais têm proporcionado o desenvolvimento de terapias inovadoras, permitindo avaliar os efeitos diagnósticos/terapêuticos de novos agentes antitumorais, investigar fatores biológicos envolvidos, explorar medidas preventivas contra carcinogenicidade e compreender os mecanismos moleculares envolvidos na iniciação, promoção e progressão de vários tipos de câncer, como o de mama (RASHID; TAKABE, 2015; HORAS et al., 2015). Exemplo destes modelos, incluem estudos com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) (LIU et al., 2015). O 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é um dos mais eficientes HPA na indução de CM, sendo amplamente utilizado em roedores fêmeas (BHARDWAJ et al., 2009; FERREIRA et al., 2013; ABBA et al., 2016).



A dose única de 50 a 100 mg/kg do composto é capaz de induzir tumores mamários na incidência de 100% (BHARDWAJ et al., 2009). Esses tumores mamários em roedores, induzidos por DMBA, mimetizam o perfil molecular de carcinomas luminais da mama humana, representando um excelente modelo não clínico para ensaios de terapias alvo, envolvendo a via PIK3CA/Akt/mTOR e, uma robusta plataforma para a investigação de novos agentes antitumorais (BISHAYEE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; ABBA et al., 2016).

Outros modelos animais apropriados, também aumentaram a compreensão sobre os sarcomas e o avanço das abordagens terapêuticas (DODD; MITO; KIRSCH, 2010; HAYES; LANGENAU, 2017). Embora seja difícil desenvolver modelos animais que reproduzam a doença humana em sua complexidade, vários modelos em roedores e *in vitro*, com sarcomas geneticamente complexos, foram desenvolvidos e têm auxiliado a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos (FAN, 2010; POST, 2012; PHELPS; CHEN, 2016).

O modelo murino portador de sarcoma 180 (S180) é um dos modelos mais básicos que são utilizados para estudos da doença (KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016). A linhagem celular S180 é derivada de um sarcoma que foi inoculado e transportado em camundongos *Swiss Webster* e desenvolve-se em múltiplas linhagens de animais consanguíneos, devido à deficiência de β 2-microglobulina, desestabilização do complexo principal de histocompatibilidade classe I e falta de reconhecimento por linfócitos T citotóxicos do hospedeiro (SUZUKI; YAMADA, 1994). Este e outros modelos têm sido extensamente utilizados na pesquisa de novos agentes antitumorais (KWAK; MOON; LEE, 2006; CHUNG et al., 2010; KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016).

Além disso, os modelos de tumores *in vitro* são também ferramentas importantes para a pesquisa do câncer e servem como plataformas de triagem de baixo custo para terapias medicamentosas (WILDING; BODMER, 2014). Os modelos *in vitro* de tumores sólidos variam em complexidade e multiplicam-se desde linhagens derivadas de tumores, até modelos 3D do microambiente tumoral (INFANGER et al., 2013; VIDI; BISSELL; LELIEVRE, 2013). Alguns destes modelos foram desenvolvidos para fornecer uma visão “mecanicista” do crescimento ou proliferação de tumores, migração, invasão, remodelação da matriz extracelular, dormência ou latência, intravasamento, extravasamento, angiogênese e administração de drogas (TIMMINS; DIETMAIR; NIELSEN, 2004; KAM; REJNIAK; ANDERSON, 2012; RATH et al., 2013; SARISOZEN; ABOUZEID; TORCHILIN, 2014; KATT et al., 2016).

Citando caso análogo, o avanço do arsenal terapêutico contra leucemias, em partes, é devido ao emprego de vários modelos da doença na P&D de novos agentes antitumorais, utilizando linhagens celulares de leucemias humanas bem estabelecidas (KOEFFLER; GOLDE, 1980). Essas células fornecem sistemas modelo para o estudo do controle da diferenciação na leucemia humana; e, em um quadro mais amplo, os controles do desenvolvimento hematopoiético normal (DREXLER et al., 1995;



DREXLER; MACLEOD; UPHOFF, 1999). Por exemplo, a linhagem K562 é composta por células blásticas indiferenciadas, que são ricas em glicoforina e podem ser induzidas a produzir hemoglobina fetal e embrionária na presença de hemina, sendo comumente utilizadas na pesquisa oncológica (MIYAZAKI et al., 2010; ZHANG; WANG, 2015; NIK MAN et al., 2015).

A linhagem celular KG-1 é composta, predominantemente, de mieloblastos e promielócitos. Uma característica única dessas células é a sua dependência, quase completa, do fator estimulante de colônia para a proliferação em cultura (MRÓZEK et al., 2003). As investigações com estas células e as variantes selecionadas fornecem dados importantes sobre o controle da diferenciação leucêmica (ORAKI KOHSHOUR et al., 2013). Outra linhagem extensivamente utilizada em pesquisa é a HL-60 (ZARE MIRAKABADI et al., 2012; DIAB; SHAFIK; YASUDA, 2015; ZHOU et al., 2017), estabelecida, em 1977, de um paciente com leucemia mieloide aguda (BIRNIE, 1988).

As células se assemelham, principalmente com promielócitos, mas podem ser induzidas a diferenciar-se terminalmente *in vitro*. Por exemplo, alguns reagentes podem induzir diferenciação de HL-60 em células semelhantes a granulócitos ou monócitos/macrófagos (KANG et al., 2003). O genoma destas células contém um proto-oncogene *c-myc* amplificado; e os níveis do RNAm de *c-myc* são correspondentemente elevados em células indiferenciadas, mas diminuem, rapidamente, após a indução de diferenciação (JIANG et al., 2008). Esses recursos tornaram a linhagem celular HL-60, um modelo *in vitro* robusto em estudos oncológicos com células mieloides humanas (WIJESINGHE et al., 2013; CHEN et al., 2015).

A variabilidade dos modelos *in vitro* incluem fontes celulares (células de pacientes oncológicos, linhagens tumorais comercialmente disponíveis, células tronco tumorais, estromais, imunes, entre outras), propriedades biofísicas (pressão parcial de oxigênio, pH, fluxo intersticial, etc.), matriz extracelular (rigidez, arquitetura, etc.) e orientações bioquímicas (quimioatratores, fatores angiogênicos, etc.) (MATHER, 2012). Além disso, a complexidade do modelo depende em grande parte dos objetivos. Por exemplo, a triagem preliminar de drogas antitumorais pode ser realizada em cultura celular. Enquanto que estudos de invasão e motilidade de células tumorais podem ser realizados com células incorporadas em uma matriz extracelular (NYGA; CHEEMA; LOIZIDOU, 2011; XU; FARACH-CARSON; JIA, 2014; KATT et al., 2016).

Cabe ressaltar que os componentes cruciais de qualquer modelo de tumor *in vitro* são as células tumorais (GILLET; VARMA; GOTTESMAN, 2013). As linhagens são fáceis de cultivar, permitem a comparação direta de resultados experimentais e são amplamente utilizadas para estudar mecanismos moleculares da biologia celular do tumor e, mais expressivamente, como ferramentas na busca por novas drogas com potencial antitumoral, sejam elas sintéticas ou derivadas de produtos naturais (MCDERMOTT et al., 2014).



3.2 Produtos Naturais

A natureza, mestre artesã, deu origem a uma rica matriz de compostos moleculares. Sem dúvida, é um vasto recurso para a criação de agentes bioativos valiosos e desenvolvimento de medicamentos eficazes contra uma multiplicidade de doenças (CRAGG; NEWMAN, 2013). A natureza é a fonte primária e abundante de diversos quimiotipos biologicamente ativos. E embora relativamente poucos produtos naturais isolados resultem em drogas clinicamente efetivas, por via direta, essas moléculas únicas geralmente servem como modelos para a preparação de análogos mais eficazes, pró-drogas por meio da aplicação de metodologias químicas, como síntese total ou combinatória, ou mesmo a manipulação de vias biossintética (DEMAIN; VAISHNAV, 2011; BASMADJIAN et al., 2014; MALVE, 2016).

Desde tempos imemoriais, os produtos naturais têm sido a base do sistema tradicional de cura em todo o globo, tornando-se parte integrante da história e da cultura humana (CRAGG; NEWMAN, 2001). Os produtos naturais continuam entrando em ensaios clínicos ou, simplesmente, fornecendo inspiração para novos compostos que adentraram nestes avançados estudos, particularmente, atuando como agentes antitumorais ou antimicrobianos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Não obstante, cerca de 60% das drogas antitumorais, por via direta ou indireta, são derivadas de fontes naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Do ponto de vista oncológico, as melhorias na formulação de um bioativo podem resultar em uma administração mais eficaz do fármaco nos pacientes, ou a conjugação de moléculas naturais tóxicas em anticorpos monoclonais ou veículos poliméricos direcionados, especificamente, a epítomos em tumores de interesse, podem levar ao desenvolvimento de terapias inovadoras, específicas, mais seguras e eficazes (GROTHAUS; CRAGG; NEWMAN, 2010; KARIKAS, 2010). É inquestionável o papel essencial desempenhado pelos produtos naturais no desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos (GORDALIZA, 2007). As seções a seguir discutem, brevemente, alguns compostos que lograram êxito na P&D de medicamentos nesta área desafiadora.

3.2.1 Agentes quimioterapêuticos derivados de organismos marinhos

O oceano responde por uma variedade de organismos devido ao ambiente diversificado oferecido por diferentes zonas oceânicas (DONIA; HAMANN, 2003). Os enormes recursos ecológicos do mar foram explorados desde a antiguidade e incluíam o uso de animais marinhos, como peixes e preparações de algas, como fontes de medicamentos (MONTASER; LUESCH, 2011).

O meio marinho é um *habitat* natural para uma pluralidade de organismos vivos, com diferentes fisiologias e capacidade para se adaptar ao meio ambiente (MALVE, 2016). De mais de 33 filos de



animais conhecidos atualmente, cerca de 32 são incorporados no meio marinho, dos quais, 15 variedades estão, exclusivamente, presentes neste ambiente (HEJNOL; DUNN, 2016). Essa diversidade genética reflete em uma diversidade química promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos (GAW; THOMAS; HUTCHINSON, 2014). E, apesar de cobrir cerca de 70% do planeta, menos de 5% das profundezas do mar foram exploradas farmacologicamente, e menos de 0,01% dos leitos oceânicos foi vista em detalhes (MALVE, 2016).

Um número significativo de agentes antitumorais, derivados de organismos marinhos, demonstra potente inibição do crescimento de células tumorais humanas *in vitro* e, em vários casos, em modelos murinos *in vivo* (SIMMONS et al., 2005; YE et al., 2015; XING et al., 2017). Embora muitos agentes tenham adentrado em ensaios clínicos, na área oncológica, até agora, apenas quatro foram aprovados para uso em humanos (NEWMAN; CRAGG, 2014). Esses agentes (Figura 2) são citarabina (AracC), trabectedina (Yondelis®), eribulina (Halaven®), um derivado sintético baseado na estrutura da halicondrina B; e vedotina (monometil auristatina E, Adcetris®), contendo derivados de dolastatina 10, atuando em terapia alvo molecular (maiores detalhes serão apresentados a seguir).



Figura 2. Principais agentes quimioterapêuticos derivados de organismos marinhos.

NC1=NC(=O)N(C1)[C@H]2O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H]2OCc1ccc(cc1)C(O)N[C@@H](C)[C@H](O)C(=O)N[C@@H](CO)[C@H]2CCCN2C(=O)[C@H](CO)[C@H](C)N(C)C(=O)N[C@@H](C)[C@H](C)C(=O)OCc3ccc(NC(=O)N[C@@H](CCCCNC(=O)N)C(=O)N[C@@H](C)[C@H](C)C(=O)NCCCCCC4C(=O)N(CS*)C4=O)c3

cAC10



3.2.1.1 Citarabina e análogos nucleosídeos

A descoberta de arabinose contendo nucleosídeos bioativos, como espongotimidina e espongouridina por Bergmann e Burke (1955), no início dos anos 50, a partir da esponja caribenha *Tethya crypta*, provocou uma grande exploração do meio marinho como fonte de novos compostos bioativos, potenciais candidatos a drogas. Esta descoberta levou à identificação e desenvolvimento de análogos como a citarabina (Figura 2, n°1) como um potente agente antileucêmico e o agente antiviral, adenina-arabinosídeo (vidarabida, AraA) (LICHTMAN, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2014).

Outros análogos de nucleosídeos foram desenvolvidos e demonstraram atividade anticancerígena significativa (ROBAK et al., 2011). A clafabina é um análogo de nucleosídeo de purina, de segunda geração, que apresentou ampla gama de atividade clínica e grande potencial para induzir danos ao DNA de células leucêmicas. Em 2004, recebeu a aprovação da FDA para o tratamento de pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda. Além disso, houve outro estudo extensivo no tratamento desses pacientes em diferentes idades (MCGREGOR et al., 2009; TRAN; YANG, 2012; FOZZA, 2015).

A sapacitabina (CYC-682), um pró-fármaco análogo de nucleosídeo biodisponível oralmente, apresentou mecanismo de ação único, causando quebras de fitas simples do DNA, que serão convertidas em quebras de fitas duplas, quando as células entrarem em uma segunda fase S. Verificou-se também que é efetivo no tratamento de pacientes idosos com LMA. Para este produto natural, a designação de medicamento órfão para o tratamento de LMA e síndromes mielodisplásicas foi atribuída pela FDA em 2010 (KANTARJIAN et al., 2012; LIM; JAMIESON, 2014).

3.2.1.2 Trabectedinas

Embora o isolamento e a elucidação estrutural de derivados de ecteinascidina tenham sido relatados pela primeira vez em 1986, os artigos sobre a identificação da trabectedina (ET743, Figura 2, n°2), a mais ativa das ecteinascidinas, só apareceram em 1990. Este produto foi aprovado, na Europa, para o tratamento de sarcoma de tecidos moles avançado. E, ainda, foi concedido o *status* de medicamento órfão para o tratamento de sarcoma de tecido mole e câncer de ovário, pela FDA e *European Medicines Agency* (EMA) (AMANT et al., 2009; GAJDOS; ELIAS, 2011; GRIGNANI et al., 2015). Foi o primeiro produto natural "não modificado" derivado do mar para ser aprovado para o tratamento do câncer. Está sendo submetido a ensaios clínicos para o tratamento de sarcomas mamários, prostáticos e pediátricos. Alguns agentes estruturalmente relacionados à trabectedina, PM-10450 (Zalypsis®) e lurbinectedina, evoluíram para ensaios clínicos (NEWMAN; CRAGG, 2014).



3.2.1.3 Halicondrina B e Eribulina

O isolamento e a elucidação estrutural do produto natural complexo, halicondrina B (Figura 2, n°3), juntamente com vários outros derivados de halicondrina, foram relatados pela primeira vez na esponja marinha *Halichondria okadai*, em 1986. Este fato foi seguido de perto pelo isolamento da mesma série de compostos de diferentes esponjas coletadas em diferentes áreas oceânicas, que vão desde o Pacífico Central ao Oceano Índico, até as águas da Nova Zelândia (GERWICK; FENNER, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2014). Estes ativos demonstraram atuar como agentes desestabilizadores de tubulina e foram aprovados para o desenvolvimento pré-clínico pelo Instituto Nacional do Câncer, nos EUA, no início de 1992. A aquisição da matéria-prima provou ser desafiadora pela reduzida quantidade dos organismos. No entanto, coleções em larga escala e aquicultura no mar da esponja *Lissodendoryx* sp., na costa da Nova Zelândia, proveram quantidades suficientes de halicondrina B para estudos pré-clínicos (BAI et al., 2011; LI et al., 2015).

Um dos melhores análogos da halicondrina B, conhecido como eribulina (Figura 2, n°4), demonstrou atividade antitumoral, significativamente, potente em estudos *in vitro* e *in vivo* (TERASHIMA et al., 2014). Este composto foi escolhido para estudos pré-clínicos avançados e clínicos, utilizando síntese total sob condição de cGMP. Após ensaios clínicos prolongados, a eribulina (Halaven®) foi aprovada para o tratamento do câncer de mama refratário pela FDA, em 2010. Até o momento, a eribulina é, de longe, a droga mais complexa produzida por síntese total (HENSLEY et al., 2012; POLASTRO; AFTIMOS; AWADA, 2014; ASEYEV; RIBEIRO; CARDOSO, 2016).

3.2.1.4 Vedotina

A conjugação de monometil auristatina E (vedotina) e dolastatina 10 compõem a formulação brentuximab vedotina (Figura 2, n°5), droga efetiva no tratamento de doenças linfoproliferativas, como linfoma de Hodgkin (SCOTT, 2017; KILLOCK et al., 2017). O metabólito secundário, dolastatina 10, foi originalmente isolado de um molusco marinho *Dolabella auricularia*; algum tempo depois, foi isolado de espécies de *Symploca*, cianobactérias presentes na dieta do molusco (LUESCH et al., 2001). Há relatos da eficácia antitumoral de diferentes conjugações de vedotina e outros análogos complexados com anticorpos contra epítomos encontrados em vários tipos de câncer, incluindo mamários, gastrointestinais, pancreáticos, prostáticos, ovários e renais, leucemias, melanomas e pulmão de não-pequenas células (GARNOCK-JONES, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2014; CHALLITA-EID et al., 2016).



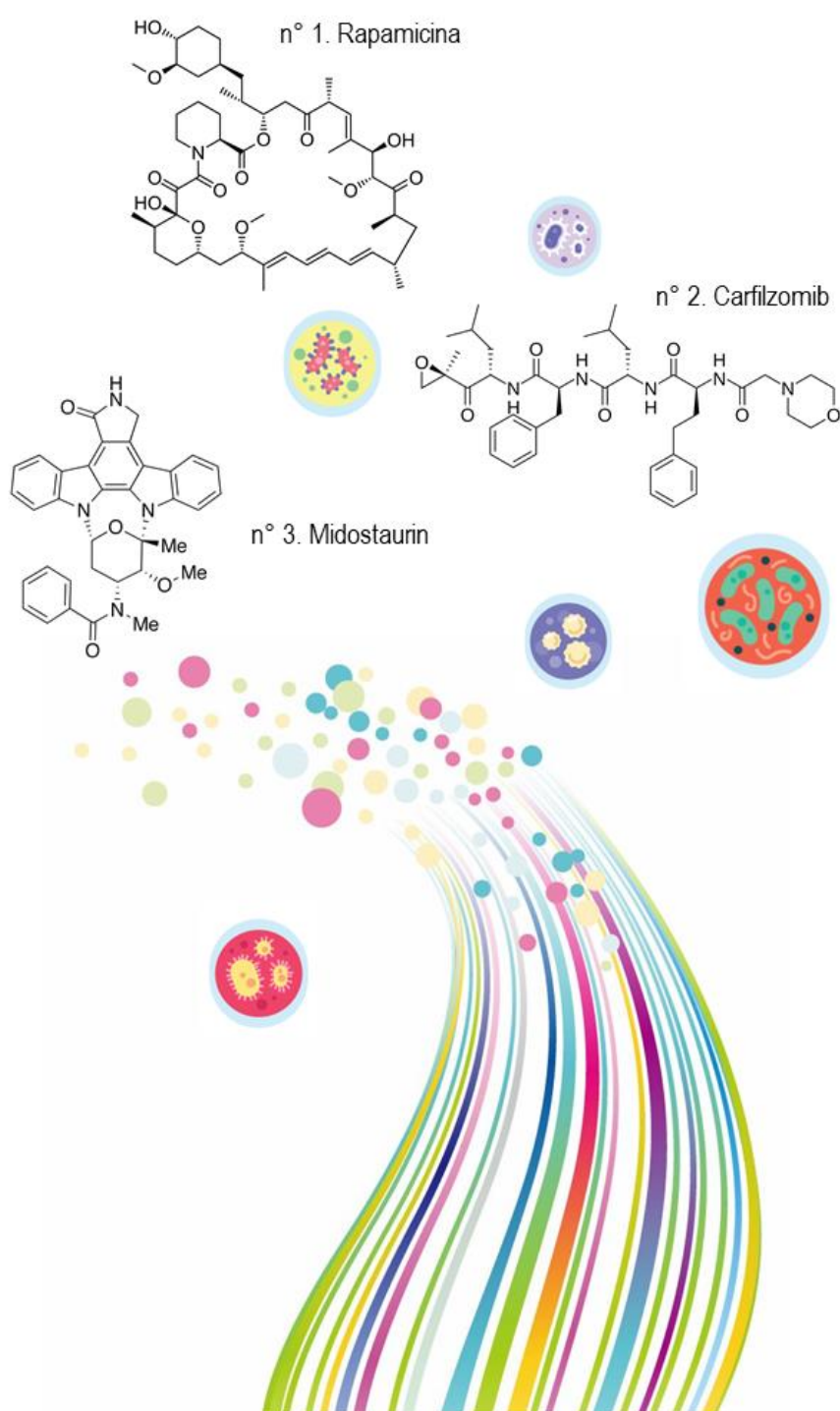
3.2.2 Agentes quimioterapêuticos derivados de fungos e bactérias

A descoberta do primeiro antibiótico penicilina, a partir do *Penicillium notatum* por Alexander Fleming, abriu uma era completamente nova da quimioterapia, alterando, assim, a qualidade da vida humana. Antibióticos antitumorais figuram entre os mais importantes agentes quimioterápicos (BLADT et al., 2013; KORNIEENKO et al., 2015). Estes incluem membros das classes de actinomicina, ansamicina, antraciclina, bleomicina, epotilona e estaurosporina. Com exceção das epotilonas, que são metabólitos do myxobacterium *Sorangium cellulosum*, os metabólitos das outras classes foram isolados de várias espécies de *Streptomyces* (EVIDENTE et al., 2014; GONZÁLEZ-MEDINA et al., 2016). Alguns avanços recentes no desenvolvimento de outros agentes anticancerígenos, derivados de micro-organismos serão discutidos nas seções a seguir.

3.2.2.1 Rapamicinas

A descoberta da rapamicina (sirolimus, Figura 3, n°1), antibiótico macrocíclico de 31 membros, produzido pela fermentação de uma cepa de *Streptomyces hygroscopicus*, isolada de amostras de solo em Rapa Nui (Ilha de Páscoa), foi relatada pela primeira vez em 1975. Inicialmente, ela foi apresentada com atividade antifúngica, depois foi aprovada para uso como agente imunossupressor (Rapamune®), em 1999 (SEHGAL, 2003). Embora tenha sido demonstrada atividade antitumoral, em 1984; apenas após os relatórios de identificação de “TOR” ('alvo da rapamicina'), como alvo molecular em leveduras em 1991, seguidos por mTOR, como o homólogo mamífero, em 1994, é que levaram ao desenvolvimento de uma ampla variedade de agentes anticancerígenos e outros agentes farmacológicos a partir deste produto (BJELOGRLIĆ; SRDIĆ; RADULOVIĆ, 2006; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

Figura 3. Principais agentes quimioterapêuticos derivados de micro-organismos.





As modificações químicas na rapamicina produziram dois medicamentos anticancerígenos clinicamente aprovados. O Everolimus (Afinitor®), que foi, inicialmente, aprovado como agente imunossupressor em 2004, mas a aprovação foi concedida para o tratamento de cânceres renais, cerebrais, pancreáticos e mamários em 2009, 2010, 2011 e 2012, respectivamente (MOTZER et al., 2008; YAO et al., 2016). Também completou, recentemente, ensaios de fase III, para o tratamento de linfoma difuso de grandes células B (NCT00790036), fígado (NCT01035229) e câncer de estômago (NCT00879333) (National Institute of Health, 2015 – clinicaltrials.gov).

O Temsirolimus (Torisel®) foi o primeiro aprovado como tratamento para carcinoma renal em 2007; e, atualmente, está em fase II para o tratamento de vários carcinomas (MALIZZIA; HSU, 2008; PATEL et al., 2016). Outro derivado de rapamicina, que é promissor no campo oncológico, trata-se do ridaforolimus, que concluiu ensaios de fase III para o tratamento de carcinomas de tecido mole e câncer de osso (CHAWLA et al., 2012; COLOMBO et al., 2013; DEMETRI et al., 2013; OZA et al., 2015).

3.2.2.2 Epoxomicin

Um análogo sintético de epoxomicina é o carfilzomib (Figura 3, nº2), um peptídeo α',β' -epoxicetona isolado de uma cepa de actinomicetos, cujo mecanismo de ação é inibir proteassoma por meio de ligação covalente, seletiva e estereoespecífica à subunidade 20S da proteassoma (KIM; CREWS, 2013). Foi aprovado pela FDA, em 2012, para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo recidivante e refratário, que receberam tratamento prévio com bortezomib, talidomida ou lenalidomida. Além disso, os ensaios de fase II estão em curso para o tratamento de outros tipos de câncer (REDIC, 2013; STEELE, 2013; THOMPSON, 2013; MUCHTAR; GERTZ; MAGEN, 2016).

3.2.2.3 Midostaurin

Midostaurin (Figura 3, nº3) é um derivado semissintético da estaurosporina, um alcaloide de indolocarbazole isolado de *Streptomyces staurosporeus*. Seu mecanismo de ação se dá por inibição de PKC e tirosino-quinase 3 Fms-relacionado (Flt3 [FLK2/STK1]) (PEMMARAJU et al., 2014). Este composto completou um ensaio clínico de fase IIB em pacientes com LMA e síndrome mielodisplásica de alto risco, com Flt3 de tipo selvagem ou variante e está em desenvolvimento clínico de fase III para o tratamento oral da LMA (FISCHER et al., 2010; GALLOGLY; LAZARUS, 2016).

Outros ensaios clínicos para o tratamento de pacientes com LMA, usando midostaurin, seja como agente único ou em combinação com azacitidina, bortezomib, citarabina, daunorubicina, decitabina e ácido trans-retinoico, estão em andamento; e, ensaios clínicos de fase III, estão sendo conduzidos para

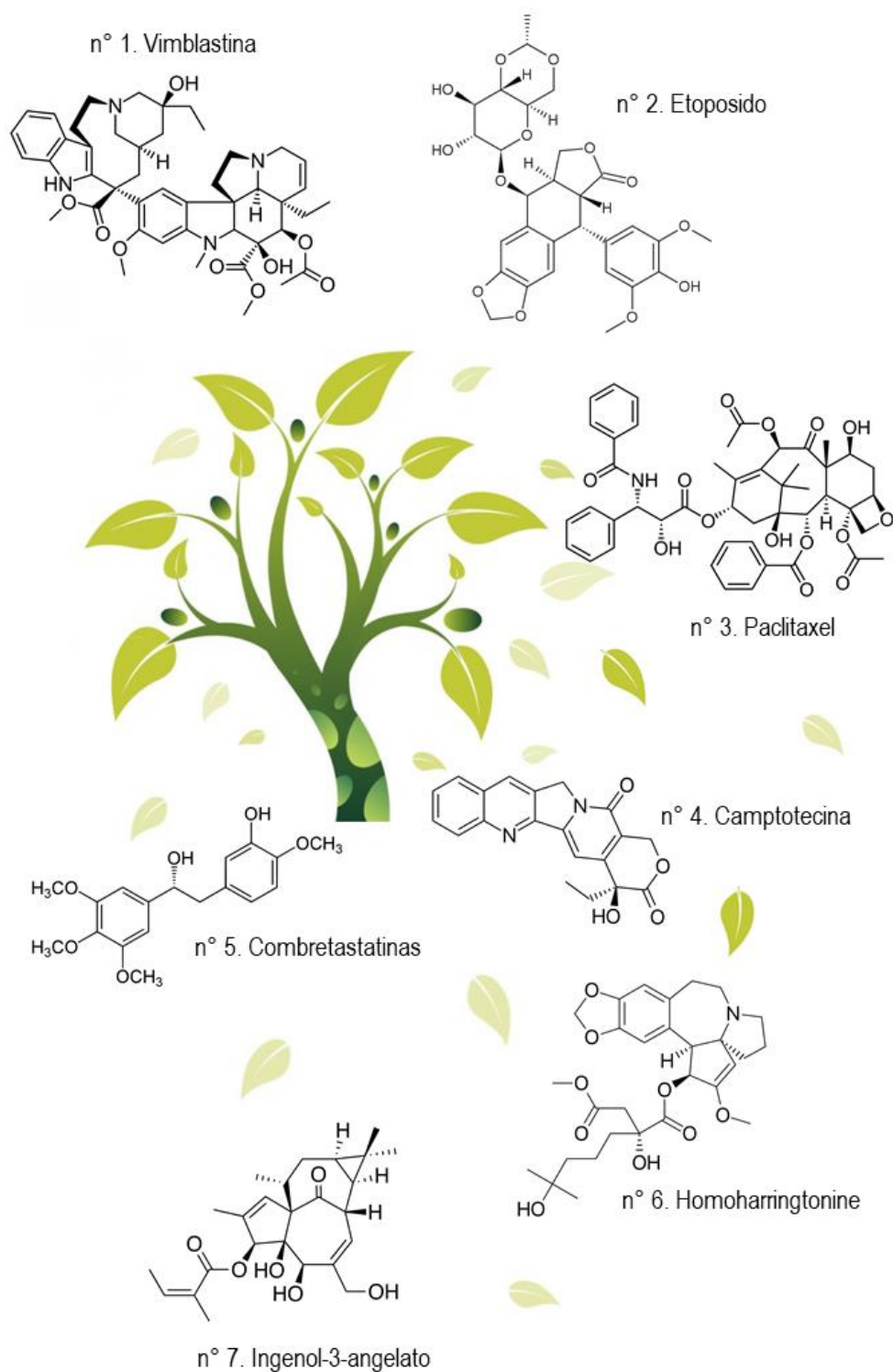


o tratamento de mastocitose sistêmica agressiva ou leucemia de mastócitos (STONE et al., 2017; LEVIS, 2017). A designação de medicamento órfão para o tratamento de LMA foi atribuída pela EMA, em 2004; e, no FDA, em 2009, bem como pelo tratamento da mastocitose pela EMA e FDA, em 2010 (KIM, 2017).

3.2.3 Agentes quimioterapêuticos derivados de plantas terrestres

Historicamente, as plantas foram e continuam sendo fontes primárias para descoberta de fármacos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). E, na área oncológica, agentes derivados de plantas, como vimblastina e vincristina, etoposido, paclitaxel, docetaxel, topotecano e irinotecano estão entre os quimioterapêuticos, atualmente, disponíveis mais eficazes contra o câncer (FRIDLENDER; KAPULNIK; KOLTAL, 2015). No entanto, muitos destes fantásticos agentes esbarram nos problemas da baixa solubilidade em meio aquoso e efeitos colaterais tóxicos significativos (MATHUR; HOSKINS, 2017). Assim, diversas pesquisas têm-se dedicado a reduzir o impacto desses fatores por meio do desenvolvimento de inúmeros análogos e pró-fármacos, além de métodos para aumentar a solubilidade aquosa e direcionar estes agentes a tumores específicos (FASINU et al., 2011; JABIR et al., 2012; GUNASEKARAN et al., 2014). A seguir, alguns dos principais agentes quimioterapêuticos (Figura 4), derivados de plantas terrestres, serão brevemente discutidos.

Figura 4. Principais agentes quimioterapêuticos derivados de plantas terrestres.





3.2.3.1 *Alcaloides da vinca*

Os primeiros agentes derivados de plantas que avançaram para o uso clínico foram os alcaloides da vinca, vimblastina (VBN, Figura 4, nº1) e vincristina (VCN), isolados da vinca de Madagascar, *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae) (MOUDI et al., 2013). Esta planta foi utilizada por várias culturas para o tratamento da diabetes. E, enquanto estava sob investigação como fonte de potenciais agentes hipoglicemiantes orais, observou-se que os extratos da planta reduziram a contagem de glóbulos brancos, causando depressão de medula óssea em ratos; e, posteriormente, também foi evidenciada atividade contra leucemia linfocítica em camundongos (ALI et al., 2012). Estas evidências levaram ao isolamento de VBN e VCN, como agentes ativos, cujo mecanismo de ação é interromper os microtúbulos, causando a parada do ciclo celular em metáfase; e, posteriormente, apoptose (HIMES et al., 1976; MOUDI et al., 2013).

Os análogos semissintéticos dos alcaloides da vinca efetivos que foram desenvolvidos incluem vinorelbina e vindesina, sendo a mais recente, a vinflunina (NG, 2011), um análogo bifluorado de segunda geração da vinorelbina. Estes agentes são utilizados, principalmente, em combinação com outros fármacos quimioterapêuticos contra uma variedade de cânceres, incluindo leucemias, linfomas, câncer testicular avançado, câncer de mama e pulmão e sarcoma de *Kaposi* (BURSTEIN et al., 2007; MAMTANI; VAUGHN, 2011; GALANO et al., 2011; CAPASSO, 2012; SORENSEN; CARUS; MELDGAARD, 2015).

3.2.3.2 *Podofilotoxinas*

As espécies *Podophyllum peltatum* L., comumente conhecida como mandrágora americana; e *Podophyllum emodi* W. do subcontinente indiano têm uma longa história de uso medicinal, incluindo o tratamento de câncer de pele e verrugas (IMBERT, 1998). A estrutura do principal constituinte ativo, a podofilotoxina, isolada pela primeira vez em 1880, apenas foi relatada na década de 1950. Os ensaios clínicos de várias ligninas semelhantes à podofilotoxina falharam devido à falta de eficácia e inaceitável toxicidade. Pesquisas extensas, no entanto, levaram ao desenvolvimento do etoposido (Figura 4, nº2) e teniposido como agentes clinicamente efetivos (GORDALIZA et al., 2000; DESBÈNE; GIORGI-RENAULT, 2002).

Quanto ao mecanismo de ação, enquanto a podofilotoxina se liga de forma reversível à tubulina, o etoposido e o teniposido inibem a topoisomerase II, induzindo a clivagem do DNA mediada pela topoisomerase II (GORDALIZA et al., 2000). O etoposido e o teniposido são utilizados no tratamento de linfomas e cânceres brônquicos e testiculares (DEMAIN; VAISHNAV, 2011; ALVARADO-LUNA; MORALES-ESPINOSA, 2016).



3.2.3.3 Taxanos

Outra aquisição ao arsenal de agentes quimioterapêuticos derivados de plantas são os taxanos, derivados de diterpenos, considerados uma das mais relevantes classes de drogas quimioterápicas em uso clínico. Atualmente, os dois medicamentos mais clinicamente eficazes desta classe são paclitaxel (Taxol®, Figura 4, nº3), originalmente isolado da casca do teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae); e docetaxel (Taxotere®), um análogo semissintético desenvolvido a partir de 10-deacetilbacatina III (DAB), isolado das folhas do teixo europeu, *Taxus baccata* (FAUZEE, 2011; MUKHTAR; ADHAMI; MUKHTAR, 2014).

O DAB também foi, e continua sendo, convertido semissinteticamente para paclitaxel, proporcionando, assim, uma fonte “sustentável” da droga (ZOCHER et al., 1996; LI et al., 2017). É interessante pontuar que as folhas de *T. baccata* são utilizadas, na medicina tradicional da Índia asiática (Ayurvédica), com uso relatado no tratamento de “câncer” (YELNE et al., 2005). Quanto ao mecanismo de ação, os taxanos promovem a polimerização de heterodímeros de tubulina para microtúbulos, suprimindo as mudanças dinâmicas nos microtúbulos, resultando em parada mitótica (ABAL; ANDREU; BARASOAIN, 2003). O paclitaxel é utilizado no tratamento de câncer de mama, ovário e pulmão de não-pequenas células. Também demonstra eficácia contra sarcoma de Kaposi; enquanto que o docetaxel é usado principalmente no tratamento de câncer de mama e de pulmão de não-pequenas células (MEKHAIL; MARKMAN, 2002; WEAVER, 2014).

A maioria dos análogos e novas formulações do Taxol® foram projetadas para tentar superar as limitações clínicas do paclitaxel e do docetaxel, incluindo fraca solubilidade, reações alérgicas, toxicidades dose-limitantes, como mielossupressão ou neuropatia sensorial periférica. E, ainda, o desenvolvimento da resistência ao fármaco devido ao transporte de efluxo mediado por glicoproteína P (YARED; TKACZUK, 2012; MUGGIA; KUDLOWITZ, 2014).

O análogo cabazitaxel (Jevtana®) foi aprovado para o tratamento do câncer de próstata metastático (em combinação com prednisona e/ou prednisolona) e está em ensaios clínicos, seja como agente único ou em combinação com outros agentes, para o tratamento de cânceres, incluindo próstata, bexiga, cérebro (glioblastoma multiforme), câncer de cabeça e pescoço, ovário, estômago e urinário e pulmão de não-pequenas células (VILLANUEVA et al., 2011; ABIDI, 2013). Outros análogos estruturais em vários estágios de desenvolvimento clínico incluem taxoprexina ou a conjugação de ácido docosa-hexaenoico com paclitaxel (Protarga), um pró-fármaco de paclitaxel ligado, covalentemente, ao ácido graxo ω -3, de ocorrência natural, que permite a liberação do bioativo diretamente ao tecido tumoral (YARED; TKACZUK, 2012; MUGGIA; KUDLOWITZ, 2014; OJIMA et al., 2016).



3.2.3.4 Camptotecinas

As camptotecinas (CPT, Figura 4, n°4) foram isoladas da árvore ornamental chinesa *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae). Estes fitoquímicos têm como mecanismo de ação a ligação ao complexo binário de topoisomerase I-DNA, resultando em um complexo ternário estável, prevenindo, assim, a religação de DNA, causando danos ao material genético, levando a célula à apoptose. Muitos esforços científicos levaram ao desenvolvimento de derivados semissintéticos como topotecano, irinotecano e belotecano, aprovados para uso clínico (LIU et al., 2000; PIZZOLATO; SALTZ, 2003; SRIRAM et al., 2005).

As CPT e seus derivados são pouco solúveis em água e solventes aprovados. A partir destes problemas, houve o desenvolvimento de pró-fármacos macromoleculares e formulações à base de nanomedicina com objetivo de melhorar a distribuição preferencial desses agentes em células e tecidos neoplásicos (LIU et al., 2015). Estes avanços resultaram no desenvolvimento de produtos que exibem eficácia melhorada e efeitos colaterais reduzidos. Por exemplo do composto CRLX101, um conjugado de nanopartícula polimérica, composta por copolímero de ciclodextrina-polietilenoglicol, que apresenta aumento de solubilidade cerca de 1000 vezes, em comparação com CPT, demonstrando, ainda, resultados promissores de segurança, farmacocinética e eficácia em um ensaio clínico inicial em pacientes com neoplasia maligna avançada (SVENSON et al., 2011; CHAZIN et al., 2014).

3.2.3.5 Combretastatinas

As combretastatinas (CB, Figura 4, n°5) são uma família de estilbenos, originalmente isolados da casca da raiz de *Combretum caffrum*, também conhecida como Salgueiro de capim, no sul da África (CIRLA; MANN, 2003). Estes fitoquímicos atuam como agentes disruptivos vasculares, interagindo seletivamente com células endoteliais que revestem a vasculatura do tumor (PAN; CHAI; KINGHORN, 2012). Eles também produzem alterações no citoesqueleto de tubulina e remodelam o citoesqueleto de actina, induzindo mudança significativa na conformação tridimensional das células endoteliais imaturas. E, ainda, interrompem o fluxo sanguíneo dos capilares, desnutrindo o tumor, ocasionando a morte das células tumorais. Cabe ressaltar que este mecanismo de ação diferencia as combretastatinas de inibidores de angiogênese, que são projetados para agir prevenindo o crescimento de novos vasos sanguíneos (TOZER et al., 2002).

Algumas pró-drogas derivadas de combretastatina foram desenvolvidas, como o fosfato de CB A4 (fosbretabulina, CBA4F) e difosfato de CB A1 (OXI-4503, CBA1DF) (WEST, 2004; PATIL et al., 2015).



Em 2003, a CBA4F recebeu a designação de medicamento órfão pela FDA para o tratamento de câncer de tireoide anaplásico, câncer de tireoide medular e câncer de tireoide papilar ou folicular em estágio IV.

O CBA1DF demonstrou eficácia promissora no tratamento de pacientes com LMA recidivante e refratária e síndromes mielodisplásicas. Em 2012, recebeu a designação de medicamento órfão pela FDA, para o tratamento de LMA (TURNER et al., 2013).

3.2.3.6 Homoharringtonine

O isolamento e a estrutura da homoharringtonine (mepesuccinato de omacetaxina, HHT, Figura 4, nº6) foram apresentados, ainda na década de 1970, a partir da árvore chinesa, *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* (Cephalotaxaceae) (POWELL et al., 1970). A casca dos caules das espécies de *Cephalotaxus* tem uma longa história de uso na medicina tradicional chinesa para o tratamento de várias doenças. E, em 1983, os pesquisadores chineses relataram citotoxicidade significativa da fração total de alcaloides de *Cephalotaxus fortunei* Hook F (KANTARJIAN et al., 2001).

A mistura racêmica de HHT já tem sido utilizada, na China, para o tratamento de LMA e leucemia mieloide crônica (LMC) (QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2008). Enquanto que HHT purificado demonstrou eficácia contra várias leucemias, incluindo variações resistentes ao tratamento padrão, com remissão hematológica completa relatada em pacientes com LMC de fase crônica tardia (KANTARJIAN et al., 2001; LUCAS et al., 2010). Como mecanismo de ação, a HHT atua como um inibidor de proteína tirosina quinase de largo espectro (LAM et al., 2016) e foi aprovado, em 2012, pela FDA, para o tratamento de pacientes adultos com LMC ou LCM de fase acelerada (KANTARJIAN; O'BRIEN; CORTES, 2013).

3.2.3.7 Ingenol (*ingenol-3-angelato*)

A planta australiana *Euphorbia peplus* (Euphorbiaceae) é comumente utilizada como remédio caseiro para o tratamento de várias doenças de pele, incluindo câncer. Os estudos clínicos com partes brutas de *E. peplus*, ainda na década de 1970, forneceram provas convincentes de sua eficácia. O composto ativo, identificado a partir dela, é o ingenol-3-angelato (Figura 4, nº7), um diterpeno que demonstrou agir por meio da ativação da proteína quinase C. Vários relatórios de ensaios clínicos do composto para o tratamento da queratose actínica foram publicados (SILLER et al., 2009; LEBWOHL et al., 2012; GRAS, 2013); e, em 2012, foi aprovado como formulação de gel tópico (Picato®) para essa indicação pela FDA.



Este e tantos outros exemplos ressaltam a importância dos diterpenos como ferramentas terapêuticas (KUTTAN et al., 2011; HUANG et al., 2012). Mais de 250 diterpenos anticancerígenos e seus derivados foram alvos de pesquisas, atuando nas mais diferentes vias celulares (SCOTTI et al., 2014; PETIWALA; JOHNSON, 2015; NABATCHIAN et al., 2017; AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI, 2017). Alguns destes já foram submetidos a ensaios clínicos, enquanto outros ainda permanecem sob investigação em estudos não clínicos (ISLAM, 2017). Considerando o impacto destes compostos para a área oncológica, a seguir serão discutidos, brevemente, os principais mecanismos de ação antitumoral desempenhados pelos diterpenos.

3.3 Diterpenos: agentes promissores na oncologia

Os diterpenos compõem a estrutura química do esqueleto primário de muitos compostos naturais biologicamente importantes (HANSON, 2016). Estes produtos pertencem à classe de terpenos, com base no esqueleto C₂₀, composto por quatro unidades de isopreno (C₅) originadas do mevalonato ou desoxixilulose-fosfato (não-mevalonato). Mais de 3000 diterpenos foram explorados a partir da natureza, embora apenas um pequeno número deles seja reconhecido como clinicamente efetivo (ISLAM et al., 2016; ISLAM, 2017).

De forma isolada ou presente em óleos essenciais, estes compostos alcançaram grande destaque por seus efeitos biológicos, como atividades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antiparasitária, ansiolítica, antidepressiva, antiepiléptica, antiplaquetária, antitumoral e anti-hipertensiva (CÁRDENAS; QUESADA; MEDINA, 2011; WU et al., 2013; BARNES et al., 2013; DE ANDRADE MOURA et al., 2014; BHATTACHARYA et al., 2015; ISLAM et al., 2016a; ISLAM et al., 2016b; ALENCAR et al., 2017; CAMPOS et al., 2017). E no que diz respeito à pesquisa e desenvolvimento de novas drogas, os diterpenos isolados têm potencial suficiente para serem utilizados no desenvolvimento de novos medicamentos antitumorais (MILLER; NEILAN; SZE, 2008), ainda mais, se considerarmos seus mecanismos de ação a serem discutidos a seguir.



3.3.1 Mecanismos antitumorais evidenciados em diterpenos

3.3.1.1 Indução de parada do ciclo celular, apoptose e autofagia

Em organismos multicelulares, a proliferação e morte celular devem ser reguladas a fim de manter a homeostase dos tecidos (BITEAU; HOCHMUTH; JASPER, 2011). Muitas observações sugeriram que esta regulação pode ser alcançada, em parte, pelo estreito controle dos processos de progressão do ciclo celular e a morte celular programada (apoptose), por meio de vários fatores combinados. Por outro lado, a autofagia está, intimamente, associada à morte de células eucarióticas por apoptose (EL-KHATTOUTI et al., 2013). De fato, em alguns casos, as mesmas proteínas controlam a autofagia e a apoptose. Além disso, a sinalização apoptótica pode regular a autofagia e, inversamente, a autofagia pode regular a apoptose (e provavelmente outros mecanismos de morte celular) (YONEKAWA; THORBURN, 2013; ANDING; BAEHRECKE, 2015). Compostos que possam regular estas vias são apreciáveis na terapia oncológica (FULDA, 2017).

O diterpeno de *Euphorbia fischeriana*, Jolkinolido B, induz morte celular por apoptose por meio da via de sinalização mitocondrial fosfatidilinositol 3-cinase/serina-treonina cinase (PI3K/Akt), em células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 (LIN et al., 2012). Enquanto o diterpeno do café, caveol, age por meio da clivagem de BID, caspase-3 e poli-(ADP-ribose) polimerase (PARP), bem como pela regulação positiva de BAX/Bcl-xL em células de mesotelioma MSTO-211H e H28 (LEE et al., 2012).

Por outro lado, os diterpenoides neo-clerodanos, isolados de *Salvia* spp., induzem apoptose por ativação de proteínas pró-apoptóticas específicas em lisado celular de linfoma histiocítico U937 (FAIELLA et al., 2012). O ácido ent-caur-16-en-19-oico induziu aumento da expressão de genes apoptóticos (caspase-8 e caspase-3) e diminuiu a expressão de genes antiapoptóticos (miR-21 e c-FLIP) em células de glioblastoma humano U87 (LIZARTE NETO et al., 2013). Os diterpenos horminona, roileanona e sugiol, de *Peltodon longipes*, induziram apoptose e parada do ciclo celular em fases G1/G0 e S, em linhagem celular de câncer pancreático humano MIA PaCa-2 (FRONZA et al., 2012). Enquanto o 7-metoxi-rosmanol induziu parada em G2/M, bem como apoptose via caspase-3 e caspase-9, em células de neuroblastoma humano (TABATA et al., 2012).

Foi evidenciado, também, indução de apoptose e autofagia pelo diterpeno fosfato de oridonina, em células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-436 e MDA-MB-231 (LI et al., 2015), enquanto que tanshinonas induziram estes eventos em células de câncer de pulmão 95D (GAO et al., 2015a). O estudo de Burmistrova e colaboradores (2013) apresentou 30 diterpenoides que induziram morte celular associada à liberação de proteínas mitocondriais, incluindo o citocromo c, segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria (SMAC/DIABLO), AIF (fator indutor de apoptose), inibição da sinalização de



cinase regulada por sinal extracelular e ativação da via p38 MAPK em várias linhagens tumorais humanas (HL-60, U937, Molt-3, SKMEL-1 e MCF-7). Além destes, o diterpenoide derivado de clorofila, fitol, demonstrou atividade antitumoral por meio da indução de apoptose via ativação de caspase-9/3 e inibição da sinalização epitelial de transição mesenquimatosa em células de carcinoma hepatocelular (Huh7 e HepG2) (KIM et al., 2015). Maiores informações sobre este composto serão apresentadas a *posteriori*.

3.3.1.2 Citotoxicidade

O efeito citotóxico em células tumorais é um objetivo primário de qualquer terapia oncológica, que pode ser alcançada por uma ou diversas vias. Os diterpenoide labdanos (*Hedycoronals* A e B), isolados do *Hedychium coronarium*, demonstraram efeitos citotóxicos em células endoteliais de cordão umbilical humano (ZHAN et al., 2012). Por outro lado, os diterpenos com esqueleto de desidroabiétilo, apresentaram citotoxicidade em células de hepatoma (SMMC-7721), câncer de pulmão (A-549), glioma (C-6) e adenocarcinoma de mama (MCF-7) (RAO et al., 2012). Quatro diterpenoides isolados de *Anopterus macleayanus* apresentaram potentes efeitos citotóxicos em linhagens de câncer de próstata humano (LNCaP C4-2B e DuCaP) e linhagens não malignas (BPH-1 e WPMY-1) (LEVRIER et al., 2015). Além disso, os diterpenos de *Casearia graveolens* inibiram, fortemente, as células de câncer de mama (MEESAKUL et al., 2016).

Seis rabdosinas isoladas de *Rabdosia serra* induziram efeito citotóxico em duas linhagens de câncer humano (WANG; XUAN, 2016). Não obstante, vibsanina X, isolada de *Viburnum odoratissimum* exerceu efeito citotóxico significativo em diferentes linhagens tumorais (HL-60, SMMC-7721, A-594, MCF-7 e SW-480) (HE et al., 2016). Outros diterpenos oriundos de *Bursera microphylla* (MESSINA et al., 2015), *Teucrium viscidum* (GAO et al., 2015b), *Euphorbia ebracteolata* (YUAN et al., 2016), *E. aellenii* (YAZDINIPOUR et al., 2016), *Perenniporia subacida* (WEN et al 2016), *Abies fargesii* (WU et al., 2016) e *Premna tomentosa* (REKHA et al., 2016) também demonstraram efeitos citotóxicos em diferentes linhagens tumorais.

3.3.1.3 Atividade antiproliferativa e inibição de diferenciação

Geralmente, em células saudáveis, a proliferação e a diferenciação celular demonstram uma relação inversa, contrariamente ao observado em tumores, em que células imaturas são rápida e anormalmente submetidas à divisão (RUIJTENBERG; VAN DEN HEUVEL, 2016). Assim, compostos que exerçam efeitos sobre estes mecanismos podem ser ferramentas preciosas na terapia oncológica. Em um estudo



foram identificados e isolados de *Chlamisus minax*, sete diterpenos que exerciam atividade antiproliferativa nas linhagens tumorais HepG-2 e MCF-7 (MA et al., 2012).

Além disso, onze diterpenos macrocíclicos de *Euphorbia piscatoria* demonstraram atividade antiproliferativa em linhagens tumorais gástricas (EPG85-257), pancreáticas (EPP85-181) e de cólon (HT-29) (REIS et al., 2014). Os diterpenoides de *Radix curcumae* também inibiram, significativamente, a proliferação celular e induziram apoptose em células de adenocarcinoma de cólon (SW620) por meio de sinalização de MAPK e via dependente de caspase-3 (SHEN et al., 2014). Em células tumorais de mama (MDA-MB-231) também foram observadas atividades antiproliferativas, bloqueio de migração e supressão de β -catenina, induzidas pelo diterpeno Penitrem A (SALLAM et al., 2013). Outros diterpenos indutores de atividade antiproliferativa incluem o ácido pseudolarico B (YU et al., 2015), oridonina (YANG et al., 2015), tanshinona (YAO et al., 2015), tanshinona IIA (ZHANG et al., 2016) e tonantzitlolona A e seu enantiômero sintético (PFEFFER et al., 2016).

3.3.1.4 Atividade pró-oxidante

A sinalização redox desempenha papéis importantes na regulação da morte e sobrevivência celular em resposta à terapia oncológica. Modulando estas vias, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO's/ERN's), quando em excesso, induzem estresse oxidativo que, por sua vez, desencadeiam (ISLAM et al., 2016c) vários processos celulares, resultando em inibição da proliferação celular ou morte celular por apoptose ou autofagia, como resultado de lesões em componentes celulares (ZHANG et al., 2015). Além disso, a maioria das terapias oncológicas, especialmente a quimioterapia e radioterapia, atuam por meio dos efeitos crônicos de ERO's em células cancerígenas (ISLAM, 2017).

Em um estudo foi evidenciado que o diterpeno, longikaurina A, induziu morte celular mediada por ERO's em células de mieloma H929 (ZHAO et al., 2012). Outro estudo demonstrou que esse diterpeno, isolado de *Isodon ternifolius*, também por meio da produção de ERO's, induziu morte celular por apoptose e parada do ciclo celular em fase G2/M de células de carcinoma hepatocelular e modelos de xenoenxerto (SMMC-7721) (LIAO et al., 2014). Outros exemplos incluem o diterpeno carnosol, que produziu aumento dos níveis de ERO's e da fosforilação de cinase 1 e 2, reguladas por sinal extracelular (pERK1/2), com parada do ciclo celular em fase G2 de células tumorais MDA-MB-231 (AL DHAHERI et al., 2014). O diterpenoide, triptolido, também induziu morte celular por apoptose, por meio da geração de ERO's, em vias mitocondriais de células de câncer nasofaríngeo humano (HNE1, resistentes à cisplatina) (WANG et al., 2015a). Além disso, Huang e colaboradores (2015) sugeriram que cinco diterpenos isolados de *Cladiella hirsute* reduziram a geração de ERO's, demonstrando efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos em neutrófilos humanos normais.



Em outro estudo, o ginkgolido B (do *Ginkgo biloba*) reduziu a geração de ERO's induzida por cisplatina, via redução da expressão de NADP oxidase 2 (NOX2) e amplificou a atividade antitumoral via Akt/Nrf2, bem como inibiu vias de apoptose mitocondrial em células auditivas HEI-OC1 (MA et al., 2015). Além disso, sete diterpenos isolados de *Teucrium fruticans* exibiram efeito inibitório de iNOS em macrófagos RAW 264.7 (LV et al., 2015). Enquanto o derivado de tanshinona I, a dihidrotanshinona I, induziu apoptose e autofagia dependentes de ERO's, em camundongos com xenoenxerto de câncer de cólon (WANG et al., 2015b).

3.3.1.5 Inibição de migração, invasão e metástase

A migração celular é um processo essencial no desenvolvimento e manutenção de organismos multicelulares. Os erros que ocorrem durante este processo podem levar a algumas consequências graves, incluindo a formação de tumores e metástases. No entanto, as células podem migrar em resposta a sinais externos específicos, incluindo fatores químicos e mecânicos (GANGULY et al., 2012). Nesse sentido, fitoquímicos podem ser utilizados como alvos terapêuticos. A Tanshinona IIA demonstrou inibir a migração celular de câncer gástrico por meio da diminuição da expressão proteica de NF- κ B-p65, COX-2 e metaloproteinases (MMP-2, 7 e 9) (SU, 2016). Outro estudo destacou que diterpenos cembranoides, também inibiram a migração de linhagens tumorais humanas (WELFORD et al., 2016).

Por outro lado, a invasão celular está relacionada à migração celular, que define a capacidade das células de se tornarem móveis e atravessarem a matriz extracelular, dentro de um tecido ou infiltrar-se em tecidos vizinhos. As células cancerosas que se tornam invasivas são frequentemente disseminadas para um sítio secundário, caracterizando o processo de metástase. O diterpenoide excisanina A, isolada de *Isodon macrocalyxin*, inibiu o processo de invasão de células tumorais MDA-MB-231 e SKBR3, via supressão de MMP-2 e MMP-9, bem como pela via de sinalização de integrina β 1/FAK/PI3K/Akt/ β -catenina (QIN et al., 2013). Além disso, o diterpenoide triptolido também inibiu a migração celular, invasão e metástase em linhagem de carcinoma bronquialveolar H358 (RENO; KIM; RAZ, 2015).



3.3.1.6 Atividade imunossupressora e quimiopreventiva

A imunossupressão é um processo caracterizado pela redução na ativação ou eficácia do sistema imunológico (SHELTON et al., 2016). No entanto, uma supressão imune parcial, especialmente no local do tumor, pode ser um alvo promissor da terapia oncológica. O diterpeno subglutanol A, dos subglutinantes de *Fusarium*, exibiu atividade imunossupressora em células MCF-7 (LIM et al., 2015).

Outro ponto que merece destaque está relacionado ao câncer secundário, como consequência comum do tratamento oncológico, especialmente radiação e quimioterapia. Os quimiopreventivos são os agentes farmacológicos, sejam de origem natural ou não, que inibem o desenvolvimento de câncer invasivo, impedindo danos ao DNA ou bloqueando a progressão de células pré-malignas (TSAO et al., 2004). O estudo de Kim e colaboradores (2012), sugeriu que o ácido acantoico, isolado de *Acanthopanax koreanum*, apresentava potencial terapêutico quimiopreventivo por via de sinalização dependente de p38 (MAPK) em células leucêmicas HL-60. Considerando as informações supracitadas acerca dos diterpenos, pode-se observar que estes fitoquímicos atuam em múltiplas vias celulares, em diferentes linhagens tumorais, tanto de forma isolada, quanto sinergicamente ao serem combinados com medicamentos ou drogas quimioterápicas. Esta pluralidade de efeitos orquestrados ressaltam a importância destas substâncias no contexto oncológico. A seguir, um diterpenoide promissor nesta área será apresentado.

3.3.2 Fitol (FIT)

O FIT é amplamente distribuído em algas (XIAO; YUAN; LI, 2013; ISHIBASHI et al., 2014), plantas, bactérias, especialmente cianobactérias (RONTANI; VOLKMAN, 2003; VAVILIN; VERMAAS, 2007), intestino de ruminantes e seus produtos lácteos (SCHOUTEN et al., 2008). Em plantas, o composto é sintetizado tanto por meio da via do ácido mevalônico (VAVILIN; VERMAAS, 2002; ECKHARDT; GRIMM; HORTENSTEINER, 2004; BOUVIER; RAHIER, CAMARA, 2005), quanto pelo 2-C-metileritritol-4-fosfato (SCHOUTEN et al., 2008; ISLAM et al., 2015). Quimicamente, trata-se de um diterpenoide (C_{20} , $C_{20}H_{40}O$), denominado (E,7R,11R)-3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol (nomenclatura IUPAC). Seu peso molecular é de 296,54 g/mol, densidade de 0,8543 g/cm³, ponto de ebulição entre 132-202°C, índice de refração de 1.460-1.466, gravidade específica de 0,850, pressão de vapor <0,001 mmHg a 20°C e solubilidade em água de 0,00327 mg/L, a 25°C (MCGINTY; LETIZIA, 2010).

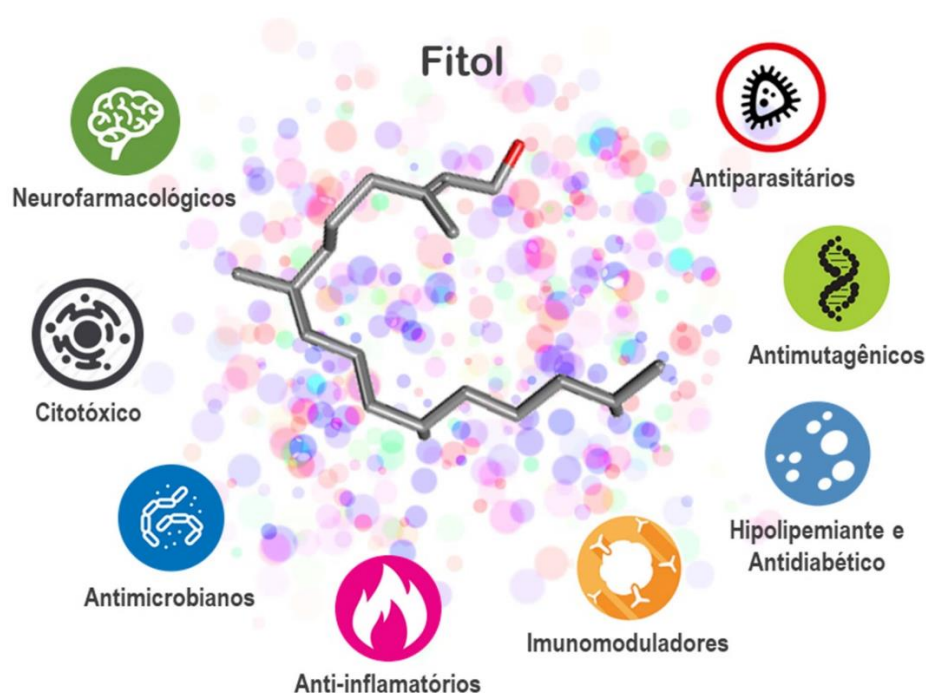
Em estudo farmacocinético, ratos tratados com 0,5 mg de FIT, em 0,5 mL de óleo de milho, demonstraram a presença do composto em excretas/conteúdo intestinal, linfa, CO₂ expirado, urina e



figado nas proporções de 43,9%, 33,1%, 3%, 1% e 0,6%, respectivamente, após 24h da ingestão. Por outro lado, cerca de 80% de FIT inalterado foi detectado no plasma de ratos após 48h da administração (MCGINTY; LETIZIA, 2010). O FIT é facilmente absorvido em intestino delgado e metabolizado a nível hepático (BAXTER et al., 1967; GLOERICH et al., 2006). O importante metabólico do FIT é o ácido fitânico (FA) (MIZE et al., 1966; HANSEN, 1980; VAN DEN BRINK et al., 2004). Além disso, estudos anteriores demonstraram que tanto o FIT, quanto o FA se acumulam em roedores (MIZE et al., 1969; GLOERICH et al., 2005) e em gordura, figado, plasma, leite, carne e rúmen de ruminantes (HIDIROGLOU; JENKINS, 1972).

Diversas atividades farmacológicas foram atribuídas ao FIT (Figura 5), por exemplo, efeitos neurofarmacológicos (antiepiléptico (COSTA et al., 2012), ansiolítico (COSTA et al., 2014), antidepressivo (COSTA et al., 2011) e antinociceptivo (SANTOS et al., 2013), antioxidantes (COSTA et al., 2016), anti-inflamatórios (SILVA et al., 2014), hipolipemiante (BRUCKERT; ROSENBAUM; LOWERING, 2011), imunomodulador (CHOWDHURY; GHOSH, 2012), antidiabético (ELMAZAR et al., 2013) e antimicrobiano (PEJIN et al., 2014). Além destas atividades, em teste MTT (*in vitro*), o composto induziu citotoxicidade em sete linhagens tumorais (mama MCF-7 e MDA-MB-231, próstata PC-3, cérvix HeLa, cólon HT-29, pulmão A-549 e melanoma Hs294T) e em célula normal (fibroblasto derivado de pulmão MRC-5) (SONG; CHO, 2015; KIM et al., 2015).

Figura 5. Principais efeitos do diterpenoide FIT em modelos *in vitro* e *in vivo*.



Fonte: Adaptado de Islam e colaboradores (2015).



O FIT também demonstrou inibir aromatase, enzima relacionada à tumorigênese mamária, endometrial e ovariana, destacando seu potencial como anticancerígeno (GUO et al., 2014b). Outro estudo aponta efeito antimutagênico (120 mg/kg; via oral), especificamente pela via p38 (MAPK) (KAGOURA; MATSUI; MOROHASHI, 1993). Em *Salmonella typhimurium* (TA100), o diterpenoide foi considerado não mutagênico em concentrações de 0,1% a 5,0% (MCGINTY; LETIZIA, 2010). Efeito antiteratogênico também foi atribuído ao fitoquímico (500 mg/kg; via oral), pela inibição de receptores RAR e RXR (ARNHOLD; ELMAZAR; NAU, 2002). Dados toxicológicos agudos demonstraram que o FIT é bem tolerado em roedores (CHOI et al., 1993; ATSHAVES et al., 2004). Para ratos albinos, a DL₅₀ foi acima de 10 g. Por outro lado, o tratamento com FIT na dose de 250 mg/kg/dia, em ratos machos e fêmeas, induziu lesões hepáticas, com alteração do cordão de hepatócitos e pequenas áreas multifocais de necrose, acompanhado de infiltração de células inflamatórias (MCGINTY; LETIZIA, 2010).

As relevantes informações levadas em conjunto, ressaltam o potencial do FIT na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Neste sentido, faz-se necessário a investigação extensiva deste composto em diferentes abordagens, principalmente, estudos toxicológicos e toxicogenéticos, a fim de que o FIT possa figurar como alternativa na terapia oncológica.

3.4 Estudos toxicológicos e toxicogenéticos

“Todas as substâncias são venenos. Não há nenhuma que não seja um veneno, mas a dose certa, diferencia um veneno e um remédio” (Paracelso, Philippus von Hohenheim, 1493–1541).

A memorável declaração de Paracelso, médico, alquimista e astrólogo, frequentemente é citada na área toxicológica e, não é de se surpreender, que ele seja amplamente considerado o pai da toxicologia (DONALDSON; SEATON, 2012). A triagem toxicológica de novos compostos é essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos. Alguns estudos dessa triagem, como testes não clínicos em vários sistemas biológicos regulamentados pela Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OECD), revelam os efeitos tóxicos específicos de um produto em investigação (FIELDEN; KOLAJA, 2008; PARASURAMAN, 2011).

A exemplo dos testes toxicológicos, o teste de toxicidade aguda (OECD n°423, 2002) é realizado para determinar o efeito de dose única de um produto em uma determinada espécie animal, preferencialmente roedores. O produto investigado é administrado em diferentes níveis de dose e o efeito é observado durante 14 dias. Todas as mortes causadas pelo produto, durante o período experimental, são registradas e as mudanças morfológicas, bioquímicas, patológicas e histológicas nos animais mortos



são investigadas. O teste de toxicidade aguda permite ainda determinar a dose letal 50% do produto em investigação (DORATO; BUCKLEY, 2006).

Outro estudo relevante é o teste de toxicidade de dose repetida (OECD n°407, 2008), o qual é realizado por um período mínimo de 28 dias. O produto investigado é administrado diariamente durante um determinado período por via oral. Normalmente, utiliza-se roedores de qualquer gênero e idade entre 5-6 semanas. Durante o período de investigação, parâmetros comportamentais e bioquímicos dos animais são analisados e, ao final do estudo, os tecidos da maioria dos órgãos são removidos e as alterações histológicas e imuno-histoquímicas são registradas (HUGHES et al., 2011).

Por outro lado, a toxicogenética considera alterações estáveis e/ou hereditárias no genoma, que são capazes de influenciar a susceptibilidade relativa de um indivíduo (ou grupo de indivíduos) aos efeitos adversos à saúde resultantes da exposição a um produto ou fármaco (RUSYN et al., 2010). Como a maioria dos xenobióticos interferem com o genoma celular, os biomarcadores de efeito genotóxico podem ser úteis para determinar essa exposição (KANG et al., 2013). Singh e colaboradores (1988), desenvolveram o ensaio cometa (ou eletroforese em gel de célula única) para avaliar o dano ao DNA.

O princípio do ensaio cometa é que o DNA não fragmentado mantém uma estrutura bem organizada no núcleo celular, mas esta organização logo é interrompida, quando a célula está danificada (COLLINS, 2004). O *score* visual do cometa pode ser calculado com base em uma escala de cinco níveis: 0 a 4. Em uma célula categorizada no nível 4, todo o DNA está fragmentado na "cauda do cometa", significando que as células foram danificadas, enquanto que células de nível 0, o DNA está íntegro e contido na "cabeça do cometa". Esses dados agrupados, podem fornecer uma medida quantitativa para 100 células, em uma escala de 0-400 (BHAT; GANDHI, 2017). Como procedimento simples e relativamente barato, a técnica detecta diversos danos ao DNA de células eucarióticas individuais, incluindo quebras de fitas simples e duplas, além de verificar também capacidade de reparo destes danos (SASAKI et al., 2000; AZQUETA et al., 2014). Portanto, o ensaio cometa é uma ferramenta útil na pesquisa de novas drogas, figurando como um dos testes especiais da OECD (n°489, 2014).

A genotoxicidade de compostos é frequentemente avaliada em conjunto com a mutagenicidade (KANG et al., 2013). Testes de mutagenicidade são utilizados para avaliar alterações na sequência e estrutura do DNA, bem como aberrações cromossômicas, incluindo duplicações, inserções, inversões e translocações. Certos tipos de mutações resultam em carcinogênese (alteração em genes proto-oncogenes e genes supressores de tumor) e, portanto, a determinação da mutagenicidade é essencial no processo de desenvolvimento de fármacos (CANO et al., 2017). Exemplos destes experimentos incluem o teste de micronúcleos (DOHERTY, 2012; SABHARWAL et al., 2015).

A importância de avaliar a quantidade de micronúcleos (MN) produzida pela ação de agentes genotóxicos foi enfatizada por muitos estudos (DEGUCHI et al., 2007; ALIMBA; BAKARE, 2016; NWANI



et al., 2017; ROLIM et al., 2017). Além disso, este teste também faz parte dos ensaios exigidos pela OECD (n°474, 2014). Os MN são corpos extranucleares que contêm fragmentos cromossômicos danificados e/ou cromossomos inteiros, que não foram incorporados ao núcleo após a divisão celular (FENECH et al., 2011). Estes eventos podem ser induzidos por defeitos de reparação celular e acumulação de danos ao DNA e aberrações cromossômicas. Uma variedade de compostos genotóxicos podem induzir a formação de MN, levando à morte celular, instabilidade genômica, resultando em carcinogênese (FENECH et al., 2016).



REFERÊNCIAS

- ABAL, M.; ANDREU, J.M.; BARASOAIN, I. Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. **Current Cancer Drug Targets**, v. 3, n. 3, pp.193-203, 2003.
- ABBA, M.C.; ZHONG, Y.; LEE, J.; KIL, H.; LU, Y.; TAKATA, Y.; SIMPER, M.S.; GADDIS, S.; SHEN, J.; 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. 64289-64299, 2016.
- ABIDI, A. Cabazitaxel: A novel taxane for metastatic castration-resistant prostate cancer-current implications and future prospects. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 4, pp. 230-137, 2013.
- ABRAMSON, D.H.; ELLSWORTH, R.M.; KITCHIN, F.D.; TUNG, G. Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced? **Ophthalmology**, v. 91, n.11, pp. 1351-1355, 1984.
- ADAMS, D.J. The Valley of Death in anticancer drug development: a reassessment. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 4, pp.173-180, 2012.
- AL DHAHERI, Y.; ATTOUB, S.; RAMADAN, G.; ARAFAT, K.; BAJBOUJ, K.; KARUVANTEVIDA, N.; ABUQAMAR, S.; EID, A.; IRATNI, R. Carnosol induces ROS-mediated beclin1-independent autophagy and apoptosis in triple negative breast cancer. **PLoS One**, v. 9, n.10, pp. 109-130, 2014.
- ALENCAR, M.V.; DE CASTRO E SOUSA, J.M.; ROLIM, H.M.; DE MEDEIROS, M.D.; CERQUEIRA, G.S.; DE CASTRO ALMEIDA, F.R.; CITÓ, A.M.; FERREIRA, P.M.; LOPES, J.A.; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A.A.; ISLAM, M. Diterpenes as lead molecules against neglected tropical diseases. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 2, pp. 175-201, 2017.
- ALFAROUC, K.O.; STOCK, C.M.; TAYLOR, S.; WALSH, M.; MUDDATHIR, A.K.; VERDUZCO, D.; BASHIR, A.H. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. **Cancer Cell International**, v. 14, n. 1, pp. 1-13, 2015.
- ALI, R.; MIRZA, Z.; ASHRAF, G.M.; KAMAL, M.A.; ANSARI, S.A.; DAMANHOURI, G.A.; ABUZENADAH, A.M.; CHAUDHARY, A.G.; SHEIKH, I.A. New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. **Anticancer Research**, v.32, n. 7, pp. 2999-3005, 2012.
- ALIMBA, C.G.; BAKARE, A.A. In vivo micronucleus test in the assessment of cytogenotoxicity of landfill leachates in three animal models from various ecological habitats. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 2, p. 310-319, 2016.
- ALVARADO-LUNA, G.; MORALES-ESPINOSA, D. Treatment for small cell lung cancer, where are we now?-a review. **Translational Lung Cancer Research**, v. 5, n.1, pp. 26-38, 2016.
- AMANT, F.; COOSEMANS, A.; RENARD, V.; EVERAERT, E.; VERGOTE, I. Clinical outcome of ET-743 (Trabectedin; Yondelis) in high-grade uterine sarcomas: report on five patients and a review of the literature. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 19, n. 2, pp. 245-248, 2009.
- AMINIMOGHADAMFAROUJ, N.; NEMATOLLAHI, A. Propolis Diterpenes as a Remarkable Bio-Source for Drug Discovery Development: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n.6, pp. 1-14, 2017.
- ANDERS, C.K.; JOHNSON, R.; LITTON, J.; PHILLIPS, M.; BLEYER, A. Breast cancer before age 40 years. **Seminars in Oncology**, v. 36, n.3, pp. 237-249, 2009.



- ANDERSON, B.O.; SHYYAN R, ENIU A, SMITH RA, YIP CH, BESE NS, CHOW LW. Breast cancer in limited-resource countries: an overview of the Breast Health Global Initiative 2005 guidelines. **Breast Journal**, 12, n.1, pp. 3-15, 2006.
- ANDING, A.L.; BAEHRECKE, E.H. Autophagy in Cell Life and Cell Death. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 114, n.1, pp. 67-91, 2015.
- ARNHOLD, T.; ELMAZAR, M.M.A; NAU, H. Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-transretinoic acid. **Toxicology Science**, v. 66, n. 1, pp. 274-282, 2002.
- ARRUEBO, M.; VILABOA, N.; SÁEZ-GUTIERREZ, B.; LAMBEA, J.; TRES, A.; VALLADARES, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. **Cancers**, v. 3, n.3, pp. 3279-3330, 2011.
- ASEYEV, O.; RIBEIRO, J.M.; CARDOSO, F. Review on the clinical use of eribulin mesylate for the treatment of breast cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 17, n. 4, pp.589-600, 2016.
- ATSHAVES, B.P.; PAYNE, H.R.; MCINTOSH, A.L.; S.E. TICHY, S.E.; RUSSELL, D.; KIER, A. B.; Schroeder, F. Sexually dimorphic metabolism of branched-chain lipids in C57BL/6J mice. **Journal of Lipid Research**, v.45, n.1, pp. 812-830, 2004.
- AZQUETA, A.; SLYSKOVA, J.; LANGIE, S.A.; O'NEILL GAIVÃO, I.; COLLINS, A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 288, 2014.
- BAI, R.; NGUYEN, T.L.; BURNETT, J.C.; ATASOYLU, O.; MUNRO, M.H.; PETTIT, G.R.; SMITH, R.D.; GUSSIO, R.; HAMEL, E. Interactions of halichondrin B and eribulin with tubulin. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 27, n. 6, pp. 1393-1404, 2011.
- BAIG, S.; SEEVASANT, I.; MOHAMAD, J.; MUKHEEM, A.; HURI, H.; KAMARUL, T. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? **Cell Death and Disease**, v. 14, n. 7, pp. 1-11, 2016.
- BARNES, E.C.; KAVANAGH, A.M.; RAMU, S.; BLASKOVICH, M.A.; COOPER, M.A.; DAVIS, R.A. Antibacterial serrulatane diterpenes from the Australian native plant *Eremophila microtheca*. **Phytochemistry**, v. 93, n. 1, pp. 162-169, 2013.
- BARRIENTOS, J.C. Sequencing of chronic lymphocytic leukemia therapies. **American Society of Hematology**, v. 2016, n.1, pp. 128-136, 2016.
- BARSEVICK, A.M.; IRWIN, M.R.; HINDS, P.; MILLER, A.; BERGER, A.; JACOBSE, P.; ANCOLI-ISRAEL, S. Recommendations for high-priority research on cancer-related fatigue in children and adults. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, v.19, pp. 1432-1240, 2013.
- BASMADJIAN, C.; ZHAO, Q.; BENTOUHAMI, E.; DJEHAL, A.; NEBIGIL, C.G.; JOHNSON, R.A.; SEROVA, M. Cancer wars: natural products strike back. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, n. 20, pp. 2-20, 2014.
- BAXTER, J.H.; STEINBERG, D.; MIZE, C.E.; AVIGAN, J. Absorption and metabolism of uniformly (14)C-labeled phytol and phytanic acid by the intestine of the rat studied with thoracic duct cannulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 137, n. 1, p. 277-290, 1967.
- BECA, F.; POLYAK, K. Intratumor Heterogeneity in Breast Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 882, n. 1, pp. 169-189, 2016.



- BERGER, A.M.; MOONEY, K.; ALVAREZ-PEREZ, A.; BREITBART, W.S.; CARPENTER, K.M.; CELLA, D.; CLEELAND, C. Cancer-Related Fatigue. **National Comprehensive Cancer Network**, v. 13, n.8, pp. 1012-1039, 2015.
- BERGMANN, W.; BURKE, D.C. Marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 20, n.1, pp. 1501-1507, 1955.
- BERTOTTI, A.; PAPP, E.; JONES, S.; ADLEFF, V.; ANAGNOSTOU, V.; LUPO, B.; SAUSEN, M.; PHALLEN, J.; HRUBAN, C.A.; TOKHEIM, C. The genomic landscape of response to EGFR blockade in colorectal cancer. **Nature**, v. 526, n.1, pp. 263–267, 2015.
- BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, n.6, pp. 16-223, 2000.
- BHARDWAJ, V.; ANKOLA, D.D.; GUPTA, S.C.; SCHNEIDER, M.; LEHR, C.M.; KUMAR, M.N. PLGA nanoparticles stabilized with cationic surfactant: safety studies and application in oral delivery of paclitaxel to treat chemical-induced breast cancer in rat. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 11, p. 2495-2503, 2009.
- BHAT, M.A.; GANDHI, G. Assessment of DNA Damage in Leukocytes of Patients With Coronary Artery Disease by Comet Assay. **International Heart Journal**, v. 58, n. 2, p. 271-274, 2017.
- BHATTACHARYA, A.K.; CHAND, H.R.; JOHN, J.; DESHPANDE, M.V. Clerodane type diterpene as a novel antifungal agent from *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 13, n.94, pp. 1-7, 2015.
- BIRNIE, G.D. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. **The British Journal of Cancer Supplement**, v.5, n.1, pp. 41-45, 1988.
- BISHAYEE, A.; MANDAL, A.; THOPPIL, R.J.; DARVESH, A.S.; BHATIA, D. Chemopreventive effect of a novel oleanane triterpenoid in a chemically induced rodent model of breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 5, p. 1054-1063, 2013.
- BITEAU, B.; HOCHMUTH, C.E.; JASPER, H. Maintaining tissue homeostasis: dynamic control of somatic stem cell activity. **Cell Stem Cell**, v.9, n.5, pp. 402-411, 2011.
- BJELOGRLIĆ, S.K.; SRDIĆ, T.; RADULOVIĆ, S. Mammalian target of rapamycin is a promising target for novel therapeutic strategy against cancer. **Journal of BUON**, v.11, n.3, p. 267-276, 2006.
- BLACKADAR, C.B. Historical review of the causes of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n.1, pp. 54-86, 2016.
- BLADT, T.T.; FRISVAD, J.C.; KNUDSEN, P.B.; LARSEN, T.O. Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. **Molecules**, v. 18, n.9, pp. 11336-11376, 2013.
- BLATTER S, ROTTENBERG, S. Minimal residual disease in cancer therapy – Small things make all the difference. **Drug Resist Updat**, v. 22, n.1, pp. 1–10, 2015.
- BOUVIER, F.; RAHIER, A.; CAMARA, B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. **The Journal of Lipid Research**, v. 44, n.1, pp. 357-429, 2005.
- BREWER, H.R.; JONES, M.E.; SCHOEMAKER, M.J.; ASHWORTH, A.; SWERDLOW, A.J. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 165, n.1, pp. 193-200, 2017.
- BRUCKERT, E.; ROSENBAUM, D.; LOWERING, D. LDL-cholesterol through diet: potential role in the statin era. **Current Opinion in Lipidology**, v.22, n.1, pp. 43-48, 2011.



- BURMISTROVA, O.; SIMÕES, M.F.; RIJO, P.; QUINTANA, J.; BERMEJO, J.; ESTÉVEZ, F. Antiproliferative activity of abietane diterpenoids against human tumor cells. **Journal of Natural Products**, v. 76, n.2, pp.1413–1423, 2013.
- BURSTEIN, H.J.; KESHAVIAH, A.; BARON, A.D.; HART, R.D.; LAMBERT-FALLS, R.; MARCOM, P.K.; GELMAN, R.; WINER, E. P. Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: the trastuzumab and vinorelbine or taxane study. **Cancer**, v. 110, n.5, pp. 965- 972, 2007.
- BUTLER, R.W.; MULHERN, R.K. Neurocognitive interventions for children and adolescents surviving cancer. **Journal of Pediatric Psychology**, v. 30, n.1, pp. 65-78, 2005.
- BYRD, J.C.; MRÓZEK, K.; DODGE, R.K.; CARROLL, A.J.; EDWARDS, C.G.; ARTHUR, D.C.; PETTENATI, M.J. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). **Blood**, v. 100, n. 13, pp. 4325-4336, 2002.
- CAMPOS, D.R.; CELOTTO, A.C.; ALBUQUERQUE, A.A.S.; FERREIRA, L.G.; MONTEIRO, A.; COELHO, E.B.; EVORA, P.R.B. The Diterpene Sclareol Vascular Effect in Normotensive and Hypertensive Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.1, n.1, pp. 117-123, 2017.
- CANO, B.L.; MOREIRA, M.R.; GOULART, M.O.; DOS SANTOS, GONÇALVES, N.; VENEZIANI, R.C.; BASTOS, J.K.; AMBRÓSIO, S.R.; DOS SANTOS, R.A. Comparative study of the cytotoxicity and genotoxicity of kaurenoic acid and its semi-synthetic derivatives methoxy kaurenoic acid and kaurenol in CHO-K1 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 102, p. 102-108, 2017.
- CAPASSO, A. Vinorelbine in cancer therapy. **Current Drug Targets**, v. 13, n.8, pp. 1065-1071, 2012.
- CÁRDENAS, C.; QUESADA, A.R.; MEDINA, M.A. Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. **PLoS One**, v. 6, n.8, pp. 1-9, 2011.
- CASTELLS, X.; DOMINGO, L.; COROMINAS, J.M.; TORÁ-ROCAMORA, I.; QUINTANA, M.J.; BARÉ, M.; VIDAL, C. Breast cancer risk after diagnosis by screening mammography of nonproliferative or proliferative benign breast disease: a study from a population-based screening program. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 149, n. 1, pp. 237-244, 2015.
- CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, n.8, pp. 1911-1921, 2014.
- 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, pp. 903-109, 2004.
- CHALLITA-EID, P.M.; SATPAYEV, D.; YANG, P.; AN, Z.; MORRISON, K.; SHOSTAK, Y.; RAITANO, A.; et al. Enfortumab Vedotin Antibody-Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models. **Cancer Research**, v. 76, n. 10, pp. 3003-3014, 2016.
- 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.
- CHAWLA, S.P.; STADDON, A.P.; BAKER, L.H.; SCHUETZE, S.M.; TOLCHER, A.W.; D'AMATO, G.Z.; BLAY, J.Y. Phase II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus in patients with advanced bone and soft tissue sarcomas. **Journal of Clinical Oncology**, v.10, n.1, pp. 78-84, 2012.



- CHAZIN EDE, L.; REIS RDA, R.; JUNIOR, W.T.; MOOR, L.F.; VASCONCELOS, T.R. An overview on the development of new potentially active camptothecin analogs against cancer. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n.2, pp. 953-962, 2014.
- CHEN, H.; ZHANG, S.; WEN, J.C.; ZHENG, J.K.; CHEN, Q.; LI, W.Y.; WANG, P.P. Several types of soft tissue sarcomas originate from the malignant transformation of adipose tissue-derived stem cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 3, n.3, pp. 441-448, 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, pp. 803-815, 2015.
- CHEON, D.J.; ORSULIC, S. Mouse models of cancer. **Annual Review of Pathology**, v. 6, n.1, pp. 95-119, 2011.
- CHOI, Y.H.; AHN, S.J.; PARK, K.Y.; YOO, M.A.; LEE, W.H. Effects of phytol on the mutagenicity of UV and EMS in salmonella and drosophila mutation assaying systems. **Environmental Mutagenesis Carcinogenesis**, v. 13, n. 1, pp. 92-100, 1993.
- CHOWDHURY, R.R.; GHOSH, S.K. Phytol-derived novel isoprenoid immunostimulants. **Frontiers in Immunology**, v. 22, n.1, pp. 1-11, 2012.
- CHUNG, M.J.; CHUNG, C.K.; JEONG, Y.; HAM, S.S. Anticancer activity of subfractions containing pure compounds of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract in human cancer cells and in Balbc/c mice bearing Sarcoma-180 cells. **Nutrition Research and Practice**, v.4, n.3, pp. 177-182, 2010.
- CIRLA, A.; MANN, J. Combretastatins: from natural products to drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 20, n.6, pp. 558-564, 2004.
- COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.
- COLLINS, J.J.; JAMMER, B.; SLADCEK, 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.
- COLOMBO, N.; MCMEEKIN, D.S.; SCHWARTZ, P.E.; SESSA, C.; GEHRIG, P.A.; HOLLOWAY, R.; BRALY, P. Ridaforolimus as a single agent in advanced endometrial cancer: results of a single-arm, phase 2 trial. **British Journal of Cancer**, v. 108, n.5, pp. 1021-1026, 2013.
- COSTA, J.P.; COSTA, D.A.; ALMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M.; SOUSA, D.P.; FORTES, A.C.; PATRÍCIO, C.C.M.; SOARES, M.F.L.R. Applications of Phytol in Pharmaceutical Formulations Anxiolytic and Antidepressant Properties, BRPI1106397, 2011.
- COSTA, J.P.; DE OLIVEIRA, G.A.L.; DE ALMEIDA, A.A.C.; ISLAM, M.T.; DE SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, n. 1, pp. 34-42, 2014.
- COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; DE SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R.M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**, v. 523, n. 1, pp. 115-118, 2012.
- COSTA, J.P.; ISLAM, M.T.; SANTOS, P.S.; FERREIRA, P.B.; OLIVEIRA, G.L.; ALENCAR, M.V.; PAZ, M.F.; FERREIRA, É.L.; FEITOSA, C.M.; CITÓ, A.M.; SOUSA, D.P.; MELO-CAVALCANTE, A.A. Evaluation of Antioxidant Activity of Phytol Using Non- and Pre-Clinical Models. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, pp. 1278-1284, 2016.



- CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n.1, pp. 703-723, 2014.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Medicinals for the millennia: the historical record. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 953, n.2, pp.3-25, 2001.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n.6, pp. 3670-3695, 2013.
- CRAMER, P.; LANGERBEINS, P.; EICHHORST, B.; HALLEK, M. Advances in first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia: current recommendations on management and first-line treatment by the German CLL Study Group (GCLLSG). **European Journal of Haematology**, v. 96, n.1, pp. 9-18, 2016.
- DAVID, A.R.; ZIMMERMAN, M.R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 10, pp. 728-733, 2010.
- DAVIS, A.S.; VIERA, A.J.; MEAD, M.D. Leukemia: an overview for primary care. **American Family Physician**, v. 89, n.9, pp. 731-738, 2014.
- DE ANDRADE MOURA, L.; MARQUI DE ALMEIDA, A.C.; DOMINGOS, T.F.; ORTIZ-RAMIREZ, F.; CAVALCANTI, D.N.; TEIXEIRA, V.L.; FULY, A.L. Antiplatelet and anticoagulant effects of diterpenes isolated from the marine alga, *Dictyota menstrualis*. **Marine Drugs**, v. 12, n.5, pp. 2471-2484, 2014.
- DE JONG, M.M.; NOLTE, I.M.; TE MEERMAN, G.J.; VAN DER GRAAF, W.T.; OOSTERWIJK, J.C.; KLEIBEUKER, J.H.; SCHAAPVELD, M. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. **Journal of Medical Genetics**, v. 39, n. 4, pp. 225-242, 2002.
- DE KOUCHKOVSKY, I.; ABDUL-HAY, M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. **Blood Cancer Journal**, v. 6, n.7, pp. 1-10, 2016.
- DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADA, M.; INOUE, Y.; KINAE, N. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research**, v. 627, n. 2, p. 178-185, 2007.
- DEMAIN, A.L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n.1, pp. 687-699, 2011.
- DEMETRI, G.D.; CHAWLA, S.P.; RAY-COQUARD, I.; LE CESNE, A.; STADDON, A.P.; MILHEM, M.M.; PENEL, N. Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n.19, pp. 2485-2492, 2013.
- DEMICHELI, R.; ARDOINO, I.; AMBROGI, F.; AGRESTI, R.; BIGANZOLI, E. Significance of ipsilateral breast tumor recurrence after breast conserving treatment: role of surgical removal. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 25, n.1, pp. 22-31, 2013.
- DESBÈNE, S.; GIORGI-RENAULT, S. Drugs that inhibit tubulin polymerization: the particular case of podophyllotoxin and analogues. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 3, n.1, pp. 71-90, 2002.
- DIAB, K.A.; SHAFIK, R.E.; YASUDA, S. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Novel Orange Peel Extract and It's Fractions on Leukemia HL-60 Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n.16, pp. 7053-7060, 2015.
- DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n.2, pp. 303- 336, 2012.



- DIETERICH, M.; STUBERT, J.; REIMER, T.; ERICKSON, N.; BERLING, A. Influence of lifestyle factors on breast cancer risk. **Breast Care**, v. 9, n.6, pp. 407-414, 2014.
- DILLER, L.; CHOW, E.J.; GURNEY, J.G.; HUDSON, M.M.; KADIN-LOTTICK, N.S.; KAWASHIMA, T.I.; LEISENRING, W.M. Chronic disease in the Childhood Cancer Survivor Study cohort: a review of published findings. **Journal of Clinical Oncology**, v.27, n.14, pp. 2339-2355, 2009.
- DIMASI, J.A.; GRABOWSKI, H.G. Economics of new oncology drug development. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n.2, pp. 209-216, 2007.
- DODD, R. D.; MITO, J.K.; KIRSCH, D.G. Animal models of soft-tissue sarcoma. **Disease Models & Mechanisms**, v. 3, n.9, pp. 557-566, 2010.
- DOHERTY, A.T. The in vitro micronucleus assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 817, p. 121-41, 2012.
- DÖHNER, H.; ESTEY, E.H.; AMADORI, S.; APPELBAUM, F.R.; BÜCHNER, T.; BURNETT, A.K.; DOMBRET, H. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European **LeukemiaNet**. **Blood**, v. 115, n.3, pp. 453-474, 2010.
- DÖHNER, H.; WEISDORF, D.J.; BLOOMFIELD, C.D. Acute Myeloid Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n.12, pp. 1136-1152, 2015.
- DONALDSON, K.; SEATON, A. A short history of the toxicology of inhaled particles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 9, p. 13, 2012.
- DONIA, M.; HAMANN MT. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, n.6, pp. 338-348, 2003.
- DORATO, M.A.; BUCKLEY, L.A. **Current Protocols in Pharmacology**. Chapter 10: Toxicology in the drug discovery and development process, 2006.
- DREXLER, H.G.; MACLEOD, R.A.; UPHOFF, C.C. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia. **Leukemia Research**, v. 23, n.3, pp. 207-215, 1999.
- DREXLER, H.G.; QUENTMEIER, H.; MACLEOD, R.A.; UPHOFF, C.C.; HU, Z.B. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia. **Leukemia Research**, v.19, n.10, pp. 681-891, 1995.
- EASTON, D.F.; PHAROAH, P.D.; ANTONIOU AC, TISCHKOWITZ M, TAVTIGIAN SV, NATHANSON KL, DEVILEE P. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n.23, pp. 2243-2257, 2015.
- EATON, L. World cancer rates set to double by 2020. **BMJ**, v. 326, n. 7392, pp. 1-1, 2003.
- ECKHARDT, U.; GRIMM, B.; HORTENSTEINER, S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 1, pp. 1-14, 2004.
- EL-KHATTOUTI, A.; SELIMOVIC, D.; HAIKEL, Y.; HASSAN, M. Crosstalk between apoptosis and autophagy: molecular mechanisms and therapeutic strategies in cancer. **Journal of Cell Death**, v.18, n. 6, pp. 37-55, 2013.
- 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, pp. 14-18, 1997.



- ELMAZAR, M.M.; EL-ABHAR, H.S.; SCHAALAN, M.F.; FARAG, N.A. Phytol/Phytanic acid and insulin resistance: potential role of phytanic acid proven by docking simulation and modulation of biochemical alterations. **PLoS One**, v. 8, n. 1, pp. 1-10, 2013.
- EVIDENTE, A.; KORNIENKO, A.; CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; LEFRANC, F.; MATHIEU, V.; KISS, R. Fungal metabolites with anticancer activity. **Natural Product Reports**, v. 31, n.5, pp. 617-627, 2014.
- FAIELLA, L.; PIAZ, F.D.; BISIO, A.; TOSCO, A.; DE TOMMASI, N. A chemical proteomics approach reveals Hsp27 as a target for proapoptotic clerodane diterpenes. **Molecular BioSystems**, v.6, n.10, pp. 2637-2644, 2012.
- FAN, T.M. Animal models of osteosarcoma. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v.10, n.8, p.1327-1338, 2010.
- FASINU P1, PILLAY V, NDESENDO VM, DU TOIT LC, CHOONARA YE. Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 32, n.4, pp. 185-209, 2011.
- FAUZEE, N.J. Taxanes: promising anti-cancer drugs. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n.4, pp. 837-851, 2011.
- FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLS, 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, n. 1, p. 125-32, 2011.
- 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**, v. 770, n. (Pt A), p. 12-25, 2016.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n.5, pp. 359-386, 2012.
- FERREIRA, I.; FERREIRA, J.; VOLLET-FILHO, J.D.; MORIYAMA, L.T.; BAGNATO, V.S.; SALVADORI, D.M.; ROCHA, N.S. Photodynamic therapy for the treatment of induced mammary tumor in rats. **Lasers Medicinal Science**, v. 28, n. 2, p. 571-577, 2013.
- FIELDEN, M.R.; KOLAJA, KL. The role of early in vivo toxicity testing in drug discovery toxicology. **Expert Opinion in Drug Safety**, v. 7, n. 2, p. 107-110, 2008.
- FISCHER, T.; STONE, R.M.; DEANGELO, D.J.; GALINSKY, I.; ESTEY, E.; LANZA, C.; FOX, E. Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n.28, pp. 4339-4345, 2010.
- FOZZA, C. The role of Clofarabine in the treatment of adults with acute myeloid leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 93, n.3, pp. 237-245, 2015.
- FRIDLENDER, M.; KAPULNIK, Y.; KOLTAL, H. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. **Frontiers in Plant Science**, v. 1, n.6, pp. 1-9, 2015.
- FROEHNER, M.; WIRTH, M.P. Etiologic factors in soft tissue sarcomas. **Onkologie**, v. 24, n.3, pp. 139-142, 2001.



FRONZA, M.; LAMY, E.; GÜNTHER, S.; HEINZMANN, B.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Abietane diterpenes induce cytotoxic effects in human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 through different modes of action. **Phytochemistry**, v.78, n.1, pp. 107-119, 2012.

FULDA, S. Autophagy in Cancer Therapy. **Frontiers in Oncology**, v.15, n.7, pp. 1-15, 2017.

GAIDZIK, V.; DÖHNER, K. Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. **Seminars in Oncology**, v. 35, n.4, pp. 346-355, 2008.

GAJDOS, C.; ELIAS, A. Trabectedin: safety and efficacy in the treatment of advanced sarcoma. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v.15, n.5, pp. 35-43, 2011.

GALANO, G.; CAPUTO, M.; TECCE, M.F.; CAPASSO, A. Efficacy and tolerability of vinorelbine in the cancer therapy. **Current Drug Safety**, v. 6, n.4, pp. 185-193, 2011.

GALLO, D.; GIACOMELLI, S.; CANTELMO, F.; ZANNONI, G.F.; FERRANDINA, G.; FRUSCELLA, E.; RIVA, A. Chemoprevention of DMBA-induced mammary cancer in rats by dietary soy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.69, n.2, pp. 153-164, 2001.

GALLOGLY, M.M.; LAZARUS, H.M. Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. **Journal of Blood Medicine**, v.19, n.7, pp. 73-83, 2016.

GANGULY, A.; YANG, H.; SHARMA, R.; PATEL, K.D.; CABRAL, F. The role of microtubules and their dynamics in cell migration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n.52, pp. 43359- 43369, 2012.

GAO, C.; HAN, L.; ZHENG, D.; JIN, H.; GAI, C.; WANG, J.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; FU, H. Dimeric Abietane Diterpenoids and Sesquiterpenoid Lactones from *Teucrium viscidum*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n.4, pp. 630-638, 2015b.

GAO, H.; SUN, W.; ZHAO, W.; HAO, W.; LEUNG, C.H.; LU, J.; CHEN, X. Total Tanshinones-Induced Apoptosis and Autophagy Via Reactive Oxygen Species in Lung Cancer 95D Cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n.6, pp. 1265-1279, 2015a.

GARBER, J.E.; OFFIT, K. Hereditary cancer predisposition syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n.2, pp. 276-292, 2005.

GARNOCK-JONES, K.P. Brentuximab vedotin: a review of its use in patients with hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma following previous treatment failure. **Drugs**, v.73, n.4, pp. 371-381, 2013.

GAVANDE, N.S.; VANDERVERE-CAROZZA, P.S.; HINSHAW, H.D.; JALAL, S.I.; SEARS, C.R.; PAWELCZAK, K.S.; TURCHI, J.J. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 160, n.1, pp. 65-83, 2016.

GAW, S.; THOMAS, K.V.; HUTCHINSON, T.H. Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, pp. 1-11, 2014.

GERWICK, W.H.; FENNER, A.M. Drug discovery from marine microbes. **Microbial Ecology**, v. 65, n., pp. 800-806, 2013.

GHAJAR, C.M.; PEINADO, H.; MORI, H.; MATEI, I.R.; EVASON, K.J.; BRAZIER, H.; ALMEIDA, D. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. **Nature Cell Biology**, v.15, n.1, pp. 807-817, 2013.



- GHONCHEH, M.; POURNAMDAR, Z.; SALEHINIYA, H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n.3, pp. 43-46, 2016.
- GILBERTSON, R.J. Mapping cancer origins. **Cell**, v. 145, n.1, pp. 25-29, 2011.
- 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, pp. 452-458, 2013.
- GIROTTI, M.R.; GREMEL, G.; LEE, R.; GALVANI, E.; ROTHWELL, D.; VIROS, A.; MANDAL, A.K.; LIM, K.H.J.; SATURNO, G.; FURNEY, S.J. Application of sequencing, liquid biopsies, and patient-derived xenografts for personalized medicine in melanoma. **Cancer Discovery**, v. 6, n.1, pp. 286-299, 2016.
- GLOERICH, J.; RUITER, J.P.N.; VAN DEN BRINK, D.M.; OFMAN, R.; FERDINANDUSSE, S.; WANDERS, R.J.A. Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase is involved in phytol degradation, **FEBS Letters**, v. 580, n. 1, pp. 2092-2096, 2006.
- GLOERICH, J.; VAN VLIES, N.; JANSEN, G.A.; DENIS, S.; RUITER, J.P.; VAN WERKHOVEN, M.A.; DURAN, M.; VAZ, F.M.; WANDERS, R.J.; FERDINANDUSSE, S. A phytol-enriched diet induces changes in fatty acid metabolism in mice both via PPAR alpha-dependent and -independent pathways. **The Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 1, pp. 716-726, 2005.
- GLOVER, T.W.; WILSON, T.E.; ARLT, M.F. Fragile sites in cancer: more than meets the eye. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n.8, pp. 489-501, 2017.
- GONZALEZ, K.D.; NOLTNER, K.A.; BUZIN, C.H.; GU, D.; WEN-FONG, C.Y.; NGUYEN, V.Q.; HAN, J.H.; LOWSTUTER, K.; LONGMATE, J.; SOMMER, S.S.; WEITZEL, J.N. Beyond. Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n.8, pp. 1250-1256, 2009.
- GONZÁLEZ-MEDINA, M.; PRIETO-MARTÍNEZ, F.D.; NAVEJA, J.J.; MÉNDEZ-LUCIO, O.; EL-ELIMAT, T.; PEARCE, C.J.; OBERLIES, N.H. Chemoinformatic expedition of the chemical space of fungal products. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n.12, pp. 1399-1412, 2016.
- GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v. 9, n.12, pp. 767-776, 2007.
- GORDALIZA, M.; CASTRO, M.A.; DEL CORRAL, J.M.; FELICIANO, A.S. Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 6, n.18, pp. 1811, 1839, 2000.
- GRANATOWICZ A1, PIATEK C12, MOSCHIANO E3, EL-HEMAIDI I4, ARMITAGE JD5, AKHTARI M2. An Overview and Update of Chronic Myeloid Leukemia for Primary Care Physicians. **Korean Journal of Family Medicine**, v.36, n.5, pp. 197-202, 2015.
- GRAS, J. Ingenol mebutate: a new option for actinic keratosis treatment. **Drugs of Today (Barc)**, v. 49, n.1, pp. 15-22, 2013.
- GREAVES, M.F. Aetiology of acute leukaemia. **Lancet**, v. 349, n. 9048, pp. 344-349, 1997.
- GRIGNANI, G.; MARTÍN-BROTO, J.; SCHULER, M.; REICHARDT, P. Trabectedin clinical cases: use according to indication in diverse clinical scenarios. **Future Oncology**, v.11, n.11, pp. 15-24, 2015.
- GROTHAUS, P.G.; CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plant natural products in anticancer drug discovery. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n.1, pp. 1781-1791, 2010.



- GUNASEKARAN, T.; HAILE, T.; NIGUSSE, T.; DHANARAJU, M.D. Nanotechnology: an effective tool for enhancing bioavailability and bioactivity of phytomedicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, n. 1, pp. 1-7, 2014.
- GUO, J.; YUAN, Y.; LU, D.; DU, B.; XIONG, L.; SHI, J.; YANG, L.; LIU, W.; YUAN, X.; ZHANG, G.; WANG, F. Two natural products, trans-phytol and (22E)-ergosta-6,9,22-triene-3 β ,5 α ,8 α -triol, inhibit the biosynthesis of estrogen in human ovarian granulosa cells by aromatase (CYP19). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.15, n. 1, pp. 23-32, 2014b.
- GUO, X.E.; NGO, B.; MODREK, A.S.; LEE, W.H. Targeting tumor suppressor networks for cancer therapeutics. **Current Drug Targets**, v. 15, n.1, pp. 2-16, 2014a.
- HALLEK, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 5, pp. 446-460, 2015.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cellular**, v.144, n.5, pp. 646-674, 2011.
- HANSEN, R.P. Phytol: its metabolic products and their distribution. A review. **The New Zealand Journal of Science and Technology**, v. 23, n. 1, pp. 259-275, 1980.
- HANSON, J.R. Diterpenoids of terrestrial origin. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 10, pp. 1227-1238, 2016.
- 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, pp. 111-129, 2015.
- HAYES, M.N.; LANGENAU, D.M. Discovering novel oncogenic pathways and new therapies using zebrafish models of sarcoma. **Methods in Cell Biology**, v. 138, n. 1, pp. 525-561, 2017.
- HE, J.; PENG, L.Y.; TU, L.; WU, X.D.; DONG, L.B.; PAN, Z.H.; CHEN, X.Q. Vibsane-type diterpenes from leaves and twigs of *Viburnum odoratissimum*. **Fitoterapia**, v. 109, n. 1, pp. 224-229, 2016.
- HEISEY, R.; CARROLL, J.C. Identification and management of women with a family history of breast cancer: Practical guide for clinicians. **Canadian Family Physician**, v. 62, n.10, pp. 700-803, 2016.
- HEJNOL, A.; DUNN, C.W. Animal Evolution: Are Phyla Real? **Current Biology**, v. 26, n. 10, pp. R424-R426, 2016.
- HELMAN, L.; MELTZER, P. Mechanisms of sarcoma development. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, pp. 685-694, 2003.
- HENSLEY, M.L.; KRAVETZ, S.; JIA, X.; IASONOS, A.; TEW, W.; PEREIRA, L.; SABBATINI, P. Eribulin mesylate (halichondrin B analog E7389) in platinum-resistant and platinum-sensitive ovarian cancer: a 2-cohort, phase 2 study. **Cancer**, v. 118, n. 9, pp. 2403-2410, 2012.
- HEWITT M.; ROWLAND, J.H.; YANCIK, R. Cancer survivors in the United States: Age, health, and disability. **Journal of Gerontology**, v. 58, n.1, pp. 82-91, 2003.
- HIATT, R.A.; BREEN, N. THE social determinants of cancer: a challenge for transdisciplinary science. **American Journal of Preventive Medicine**, v.34, n.1, pp. 141-150, 2008.
- HIDALGO, M.; AMANT, F.; BIANKIN, A.V.; BUDINSKÁ, E.; BYRNE, A.T.; CALDAS, C.; CLARKE, R.B.; DE JONG, S.; JONKERS, J.; MÆLANDSMO, G.M. et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. **Cancer Discovery**, v. 4, n.1, pp. 998-1013, 2014.



HIDIROGLOU, M.; JENKINS, K.J. Fate of (14)C-phytol administered orally to sheep. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 50, n. 1, pp. 458-462, 1972.

HIMES, R.H.; KERSEY, R.N.; HELLER-BETTINGER, I.; SAMSON, F.E. Action of the vinca alkaloids vincristine, vinblastine, and desacetyl vinblastine amide on microtubules in vitro. **Cancer Research**, v. 36, n. 10, pp. 3798-3802, 1976.

HOENERHOFF, M.J.; HONG, H.H.; TON, T.V.; LAHOUSSE, S.A.; SILLS, R.C. A review of the molecular mechanisms of chemically induced neoplasia in rat and mouse models in National Toxicology Program bioassays and their relevance to human cancer. **Toxicologic Pathology**, v. 37, n. 7, pp. 835-848, 2009.

HORAS, K.; ZHENG, Y.; ZHOU, H.; SEIBEL, M.J.; Animal models for breast cancer metastasis to bone: opportunities and limitations. **Cancer Investigation**, v. 33, n. 9, p. 459-468, 2015.

HOUSMAN, G.; BYLER, S.; HEERBOTH, S.; LAPINSKA, K.; LONGACRE, M.; SNYDER, N.; SARKAR, S. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers (Basel)**, v. 6, n. 3, pp. 1769-1792, 2014.

HOWARD, J.H.; BLAND, K.I. Current management and treatment strategies for breast cancer. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 24, n.1, pp. 44-48, 2012.

HOWELL, A.; ANDERSON, A.S.; CLARKE, R.B, DUFFY, S.W.; EVANS, D.G.; GARCIA-CLOSAS, M.; GESCHER, A.J. Risk determination and prevention of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 5, pp. 1-19, 2014.

HUANG, M.; LU, J.J.; HUANG, M.Q.; BAO, J.L.; CHEN, X.P.; WANG, Y.T. Terpenoids: natural products for cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 12, pp. 1801-1818, 2012.

HUANG, T.Z.; CHEN, B.W.; HUANG, C.Y.; HWANG, T.L.; UVARANI, C.; DAI, C.F.; SUNG, P.J. Eunicellin-Based Diterpenoids, Hirsutalins S-V, from the Formosan Soft Coral *Cladiella hirsuta*. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, pp. 2757-2769, 2015.

HUGHES, J.P.; REES, S.; KALINDJIAN, S.B.; PHILPOTT, K.L. Principles of early drug discovery. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.

IMBERT, T.F. Discovery of podophyllotoxins. **Biochimie**, v. 80, n. 3, pp. 207-222, 1998.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C.G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, pp. 1943-1955, 2013.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade, 2017. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br>>

INFANGER, D.W.; CHO, Y.; LOPEZ, B.S.; MOHANAN, S.; LIU, S.C.; GURSEL, D.; et al. Glioblastoma stem cells are regulated by interleukin-8 signaling in a tumoral perivascular niche. **Cancer Research**, v. 73, n. 23, pp. 7079-7089, 2013.

IOM; N.R.C. **Childhood cancer survivorship: Improving care and quality of life**. Hewitt M, Weiner SL, Simone JV, editors. Washington, DC: The National Academies Press; 2003.

IOM; NRC. **From cancer patient to cancer survivor: Lost in transition**. Hewitt M, Greenfield S, Stovall E, editors. Washington, DC: The National Academies Press; 2006.



ISHIBASHI, Y.; NAGAMATSU, Y.; MIYAMOTO, T.; MATSUNAGA, N.; OKINO, N.; YAMAGUCHI, K.; ITO, M. A novel ether-linked phytol-containing digalactosylglycerolipid in the marine green alga, *Ulva pertusa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 452, n. 1, pp. 873-880, 2014.

ISLAM, M.T. Diterpenes and Their Derivatives as Potential Anticancer Agents. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 5, pp. 691-712, 2017.

ISLAM, M.T.; ALI, E.S.; SOUSA, J.M.C.; SANTOS, J.V.O.; PAZ, M.F.C.J.; LIMA, R.M.T.; SOUSA, L.R.; ALENCAR, M.V.O.B.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C. 2016c. Physiological contributions of reactive oxygen species. **Photon eBooks**. Ed. I, pp. 1–13. UBN: 015-A94510112030, 2016c.

ISLAM, M.T.; DA MATA, A.M.; DE AGUIAR, R.P.; PAZ, M.F.; DE ALENCAR, M.V.; FERREIRA, P.M.; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A.A. Therapeutic Potential of Essential Oils Focusing on Diterpenes. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 9, pp. 1420-1444, 2016a.

ISLAM, M.T.; DA SILVA, C.B.; DE ALENCAR, M.V.; PAZ, M.F.; ALMEIDA, F.R.; MELO-CAVALCANTE, A.A. Diterpenes: Advances in Neurobiological Drug Research. *Phytotherapy Research*, v. 30, n. 6, pp. 915-928, 2016b.

ISLAM, M.T.; DE ALENCAR, M.V.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A.A.; DE SOUSA, D.P.; DE FREITAS, R.M. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 5, n. 240, pp. 60-73, 2015.

JABBOUR, E.; CORTES, J.; KANTARJIAN, H. Long-term outcomes in the second-line treatment of chronic myeloid leukemia: a review of tyrosine kinase inhibitors. **Cancer**, v. 117, n. 5, pp. 897-906, 2011.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 2, pp. 252-265, 2016.

JABIR, N.R.; TABREZ, S.; ASHRAF, G.M.; SHAKIL, S.; DAMANHOURI, G.A.; KAMAL, M.A. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 1, pp. 4391-4408.

JAFRI, M.A.; ANSARI, S.A.; ALQAHTANI, M.H.; SHAY, J.W. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. **Genome Medicine**, v. 20, n.8, pp. 1-18, 2016.

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, pp. 416-428, 2010.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; SAMUELS, A.; GHAFOR, A.; WARD, E.; THUN, M.J. Cancer statistics, 2003. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 53, n.1, pp. 5-26, 2003.

JIANG, G.; ALBIHN, A.; TANG, T.; TIAN, Z.; HENRIKSSON, M. Role of Myc in differentiation and apoptosis in HL60 cells after exposure to arsenic trioxide or all-trans retinoic acid. *Leukemia Research*, v. 32, n. 2, pp. 297-307, 2008.

JIN, B.; ROBERTSON, K.D. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 754, n.1, pp. 3-29, 2013.

JUNG, J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. **Toxicology Research**, v. 30, n. 1, pp. 1-5, 2014.

KAGOURA, M.; MATSUI, C.; MOROHASHI, M. Carcinogenicity study of phytol (3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) in ICR mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, n. 1, pp. 438, 1993.



- KAM, Y.; REJNIAK, K.A.; ANDERSON, A.R. Cellular modeling of cancer invasion: integration of in silico and in vitro approaches. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 2, pp. 431-438, 2012.
- KAMIŃSKA, M.; CISZEWSKI, T.; ŁOPACKA-SZATAN, K.; MIOTŁA, P.; STAROŚLAWSKA, E. Breast cancer risk factors. **Przegląd Menopauzalny**, v. 14, n.3, pp. 196-202, 2015.
- KANG, H.K.; SUH, J.H.; LEE, J.J.; YOON, S.H.; HYUN, J.W.; CHOI, S.W.; CHOI, J.Y.; RYU, K.H.; CHUNG, M.H. Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by L-ascorbic acid. **Free Radical Research**, v. 37, n. 7, pp. 773-779, 2003.
- 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. 277-288, 2013.
- KANTARJIAN, H.; FADERL, S.; GARCIA-MANERO, G.; LUGER, S.; VENUGOPAL, P.; MANESS, L.; WETZLER, M. Oral sapacitabine for the treatment of acute myeloid leukaemia in elderly patients: a randomised phase 2 study. **Lancet Oncology**, v. 13, n. 11, pp. 1096-1104, 2012.
- KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J. Homoharringtonine/omacetaxine mepesuccinate: the long and winding road to food and drug administration approval. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 13, n. 5, pp. 530-533, 2013.
- KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M.; SANTINI, V.; MURGO, A.; CHESON, B.; O'BRIEN, S.M. Homoharringtonine: history, current research, and future direction. **Cancer**, v. 92, n. 6, pp. 1591-1605, 2001.
- KARIKAS, G.A. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. **Journal of BUON**, v. 15, n. 4, pp. 627-638, 2010.
- KASPER, B.; GIL, T.; D'HONDT, V.; GEBHART, M.; AWADA, A. Novel treatment strategies for soft tissue sarcoma. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 62, n. 1, pp. 9-15, 2007.
- KATT, M.E.; PLACONE, A.L.; WONG, A.D.; XU, Z.S.; SEARSON, P.C. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, n. 4, pp. 1-14, 2016.
- KAUSHAL, A.; CITRIN, D. The role of radiation therapy in the management of sarcomas. **Surgical Clinics of North America**, v. 88, n. 3, pp. 629-46, 2008.
- KEMP, C.J. Animal Models of Chemical Carcinogenesis: Driving Breakthroughs in Cancer Research for 100 Years. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2015, n. 10, pp. 865-874, 2015.
- KEMPER, K.; KRIJGSMAN, O.; CORNELISSEN-STEIJGER, P.; SHAHRABI, A.; WEEBER, F.; SONG J.Y.; KUILMAN, T.; VIS, D.J.; WESSELS, L.F.; VOEST, E.E. et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts. **EMBO Molecular Medicine**, v. 7, n. 1, pp. 1104-1118, 2015.
- KENT, E.E.; FORSYTHE, L.P.; YABROFF, K.R.; WEAVER, K.E.; DE MOOR, J.S.; RODRIGUEZ, J.L.; ROWLAND, J.H. Are survivors who report cancer-related financial problems more likely to forgo or delay medical care? **Cancer**, v. 119, n.20, pp. 3710-3717, 2013.
- KILLOCK, D. Haematological cancer: Brentuximab vedotin - a new standard for cutaneous T-cell lymphoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 8, pp. 1-15, 2017.
- KIM, C.W.; LEE, H.J.; JUNG, J.H.; KIM, Y.H.; JUNG, D.B.; SOHN, E.J.; LEE, J.H. Activation of Caspase-9/3 and Inhibition of Epithelial Mesenchymal Transition are Critically Involved in Antitumor



Effect of Phytol in Hepatocellular Carcinoma Cells. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, pp. 1026-1031, 2015.

KIM, E.S. Midostaurin: First Global Approval. **Drugs**, v. 77, n. 11, pp. 1251-1259, 2017.

KIM, K.B.; CREWS, C.M. From epoxomicin to carfilzomib: chemistry, biology, and medical outcomes. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 1, pp. 600-604, 2013.

KIM, K.N.; HAM, Y.M.; MOON, J.Y.; KIM, M.J.; JUNG, Y.H.; JEON, Y.J.; LEE, N.H. Acanthoic acid induces cell apoptosis through activation of the p38 MAPK pathway in HL-60 human promyelocytic leukaemia. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, pp. 2112-2117, 2012.

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, pp. 388-392, 2000.

KLEINERMAN, R.A.; TUCKER, M.A.; TARONE, R.E.; ABRAMSON, D.H.; SEDDON, J.M.; STOVALL, M.; LI, F.P.; FRAUMENI, J.F.JR. Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 10, pp. 2272-2279, 2005.

KOEFLER, H.P.; GOLDE, D.W. Human myeloid leukemia cell lines: a review. **Blood**, v. 56, n. 3, pp. 344-350, 1980.

KOONTONGKAEW, S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. **Journal of Cancer**, v.4, n.1, pp. 66-83,2013.

KORNIENKO, A.; EVIDENTE, A.; VURRO, M.; MATHIEU, V.; CIMMINO, A.; EVIDENTE, M.; VAN OTTERLO, W.A. Toward a Cancer Drug of Fungal Origin. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, n. 5, pp. 937-967, 2015.

KOTTKE, T.; BOISGERAULT, N.; DIAZ, R.M.; DONNELLY, O.; ROMMELFANGER-KONKOL, D.; PULIDO, J.; THOMPSON, J. Detecting and targeting tumor relapse by its resistance to innate effectors at early recurrence. **Nature Medicine**, v.19, n. 1, pp. 1625–1631, 2013.

KUMAR, S.; BAJAJ, S.; BODLA, R.B. Preclinical screening methods in cancer. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 5, pp. 481-486, 2016.

KUTTAN, G.; PRATHEESHKUMAR, P.; MANU, K.A.; KUTTAN, R. Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 10, pp. 995-1007, 2011.

KWAK, C.S.; MOON, S.C.; LEE, M.S. Antioxidant, antimutagenic, and antitumor effects of pine needles (*Pinus densiflora*). **Nutrition and Cancer**, v. 56, n. 2, pp. 162-171, 2006.

LAI, Y.; WEI, X.; LIN, S.; QIN, L.; CHENG, L.; LI, P. Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, pp. 1-14, 2017.

LAM, S.S.; HO, E.S.; HE, B.L.; WONG, W.W.; CHER, C.Y.; NG, N.K.; MAN, C.H. Homoharringtonine (omacetaxine mepesuccinate) as an adjunct for FLT3-ITD acute myeloid leukemia. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 359, pp. 359ra129, 2016.

LANGDON, S.P. Animal modeling of cancer pathology and studying tumor response to therapy. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 12, pp. 1535-1547, 2012.

LANGE, S.S.; TAKATA, K.; WOOD, R.D. DNA polymerases and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 96-110, 2011.



LEACH, D.R.; KRUMMEL, M.F.; ALLISON, J.P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. **Science**, v. 271, n. 1, pp. 1734–1736, 1996.

LEBWOHL, M.; SWANSON, N.; ANDERSON, L.L.; MELGAARD, A.; XU, Z.; BERMAN, B. Ingenol mebutate gel for actinic keratosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 11, pp. 1010-1019, 2012.

LEE, E.Y.; MULLER, W.J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.2, n.10, pp. 1-18, 2010.

LEE, K.A.; CHAE, J.I.; SHIM, J.H. Natural diterpenes from coffee, cafestol and kahweol induce apoptosis through regulation of specificity protein 1 expression in human malignant pleural mesothelioma. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, pp. 19-60, 2012.

LEVIS, M. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. **Blood**, v. 129, n. 26, pp. 3403-3406, 2017.

LEVRIER, C.; SADOWSKI, M.C.; NELSON, C.C.; DAVIS, R.A. Cytotoxic C20 Diterpenoid Alkaloids from the Australian Endemic Rainforest Plant *Anopterus macleayanus*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 12, pp. 2908-2916, 2015.

LI, B.J.; WANG, H.; GONG, T.; CHEN, J.J.; CHEN, T.J.; YANG, J.L.; ZHU, P. Improving 10-deacetylbaicatin III-10- β -O-acetyltransferase catalytic fitness for Taxol production. **Nature Communication**, v. 8, n. 1, pp. 1-13, 2017.

LI, Y.; WANG, Y.; WANG, S.; GAO, Y.; ZHANG, X.; LU, C. Oridonin phosphate-induced autophagy effectively enhances cell apoptosis of human breast cancer cells. **Medical Oncology**, v. 32, n. 1, pp. 364-366, 2015b.

LI, Y.C.; ZHANG, R.; YANG, Y.; LI, J.; ZHU, K.; YAO, K.; LIU, Z.G. Halichondrin B amide acts as tubulin binding agent to exhibit anti-tumor efficacy in hematologic cancers. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, pp. 19662-19669, 2015.

LIAO, Y.J.; BAI, H.Y.; LI, Z.H.; ZOU, J.; CHEN, J.W.; ZHENG, F.; ZHANG, J.X. Longikaurin A, a natural ent-kaurane, induces G2/M phase arrest via downregulation of Skp2 and apoptosis induction through ROS/JNK/c-Jun pathway in hepatocellular carcinoma cells. **Cell Death & Differentiation**, v. 5, n. 1, pp. 1-11, 2014.

LICHTMAN, M.A. A historical perspective on the development of the cytarabine (7days) and daunorubicin (3days) treatment regimen for acute myelogenous leukemia: 2013 the 40th anniversary of 7+3. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 50, n. 2, pp. 119-130, 2013.

LIM, M.Y.; JAMIESON, K. Profile of sapacitabine: potential for the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia in elderly patients. **Clinical Interventions in Aging**, v. 9, n. 1, pp. 753-762, 2014.

LIM, W.; PARK, J.; LEE, Y.H.; HONG, J.; LEE, Y. Subglutinol A, an immunosuppressive α -pyrone diterpenoid from *Fusarium subglutinans*, acts as an estrogen receptor antagonist. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, n. 3, pp. 507-512, 2015.

LIN, Y.; CUI, H.; XU, H.; YUE, L.; XU, H.; JIANG, L.; LIU, J. Jolkinolide B induces apoptosis in MDA-MB-231 cells through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 27, n. 6, pp. 1976-1980, 2012.

LIU, L.F.; DESAI, S.D.; LI, T.K.; MAO, Y.; SUN, M.; SIM, S.P. Mechanism of action of camptothecin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 922, n. 1, pp. 1-10, 2000.



- LIU, Y.; YIN, T.; FENG, Y.; CONA, M.M.; HUANG, G.; LIU, J. 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.
- LIU, Y.Q.; LI, W.Q.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; QIAN, K.; YANG, L.; ZHU, G.X.; WU, X.B. Perspectives on biologically active camptothecin derivatives. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, n. 4, pp. 753-789, 2015.
- LIZARTE NETO, F.S.; TIRAPELLI, D.P.; AMBROSIO, S.R.; TIRAPELLI, C.R.; OLIVEIRA, F.M.; NOVAIS, P.C.; PERIA, F.M.; OLIVEIRA, H.F.; CARLOTTI JUNIOR, C.G.; TIRAPELLI, L.F. Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 1, pp. 71-78, 2013.
- LUCAS, D.M.; STILL, P.C.; PÉREZ, L.B.; GREVER, M.R.; KINGHORN, A.D. Potential of plant-derived natural products in the treatment of leukemia and lymphoma. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 7, pp. 812-822, 2010.
- LUESCH, H.; MOORE, R.E.; PAUL, V.J.; MOOBERRY, S.L.; CORBETT, T.H. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 7, pp. 907-910, 2001.
- LV, H.W.; LUO, J.G.; ZHU, M.D.; ZHAO, H.J.; KONG, L.Y. Neo-Clerodane diterpenoids from the aerial parts of *Teucrium fruticans* cultivated in China. **Phytochemistry**, v. 119, n. 1, pp. 26-31, 2015.
- MA, G.X.; YUAN, J.Q.; CAO, L.; YANG, J.S.; XU, X.D. The new cassane-type diterpenes from *Caesalpinia minax*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n. 1, pp. 759-763, 2012.
- MA, W.; HU, J.; CHENG, Y.; WANG, J.; ZHANG, X.; XU, M. Ginkgolide B protects against cisplatin-induced ototoxicity: enhancement of Akt-Nrf2-HO-1 signaling and reduction of NADPH oxidase. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 75, n. 1, pp. 949-959, 2015.
- 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, pp. 846-853, 2012.
- MAJIDINIA, M.; YOUSEFI, B. DNA repair and damage pathways in breast cancer development and therapy. **DNA Repair (Amst)**, v. 54, n. 1, pp. 22-29, 2017.
- MALIZZIA, L.J.; HSU, A. Temsirolimus, an mTOR inhibitor for treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 12, n. 4, pp. 639-646, 2008.
- 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, pp. 1233-1238, 1990.
- MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 8, n. 2, pp. 83-91, 2016.
- MAMTANI, R.; VAUGHN, D.J. Vinflunine in the treatment of advanced bladder cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 11, n. 1, pp. 13-20, 2011.
- MARANGONI, E.; VINCENT-SALOMON, A.; AUGER, N.; DEGEORGES, A.; ASSAYAG, F.; DE CREMOUX, P.; DE PLATER, L.; GUYADER, C.; DE PINIEUX, G.; JUDDE, J-G.; et al. A new model of



patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 1, pp. 3989–3998, 2007.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V. 3rd ed. New York, USA: W.H. Freeman and Company; 1998. Five Kingdoms – An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth.

MARINO-ENRIQUEZ, A. Advances in the Molecular Analysis of Soft Tissue Tumors and Clinical Implications. **Surgical Pathology Clinics**, v. 8, n.3, pp. 525-537, 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, pp. 457-473, 2016.

MARTELL, R.E.; SERMER, D.; GETZ, K.; KAITIN, K.I. Oncology drug development and approval of systemic anticancer therapy by the U.S. Food and Drug Administration. **Oncologist**, v. 18, n.1, pp. 104-111, 2013.

MATHER, J.P. In vitro models. **Stem Cells**, v. 30, n. 2, pp. 95-99, 2012.

MATHUR, S.; HOSKINS, C. Drug development: Lessons from nature. **Biomedical Reports**, v. 6, n. 6, pp. 612-614, 2017.

MCDERMOTT, M.; EUSTACE, A.J.; BUSSCHOTS, S.; BREEN, L.; CROWN, J.; CLYNES, M.; O'DONOVAN, N. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. **Frontiers in Oncology**, v. 6, n. 4, pp. 1-14, 2014.

MCDONALD, J.A.; GOYAL, A.; TERRY, M.B. Alcohol Intake and Breast Cancer Risk: Weighing the Overall Evidence. **Current Breast Cancer Reports**, v. 5, n.3, pp. 1-20, 2013.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Review fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.1, pp. 59-63, 2010.

MCGREGOR, B.A.; BROWN, A.W.; OSSWALD, M.B.; SAVONA, M.R. The use of higher dose clofarabine in adults with relapsed acute lymphoblastic leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 84, n. 4, pp. 228-230, 2009.

MCGUIRE, A.; BROWN, J.A.; MALONE, C.; MCLAUGHLIN, R.; KERIN, M.J. Effects of age on the detection and management of breast cancer. **Cancers (Basel)**, v. 7, n.22, pp. 908-929, 2015.

MCKEE, A.E.; FARRELL, A.T.; PAZDUR R, WOODCOCK J. The role of the U.S. Food and Drug Administration review process: clinical trial endpoints in oncology. **Oncologist**, v.15, n.1, pp. 13-18, 2010.

MEDINGER, M.; Lengerke, C.; PASSWEG, J. Novel therapeutic options in Acute Myeloid Leukemia. **Leukemia Research Reports**, v. 6, n. 1, pp. 39-49, 2016.

MEESAKUL, P.; RITTHIWIGROM, T.; CHEENPRACHA, S.; SRIPISUT, T.; MANEERAT, W.; MACHAN, T.; LAPHOOKHIEO, S. A New Cytotoxic Clerodane Diterpene from Casearia graveolens Twigs. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 1, pp. 13-15, 2016.

MEHRGOU, A.; AKOUCHEKIAN, M. THE importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. **Medical Journal of the Islamic Republic**, v. 15, n. 30, p. 13-25, 2016.

MEKHAIL, T.M.; MARKMAN, M. Paclitaxel in cancer therapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 3, n. 6, pp. 755-766, 2002.



- MELVIN, J.C.; WULANINGSIH, W.; HANA, Z.; PURUSHOTHAM, A.D.; PINDER, S.E.; FENTIMAN, I.; GILLET, C. Family history of breast cancer and its association with disease severity and mortality. **Cancer Medicine**, v. 5, n.5, pp. 942- 949, 2016.
- MENCK, C.F.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? **Genetics and Molecular Biology**, v.37, n.1, pp. 220-133, 2014.
- MERK, J.; ROLFF, J.; DORN, C.; LESCHBER, G.; FICHTNER, I. Chemoresistance in non-small-cell lung cancer: can multidrug resistance markers predict the response of xenograft lung cancer models to chemotherapy? **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 40, n. 1, pp. e29–e33, 2011.
- MESSINA, F.; CURINI, M.; DI SANO, C.; ZADRA, C.; GIGLIARELLI, G.; RASCÓN-VALENZUELA, L.A.; ROBLES ZEPEDA, R.E.; MARCOTULLIO, M.C. Diterpenoids and Triterpenoids from the Resin of *Bursera microphylla* and Their Cytotoxic Activity. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 5, pp. 184-1188, 2015.
- MILLER, K.; NEILAN, B.; SZE, D.M. Development of Taxol and other endophyte produced anti-cancer agents. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 3, n. 1, pp. 14-19, 2008.
- MILOSEVIĆ-DJORDJEVIĆ, O.; GRUJICIC, D.; VASKOVIĆ, Z.; MARINKOVIĆ, D. High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 220, n. 2, p. 115-120, 2010.
- MITA, A.C.; FIGLIN, R.; MITA, M.M. Cabazitaxel: more than a new taxane for metastatic castrate-resistant prostate cancer? **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 1, pp. 6574-6579, 2012.
- MIYAZAKI, T.; KIRINO, Y.; TAKENO, M.; SAMUKAWA, S.; HAMA, M.; TANAKA, M.; YAMAJI, S. Expression of heme oxygenase-1 in human leukemic cells and its regulation by transcriptional repressor Bach1. **Cancer Science**, v. 101, n. 6, pp. 1409-1416, 2010.
- MIZE, C.E.; AVIGAN, J.; BAXTER, J.H.; FALES, H.M.; D. STEINBERG, D. Metabolism of phytol-U-14C and phytanic acid-U-14C in the rat. **The Journal of Lipid Research**, v. 7, n.2, pp. 692- 697, 1966.
- MIZE, C.E.; AVIGAN, J.; STEINBERG, D.; PITTMAN, R. C.; FALES, H.M.; MILNE, G.W. A major pathway for the mammalian oxidative degradation of phytanic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 176, n.1, pp. 720- 739, 1969.
- MONTASER, R.; LUESCH, H. Marine natural products: a new wave of drugs? **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 12, pp. 1475-1489, 2011.
- MOONEY, C.J.; NAGIAH, G.; FU, P.; WASMAN, J.K.; COONEY, M.M.; SAVVIDES, P.S.; BOKAR, J.A. A phase II trial of fosbretabulin in advanced anaplastic thyroid carcinoma and correlation of baseline serum-soluble intracellular adhesion molecule-1 with outcome. **Thyroid**, v. 19, n. 3, pp. 233-240, 2009.
- MORAES, M.C.; NETO, J.B.; MENCK, C.F. DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n.17, pp. 1362-1388, 2012.
- MORIL, E. Heterogeneity of tumor cells in terms of cancer-initiating cells. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 30, n.1, pp. 1–6, 2017.
- MOTZER, R.J.; ESCUDIER, B.; OUDARD, S.; HUTSON, T.E.; PORTA, C.; BRACARDA, S.; GRÜNWALD, V. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. **Lancet**, v. 372, n. 9637, pp. 449-456, 2008.
- MOUDI, M.; GO, R.; YIEN, C.Y.; NAZRE, M. Vinca alkaloids. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 11, pp. 1231-1235, 2013.



- MRÓZEK, K.; TANNER, S.M.; HEINONEN, K.; BLOOMFIELD, C.D. Molecular cytogenetic characterization of the KG-1 and KG-1a acute myeloid leukemia cell lines by use of spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 38, n. 3, pp. 249-252, 2003.
- MUCHTAR, E.; GERTZ, M.A.; MAGEN, H. A practical review on carfilzomib in multiple myeloma. **European Journal of Haematology**, v. 96, n. 6, pp. 564-577, 2016.
- MUGGIA, F.; KUDLOWITZ, D. Novel taxanes. **Anticancer Drugs**, v. 25, n. 1, pp. 593-598, 2014.
- MUKHTAR, E.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 2, pp. 275-284, 2014.
- MULLER, P.A.; VOUSDEN, K.H. p53 mutations in cancer. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 2-8, 2013.
- MUÑOZ, S.; BÚA, S.; RODRÍGUEZ-ACEBES, S.; MEGÍAS, D.; ORTEGA, S.; DE MARTINO, A.; MÉNDEZ, J. In Vivo DNA Re-replication Elicits Lethal Tissue Dysplasias. **Cell Reports**, v. 19, n.5, pp. 928-938, 2017.
- NABATCHIAN, F.; MORADI, A.; AGHAEI, M.; GHANADIAN, M.; JAFARI, S.M.; TABESH, S. New 6(17)-epoxylathyrane diterpene: aellinane from *Euphorbia aellenii* induces apoptosis via mitochondrial pathway in ovarian cancer cell line. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 27, n. 8, pp. 622-630, 2017.
- NAUGHTON, M.J.; WEAVER, K.E. Physical and mental health among cancer survivors: considerations for long-term care and quality of life. **North Carolina medical journal**, v. 75, n.4, pp. 283-286, 2014.
- NEGRINI, S.; GORGOLIS, V.G.; HALAZONETIS, T.D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, n.3, pp. 220-228 2010.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, pp. 255-278, 2014.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 1, pp. 311-335, 2012.
- NG, J.S. Vinflunine: review of a new vinca alkaloid and its potential role in oncology. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 17, n. 3, pp. 209-224, 2011.
- NHIS. National Health Interview Survey – National Center for Health Statistics, USA. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/nchs/nhis/index.htm>>. Acesso em 20 de julho de 2017.
- NIK MAN, N.M.; HASSAN, R.; ANG, C.Y.; ABDULLAH, A.D.; MOHD RADZI, M.A.; SULAIMAN, S.A. Antileukemic Effect of Tualang Honey on Acute and Chronic Leukemia Cell Lines. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, pp. 1-7, 2015.
- NWANI, C.D.; SOMDARE, P.O.; OGUEJI, E.O.; NWANI, J.C.; UKONZE, J.A.; NWADINIGWE, A.O. Genotoxicity assessment and oxidative stress responses in freshwater African catfish *Clarias gariepinus* exposed to fenthion formulations. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 3, p. 273-280, 2017.
- NYGA, A.; CHEEMA, U.; LOIZIDOU, M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 5, n. 3, pp. 239-248, 2011.
- O'CONNOR, M.J. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. **Molecular Cell**, v.60, n.4, pp. 547-560, 2015.



OECD, **Test Guideline TG-407**. 2008. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en> Acesso em 20 setembro de 2017.

OECD, **Test Guideline TG-423**. 2002. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en> Acesso em 20 setembro de 2017.

OECD, **Test Guideline TG-474**. 2014. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test_9789264224292-en> Acesso em 20 setembro de 2017.

OECD, **Test Guideline TG-489**. 2014. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264224179-en> Acesso em 20 de setembro de 2017.

OJIMA, I.; LICHTENTHAL, B.; LEE, S.; WANG, C.; WANG, X. Taxane anticancer agents: a patent perspective. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 1, pp. 1-20, 2016.

OLIVEIRA, K.D.; AVANZO, G.U.; TEDARDI, M.V.; RANGEL, M.M.M.; AVANZO, J.L.; FUKUMASU, V.H.; RAO, K.V.K.; SINHORINI, I.L.; DAGLI, M.L.Z. 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.

ORAKI KOHSHOUR, M.; NAJAFI, L.; HEIDARI, M.; GHAFARI SHARAF, M. Antiproliferative effect of H₂O₂ against human acute myelogenous leukemia KG1 cell line. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, n. 3, pp. 134-141, 2013.

OZA, A.M.; PIGNATA, S.; POVEDA, A.; MCCORMACK, M.; CLAMP, A.; SCHWARTZ, B.; CHENG, J.; LI, X. Randomized Phase II Trial of Ridaforolimus in Advanced Endometrial Carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 31, pp. 3576-3582, 2015.

PAN, L.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Discovery of new anticancer agents from higher plants. **Frontiers in Bioscience (Schol Ed)**, v. 4, n. 1, pp. 142-156, 2012.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapy**, v. 2, n. 2, p. 74-79, 2011.

PATEL, S.B.; STENEHJEM, D.D.; GILL, D.M.; TANTRAVAH, S.K.; AGARWAL, A.M.; HSU, J.; VUONG, W. Everolimus Versus Temsirolimus in Metastatic Renal Cell Carcinoma After Progression with Previous Systemic Therapies. **Clinical Genitourinary Cancer**, v. 14, n. 2, pp. 153-159, 2016.

PATIL, P.O.; PATIL, A.G.; RANE, R.A.; PATIL, P.C.; DESHMUKH, P.K.; BARI, S.B.; PATIL, D.A. Recent advancement in discovery and development of natural product combretastatin-inspired anticancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 8, pp. 955-969, 2015.

PEDRAZA-FARIÑA, L.G. Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.79, n. 3, pp. 95-103, 2006.

PEJIN, B.; SAVIC, A.; SOKOVIC, M.; GLAMOCLIIJA, J.; CIRIC, A.; NIKOLIC, M.; RADOTIC, K.; MOJOVIC, M. Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. **Natural Product Research**, v. 28, n. 6, pp. 372-376, 2014.

PEMMARAJU, N.; KANTARJIAN, H.; ANDREEFF, M.; CORTES, J.; RAVANDI, F. Investigational FMS-like tyrosine kinase 3 inhibitors in treatment of acute myeloid leukemia. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 23, n. 7, pp. 943-954, 2014.



- PETIWALA, S.M.; JOHNSON, J.J. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, pp. 93-102, 2015.
- PFEFFER, T.J.; SASSE, F.; SCHMIDT, C.F.; LAKÄMPER, S.; KIRSCHNING, A.; SCHOLZ, T. The natural diterpene tonantzitlolone A and its synthetic enantiomer inhibit cell proliferation and kinesin-5 function. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 112, n. 1, pp. 164-170, 2016.
- PHELPS, M.; CHEN, E. Zebrafish Rhabdomyosarcoma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 916, n. 1, pp. 371-389, 2016.
- PINILLA-IBARZ, J.; SWEET, K.; EMOLE, J.; FRADLEY, M. Long-term BCR-ABL1 Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Chronic Myeloid Leukemia. **Anticancer Research**, v. 35, n. 12, pp. 6355-6364, 2015.
- PIZZOLATO, J.F.; SALTZ, L.B. The camptothecins. **Lancet**, v. 361, n. 9376, pp. 2235-2242, 2003.
- POLASTRO, L.; AFTIMOS, P.G.; AWADA, A. Eribulin mesylate in the management of metastatic breast cancer and other solid cancers: a drug review. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 14, n. 6, pp. 649-665, 2014.
- POST, S.M. Mouse models of sarcomas: critical tools in our understanding of the pathobiology. **Clinical Sarcoma Research**, v. 2, n. 1, pp. 1-9, 2012.
- POWELL, R.G.; WEISLEDER, D.; SMITH, C.R.JR.; ROHWEDDER, W.K. Structures of harringtonine, isoharringtonine, and homoharringtonine. **Tetrahedron Letters**, v. 11, n. 1, pp. 815-818, 1970.
- PRAHALLAD, A.; SUN, C.; HUANG, S.; DI NICOLANTONIO, F.; SALAZAR, R.; ZECCHIN, D.; BEIJERSBERGEN, R.L. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF (V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. **Nature**, v. 483, n.1, pp. 100-103, 2012.
- PRASAD, V.; DE JESÚS, K.; MAILANKODY, S. The high price of anticancer drugs: origins, implications, barriers, solutions. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 6, pp. 381-390, 2017.
- PRESTON, B.D.; ALBERTSON, T.M.; HERR, A.J. DNA replication fidelity and cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 20, n.5, pp. 281-293, 2010.
- PUI, C.H.; EVANS, W.E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, pp. 166-178, 2006.
- PUI, C.H.; ROBISON, L.L.; LOOK, A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 371, n. 9617, pp. 1030-1043, 2008.
- QIN, J.; TANG, J.; JIAO, L.; JI, J.; CHEN, W.D.; FENG, G.K.; GAO, Y.H.; ZHU, X.F.; DENG, R. A diterpenoid compound, excisanin A, inhibits the invasive behavior of breast cancer cells by modulating the integrin $\beta 1$ /FAK/PI3K/AKT/ β -catenin signaling. **Life Science**, v. 93, n. 18-19, pp. 655-663, 2013.
- QU, S.; WANG, K.; XUE, H.; WANG, Y.; WU, R.; LIU, C.; GAO, A.C.; GOUT, P.W.; COLLINS, C.C.; WANG, Y. Enhanced anticancer activity of a combination of docetaxel and Aneustat (OMN54) in a patient-derived, advanced prostate cancer tissue xenograft model. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 1, pp. 311-322, 2014.
- QUAIL, D.F.; JOYCE, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, pp. 1423-1437, 2013.
- QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. Homoharringtonine for the treatment of chronic myelogenous leukemia. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 6, pp. 1029-1037, 2008.



- RAMIREZ-LLODRA, E.; BRANDT, A.; DANOVARO, R.; DE MOL, B.; ESCOBAR, E.; GERMAN, C.R.; LEVIN, L.A. Deep, diverse and definitely different: unique attributes of the world's largest ecosystem. **Biogeosciences**, v. 7, n. 1, pp. 2851-2899, 2010.
- RAO, X.; HUANG, X.; HE, L.; SONG, J.; SONG, Z.; SHANG, S. Antitumor activity and structure-activity relationship of diterpenoids with a dehydroabietyl skeleton. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 15, n. 10, pp. 840-844, 2012.
- RASHID, O.M.; TAKABE, K. Animal models for exploring the pharmacokinetics of breast cancer therapies. **Expert Opinion in Drug Metabolism and Toxicology**, v. 11, n. 2, p. 221-230, 2015.
- RATAN, R.; PATEL, S.R. Chemotherapy for soft tissue sarcoma. **Cancer**, v. 122, n. 19, pp. 2952-2960, 2016.
- RATH, B.H.; FAIR, J.M.; JAMAL, M.; CAMPHAUSEN, K.; TOFILON, P.J. Astrocytes enhance the invasion potential of glioblastoma stem-like cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, pp. 1-10, 2013.
- REDIC, K. Carfilzomib: a novel agent for multiple myeloma. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 1, pp. 1095-1106, 2013.
- REIS, M.A.; PATERNA, A.; FERREIRA, R.J.; LAGE, H.; FERREIRA, M.J. 2014a. Macrocyclic diterpenes resensitizing multidrug resistant phenotypes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, pp. 3696-3702, 2014.
- REKHA, K.; RICHA, P.; HYMAVATHY, A.; SURESH BABU, K.; MADHUSUDANA, R.A.O.J.; NEHA, R.D.; AMITAVA, D. New cytotoxic clerodane diterpenes from the leaves of *Premna tomentosa*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 18, n. 3, pp. 215-221, 2016.
- RENO, T.A.; KIM, J.Y.; RAZ, D.J. Triptolide Inhibits Lung Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *The Annals of Thoracic Surgery*, v. 100, n. 5, pp. 1817-1824, 2015.
- 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, pp. 4-10, 2007.
- ROBAK, T.; SZMIGIELSKA-KAPŁON, A.; PLUTA, A.; GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK, O.; WOLSKA, A.; CZEMERSKA, M.; WIERZBOWSKA, A. Novel and emerging drugs for acute myeloid leukemia: pharmacology and therapeutic activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 5, pp. 638-666, 2011.
- ROLIM, T.L.; MEIRELES, D.R.P.; BATISTA, T.M.; DE SOUSA, T.K.G.; MANGUEIRA, V.M.; DE ABRANTES, R.A.; PITA, J.C.L.R.; XAVIER, A.L. Toxicity and antitumor potential of *Mesosphaerum sidifolium* (Lamiaceae) oil and fenchone, its major component. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 347, 2017.
- RONTANI, J.F.; VOLKMAN, J.K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, v. 34, n. 1, pp. 1-35, 2003.
- RUBINO, C.; SHAMSALDIN, A.; LÊ, M.G.; LABBÉ, M.; GUINEBRETIERE, J.M.; CHAUAUDRA, 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, pp. 277-288, 2005.
- RUBOVSKY, G.; HORVÁTH, Z. Recent Advances in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer. **Journal of Breast Cancer**, v.20, n.2, pp. 119-131, 2017.
- RUIJTENBERG, S.; VAN DEN HEUVEL, S. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. **Cell Cycle**, v. 15, n. 2, pp. 196-212, 2016.



- RUNDLE, S.; BRADBURY, A.; DREW, Y.; CURTIN, N.J. Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy. **Cancers (Basel)**, v. 9, n.5, pp. 41-45, 2017.
- RUSYN, I.; GATTI, D.M.; WILTSHIRE, T.; KLEEBERGER, S.R.; THREADGILL, D.W. Toxicogenetics: population-based testing of drug and chemical safety in mouse models. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 8, p. 1127-1136, 2010.
- 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 of Medical and Paediatric Oncology**, v. 36, n. 4, p. 212-218, 2015.
- SALLAM, A.A.; AYOUB, N.M.; FOUDAH, A.I.; GISSENDANNER, C.R.; MEYER, S.A.; EL SAYED, K.A. Indole diterpene alkaloids as novel inhibitors of the Wnt/ β -catenin pathway in breast cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, n. 1, pp. 594-606, 2013.
- SANTOS, C.C.M.P.; SALVADORI, M.S.; MOTA, V.G.; COSTA, L.M.; ALMEIDA, A.A.C.; OLIVEIRA, G.A.L.; COSTA, J.P.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. **Neuroscience Journal**, v. 2013, n. 1, pp. 1-9, 2013.
- SARISOZEN, C.; ABOUZEID, A.H.; TORCHILIN, V.P. The effect of co-delivery of paclitaxel and curcumin by transferrin-targeted PEG-PE-based mixed micelles on resistant ovarian cancer in 3-D spheroids and in vivo tumors. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 2, pp. 539-550, 2014.
- SASAKI, Y.F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 629-799, 2000.
- SAULTZ, J.N.; GARZON, R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 2, pp. 1-17, 2016.
- SAVAGE, P. Approvals in 2016: cost-benefit challenges of new anticancer agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n.3, pp. 133-134, 2017.
- SCHNEIDER, G.; SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; RAD, R.; SAUR, D. Tissue-specific tumorigenesis: context matters. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 4, pp. 239-253, 2017.
- SCHOUTEN, S.; OZDIREKCAN, S.; VAN DER MEER, M.T.J.; BLOKKER, P.; BAAS, M.; HAYES, J.M.; DAMSTE, J.S.S. Evidence for substantial intramolecular heterogeneity in the stable carbon isotopic composition of phytol in photoautotrophic organisms. **Organic Geochemistry**, v. 39, n. 1, pp. 135-146, 2008.
- SCOTT, L.J. Brentuximab Vedotin: A Review in CD30-Positive Hodgkin Lymphoma. **Drugs**, v. 77, n. 4, pp. 435-445, 2017.
- SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; ISHIKI, H.; JUNIOR, F.J.; DOS, S.P.; TAVARES, J.F.; DA SILVA, M.S. Prediction of anticancer activity of diterpenes isolated from the paraiban flora through a PLS model and molecular surfaces. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 5, pp. 609-612, 2014.
- SEHGAL, S.N. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. **Transplantation Proceedings**, v. 35, n. 3, pp. 7S-14S, 2003.
- SEIFERT, M.; SELLMANN, L.; BLOEHDORN, J.; WEIN, F.; STILGENBAUER, S.; DÜRIG, J.; KÜPPERS, R. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 12, pp. 2183-2198, 2012.



- SERUGA, B.; OCANA, A.; AMIR, E.; TANNOCK, I.F. Failures in Phase III: Causes and Consequences. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 20, pp. 4552-4560, 2015.
- SERUGA, B.; SADIKOV, A.; CAZAP, E.L.; DELGADO, L.B.; DIGUMARTI, R.; LEIGHL, N.B.; MESHREF, M.M. Barriers and challenges to global clinical cancer research. **The Oncologist**, v. 19, n. 1, pp. 61-67, 2014.
- SHARMA, G.N.; DAVE, R.; SANADYA, J.; SHARMA, P.; SHARMA, K.K. Various types and management of breast cancer: an overview. **Journal of advanced pharmaceutical technology**, v.1, n.2, pp. 109-126, 2010.
- SHELTON, E.; LAHARIE, D.; SCOTT, F.I.; MAMTANI, R.; LEWIS, J.D.; COLOMBEL, J.F.; ANANTHAKRISHNAN, A.N. Cancer Recurrence Following Immune-Suppressive Therapies in Patients With Immune-Mediated Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 151, n. 1, pp. 97-109, 2016.
- SHEN, Y.; LU, B.; ZHANG, S.; MA, Z.J. Diterpenoid C of Radix Curcumae: an inhibitor of proliferation and inducer of apoptosis in human colon adenocarcinoma cells acting via inhibiting MAPK signaling pathway. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 9, pp. 1158-1165, 2014.
- SHENG, J.Y.; MOVVA, S. Systemic Therapy for Advanced Soft Tissue Sarcoma. **Surgical Clinics of North America**, v. 96, n. 5, pp. 1141-1156, 2016.
- SIDDIQUI, J.A.; SINGH, A.; CHAGTOO, M.; SINGH, N.; GODBOLE, M.M.; CHAKRAVARTI, B. Phytochemicals for breast cancer therapy: current status and future implications. **Current Cancer Drug Targets**, v. 15, n.2, pp. 116-135, 2015.
- SIDDIQUI, M.; RAJKUMAR, S.V. The high cost of cancer drugs and what we can do about it. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 87, n.10, pp. 935-943, 2012.
- SIEGEL, R.I.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **Cancer Journal**, v. 67, n.1, pp. 7-30, 2017.
- SILBERMANN, M.; PITSILLIDES, B.; AL-ALFI, N.; OMRAN, S.; AL-JABRI, K.; ELSHAMY, K.; GHRAYEB, I. Multidisciplinary care team for cancer patients and its implementation in several Middle Eastern countries. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 7, pp. 41-47, 2013.
- SILLER, G.; GEBAUER, K.; WELBURN, P.; KATSAMAS, J.; OGBOURNE, S.M. PEP005 (ingenol mebutate) gel, a novel agent for the treatment of actinic keratosis: results of a randomized, double-blind, vehicle-controlled, multicentre, phase IIa study. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 50, n. 1, pp. 16-22, 2009.
- SILVA, R.O.; SOUSA, F.B.; DAMASCENO, S.R.; CARVALHO, N.S.; SILVA, V.G.; OLIVEIRA, F.R.; SOUSA, D.P.; ARAGÃO, K.S.; BARBOSA, A.L.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, J.V. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 4, pp. 455-464, 2014.
- SIMMONS, T.L.; ANDRIANASOLO, E.; MCPHAIL, K.; FLATT, P.; GERWICK, W.H. Marine natural products as anticancer drugs. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 2, pp. 333-342, 2005.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.
- SORENSEN, S.F.; CARUS, A.; MELDGAARD, P. Intravenous or oral administration of vinorelbine in adjuvant chemotherapy with cisplatin and vinorelbine for resected NSCLC. **Lung Cancer**, v. 88, n. 2, pp. 167-173, 2015.



- SOSA, J.A.; ELISEI, R.; JARZAB, B.; BALKISSOON, J.; LU, S.P.; BAL, C.; MARUR, S. Randomized safety and efficacy study of fosbretabulin with paclitaxel/carboplatin against anaplastic thyroid carcinoma. **Thyroid**, v. 24, n. 2, pp. 232-240, 2014.
- SRIRAM, D.; YOGESWARI, P.; THIRUMURUGAN, R.; BAL, T.R. Camptothecin and its analogues: a review on their chemotherapeutic potential. **Natural Product Research**, v. 19, n. 4, pp. 393-412, 2005.
- STANISLAW, C.; XUE, Y.; WILCOX, W.R. Genetic evaluation and testing for hereditary forms of cancer in the era of next-generation sequencing. **Cancer Biology & Medicine**, v. 12, n.1, pp. 55-67, 2016.
- STEELE, J.M. Carfilzomib: a new proteasome inhibitor for relapsed or refractory multiple myeloma. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 19, n. 1, pp. 348-354, 2013.
- STEELE, V.E.; LUBET, R.A. The use of animal models for cancer chemoprevention drug development. **Seminars in Oncology**, v. 37, n. 4, pp. 327-338, 2010.
- STEEN, S.; STEPHENSON, G. Current treatment of soft tissue sarcoma. **Archive of "Proceedings (Baylor University. Medical Center)"**, v. 21, n. 4, pp. 392-396, 2008.
- STONE, R.M.; MANDREKAR, S.J.; SANFORD, B.L.; LAUMANN, K.; GEYER, S.; BLOOMFIELD, C.D.; THIEDE, C. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 5, pp. 454-464, 2017.
- SU, C.C. Tanshinone IIA decreases the migratory ability of AGS cells by decreasing the protein expression of matrix metalloproteinases, nuclear factor κ B-p65 and cyclooxygenase-2. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 2, pp. 1263-1268, 2016.
- SU, Z.; YANG, Z.; XU, Y.; CHEN, Y.; YU, Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n.48, pp. 1-14, 2015.
- SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **Journal of Cancer Science and Therapy**, v.1, n.1, pp. 1-4, 2009.
- SURMAN, M.; JANIK, M.E. Stress and its molecular consequences in cancer progression. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 71, n.1, pp. 485-499, 2017.
- SUZUKI, K.; YAMADA, S. Ascites sarcoma 180, a tumor associated with hypercalcemia, secretes potent bone-resorbing factors including transforming growth factor alpha, interleukin-1 alpha and interleukin-6. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 3, pp. 219-233, 1994.
- SVENSON, S.; WOLFGANG, M.; HWANG, J.; RYAN, J.; ELIASOF, S. Preclinical to clinical development of the novel camptothecin nanopharmaceutical CRLX101. **The Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 1, pp. 49-55, 2011.
- SZCZEPAŃSKI, T.; VAN DER VELDEN, V.H.; VAN DONGEN, J.J. Classification systems for acute and chronic leukaemias. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 16, n. 4, pp. 561-582, 2003.
- TABATA, K.; KIM, M.; MAKINO, M.; SATOH, M.; SATOH, Y.; SUZUKI, T. Phenolic diterpenes derived from *Hyptis incana* induce apoptosis and G(2)/M arrest of neuroblastoma cells. **Anticancer Research**, v. 32, n. 11, pp. 4781-4789, 2012.
- TAMURA, K. Development of cell-cycle checkpoint therapy for solid tumors. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 45, n.12, pp. 1097-1102, 2015.
- 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, pp. 541-557, 2011.



- TERASHIMA, M.; SAKAI, K.; TOGASHI, Y.; HAYASHI, H.; DE VELASCO, M.A.; TSURUTANI, J.; NISHIO, K. Synergistic antitumor effects of S-1 with eribulin in vitro and in vivo for triple-negative breast cancer cell lines. **Springerplus**, v. 8, n. 1, pp. 1-11, 2014.
- TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer Journal**, v. 7, n. 6, pp. 1-12, 2017.
- THOMPSON, J.L. Carfilzomib: a second-generation proteasome inhibitor for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 47, n. 1, pp. 56-62, 2013.
- TIMMINS, N.E.; DIETMAIR, S.; NIELSEN, L.K. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 7, n. 2, pp. 97-103, 2004.
- TOZER, G.M.; KANTHOU, C.; PARKINS, C.S.; HILL, S.A. The biology of the combretastatins as tumour vascular targeting agents. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, n. 1, pp. 21-38, 2002.
- 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, pp. 345-348, 2007.
- TRAN, H.; YANG, D. Clofarabine in the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia in older adults. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, n. 1, pp. 89-96, 2012.
- TSENG, Y.J.; YANG, Y.C.; WANG, S.K.; DUH, C.Y. Numerosol A-D, new cembranoid diterpenes from the soft coral *Sinularia numerosa*. **Marine Drugs**, v. 12, n. 6, pp. 3371-3380, 2014.
- TSUBURA, A.; LAI, Y.C.; MIKI, H.; SASAKI, T.; UEHARA, N.; YURI, T.; YOSHIZAWA, K. Review: Animal models of N-Methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials. **In Vivo**, v. 25, n. 1, pp. 11-22, 2011.
- TU, H.T. **Rising health costs, medical debt and chronic conditions**. Washington, DC: Center for Studying Health System Change; 2004.
- TUBBS, A.; NUSSENZWEIG, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in **Cancer Cell**, v. 168, n.4, pp. 644-656, 2017.
- TURNER, D.; GONZALEZ, A.; PETTIFORD, L.; MEACHAM, A.; WISE, E.; BOSSE, R.C.; CHAPLIN, D.; HSU, J.W. A phase I study of the vascular disrupting combretastatin, OXi4503, in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) (abstract). **Blood**, v. 122, n. 1, pp. 1463, 2013.
- UZIEL, O.; YOSEF, N.; SHARAN, R.; RUPPIN, E.; KUPIEC, M.; KUSHNIR, M.; BEERY, E. The effects of telomere shortening on cancer cells: a network model of proteomic and microRNA analysis. **Genomics**, v. 105, n. 1, pp. 5-16, 2015.
- VALASTYAN, S.; WEINBERG, R.A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, pp. 275-292, 2011.
- VAN DEN BRINK, D.M.; VAN MIERT, J.N.; DACREMONT, G.; RONTANI, J.F.; JANSEN, G.A.; WANDERS, R.J. Identification of fatty aldehyde dehydrogenase in the breakdown of phytol to phytanic acid. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 82, n.1, pp. 33-37, 2004.
- VASSILEV, A.; DEPAMPHILIS, M.L. Links between DNA Replication, Stem Cells and Cancer. **Genes**, v. 8, n. 2, p. E45, 2017.



VAVILIN, D.; VERMAAS, W.; Continuous chlorophyll degradation accompanied by chlorophyllide and phytol reutilization for chlorophyll synthesis in *Synechocystis* sp, PCC 6803. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1767, n.1, pp. 920-929, 2007.

VAVILIN, D.V.; VERMAAS, W.R.F.; Regulation of the tetrapyrrole biosynthesis pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n.1, pp. 9-24, 2002.

VENKATESAN, S.; BIRKBAK, N.J.; SWANTON, C. Constraints in cancer evolution. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 1, pp. 1-13, 2017.

VIDI, P.A.; BISSELL, M.J.; LELIEVRE, S.A. Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. **Methods in Molecular Biology**, v. 945, n. 1, pp. 193–219, 2013.

VILLANUEVA, C.; BAZAN, F.; KIM, S.; DEMARCHI, M.; CHAIGNEAU, L.; THIERY-VUILLEMIN, A.; NGUYEN, T.; CALS, L.; DOBI, E.; PIVOT, X. Cabazitaxel: a novel microtubule inhibitor. **Drugs**, v. 71, n. 10, pp. 1251-1258, 2011.

VISCONTI, R.; DELLA MONICA, R.; GRIECO, D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n.1, pp. 1-8, 2016.

VOGEL, V.G.; FISHER, R.E. Epidemiology and etiology of leukemia. **Current Opinion in Oncology**, v. 5, n. 1, 1993.

VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V.E.; ZHOU, S.; JUNIOR DIAZ, L.A.; KINZLER, K.W. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 29, n. 339, pp. 1546-1558, 2013.

WANG, L.; HU, T.; SHEN, J.; ZHANG, L.; CHAN, R.L.; LU, L.; LI, M.; CHO, C.H.; WU, W.K. Dihydrotanshinone I induced apoptosis and autophagy through caspase dependent pathway in colon cancer. **Phytomedicine**, v. 22, n. 12, pp. 1079-1087, 2015b.

WANG, W.Q.; XUAN, L.J. ent-6,7-Secokaurane diterpenoids from *Rabdosia serra* and their cytotoxic activities. **Phytochemistry**, v. 122, n. 1, pp. 119–125, 2016.

WANG, X.; ZHANG, J.J.; SUN, Y.M.; et al. Triptolide induces apoptosis and synergizes with cisplatin in cisplatin-resistant HNE1/DDP nasopharyngeal cancer cells. **Folia Biologica**, v. 61, n. 1, pp. 195–202, 2015a.

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.

WEAVER, B.A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 18, pp. 2677-2681, 2014.

WEIGELT, B.; PETERSE, J.L.; VAN'T VEER, L.J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, pp. 591–602, 2005.

WEIR, H.K.; THOMPSON, T.D.; SOMAN, A.; MØLLER, B.; LEADBETTER, S. The past, present, and future of cancer incidence in the United States: 1975 through 2020. **Cancer**, v. 121, n. 11, pp. 1827-1837, 2015.

WELFORD, A.J.; CALDWELL, J.J.; LIU, M.; RICHARDS, M.; BROWN, N.; LOMAS, C.; TIZZARD, G.J. Synthesis and Evaluation of a 2,11-Cembranoid-Inspired Library. **Chemistry**, v. 22, n. 16, pp. 5657-5664, 2016.



- WEN, C.N.; HU, D.B.; BAI, X.; WANG, F.; LI, Z.H.; FENG, T.; LIU, J.K. Chemical constituents from fruiting bodies of Basidiomycete *Perenniporia subacida*. **Fitoterapia**, v. 109, n. 1, pp. 179-184, 2016.
- WEST, C.M.; PRICE, P. Combretastatin A4 phosphate. **Anticancer Drugs**, v. 15, n. 3, pp. 179-187, 2004.
- WIJESINGHE, W.A.; JEON, Y.J.; RAMASAMY, P.; WAHID, M.E.; VAIRAPPAN, C.S. Anticancer activity and mediation of apoptosis in human HL-60 leukaemia cells by edible sea cucumber (*Holothuria edulis*) extract. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, pp. 326-331, 2013.
- WILDING, J.L.; BODMER, W.F. Cancer cell lines for drug discovery and development. **Cancer Research**, v. 74, n. 9, pp. 2377-2384, 2014.
- WONG, R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 87, pp.1-14, 2011.
- WORSHAM, M.J.; RAJU, U.; LU, M.; KAPKE, A.; BOTTTRELL, A.; CHENG, J.; SHAH, V. Risk factors for breast cancer from benign breast disease in a diverse population. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 118, n.1, pp. 1-7, 2009.
- WU, H.F.; ZHANG, X.P.; WANG, Y.; ZHANG, J.Y.; MA, G.X.; TIAN, Y.; WU, L.Z.; CHEN, S.L.; YANG, J.S.; XU, X.D. Four new diterpenes from *Aphanamixis polystachya*. **Fitoterapia**, v. 90, n. 1, pp. 126-131, 2013.
- WU, S.; HANNUN, Y. The importance of extrinsic factors in the development of cancers. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 3, n. 3, pp. 1-3, 2016.
- WU, W.M.; LIU, Y.; CHEN, X.; JIN, A.; ZHOU, M.; TIAN, T.; RUAN, H.L. Diterpenoids from the branch and leaf of *Abies fargesii*. **Fitoterapia**, v. 110, n. 1; pp. 123-128, 2016.
- XIAO, X.H.; YUAN, Z.Q.; LI, G.K. Preparation of phytosterols and phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v.104, n. 1, pp. 284-289, 2013.
- XING, H.; TONG, M.; JIANG, N.; ZHANG, X.; HU, H.; PAN, H.; LI, D. Antitumor bioactive peptides isolated from marine organisms. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 4, n. 1, pp. 1-19, 2017.
- XU, X.; FARACH-CARSON, M.C.; JIA, X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. **Biotechnology Advances**, v. 15, n.32, p. 1256-1268, 2014.
- YABROFF, K.R.; LUND, J.; KEPKA, D.; MARIOTTO, A. Economic burden of cancer in the United States: estimates, projections, and future research. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 20, n.10, pp. 2006-2014, 2011.
- YANG, J.; JIANG, H.; WANG, C.; YANG, B.; ZHAO, L.; HU, D.; QIU, G.; DONG, X.; XIAO, B. Oridonin triggers apoptosis in colorectal carcinoma cells and suppression of microRNA-32 expression augments oridonin-mediated apoptotic effects. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, n. 1, pp. 125-134, 2015.
- YAO, J.C.; FAZIO, N.; SINGH, S.; BUZZONI, R.; CARNAGHI, C.; WOLIN, E.; TOMASEK, J. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. **Lancet**, v. 387, n. 10022, pp. 968-977, 2016.
- YAO, Y.; LI, H.Z.; QIAN, B.J.; LIU, C.M.; ZHANG, J.B.; LIN, M.C. Cryptotanshione reduces the expression of metadherin in DU145 prostate cancer cells. **Zhonghua Nan Ke Xue**, v. 21, n. 1, pp. 782-787, 2015.



YARED, J.A.; TKACZUK, K.H. Update on taxane development: new analogs and new formulations. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 6, n. 1, pp. 371-384, 2012.

YATES, L.R.; CAMPBELL, P. J. Evolution of the cancer genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 11, pp. 795-806, 2012.

YAZDINIPOUR, Z.; GHANADIAN, M.; ZOLFAGHARI, B.; LANZOTTI, V. 6(17)-Epoxylathyrane diterpenes from *Euphorbia sogdiana* Popov with cytotoxic activity. **Fitoterapia**, v. 108, n. 1, pp. 87-92, 2016.

YE, J.; ZHOU, F.; AL-KAREEF, A.M.; WANG, H. Anticancer agents from marine sponges. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 17, n. 1, pp. 64-88, 2015.

YELNE, M.B.; DENNIS, T.J.; BILLORE, K.V.; CHAUDHARI, B.G. Database of Medicinal Plants Used in Ayurveda. **Central Council for Research in Ayurveda and Siddha**, v. 7, n. 1, pp. 452-475, 2005.

YIP, C.H.; BUCCIMAZZA, I.; HARTMAN, M.; DEO, S.V.; CHEUNG, P.S. Improving outcomes in breast cancer for low and middle income countries. **World Journal of Surgery**, v. 39, n. 3, p. 686-692, 2015.

YONEKAWA, T.; THORBURN, A. Autophagy and Cell Death. **Essays in Biochemistry**, v. 55, n. 1, pp. 105-117, 2013.

YU, F.; LI, K.; CHEN, S.; LIU, Y.; LI, Y. Pseudolaric acid B circumvents multidrug resistance phenotype in human gastric cancer SGC7901/ADR cells by downregulating Cox-2 and P-gp expression. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 71, n. 1, pp. 119-126, 2015.

YUAN, W.J.; YANG, G.P.; ZHANG, J.H.; ZHANG, Y.; CHENG, D.; LI, S. Three new diterpenes with cytotoxic activity from the roots of *Euphorbia ebracteolata* Hayata. **Phytochemistry Letters**, v. 18, n. 1, pp. 176-179, 2016.

ZARDAVAS, D.; IRRTHUM, A.; SWANTON, C.; PICCART, M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n.7, pp. 381-394, 2015.

ZARE MIRAKABADI, A.; SHAHRAMYAR, Z.; MOROVVATI, H.; LOTFI, M.; NOURI, A. Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cell Line (HL60) by Animal's Venom Derived Peptides (ICD-85). **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 3, pp. 931-938, 2012.

ZHAN, Z.J.; WEN, Y.T.; REN, F.Y.; RAO, G.W.; SHAN, W.G.; LI, C.P. Diterpenoids and a diarylheptanoid from *Hedychium coronarium* with significant anti-angiogenic and cytotoxic activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 12, pp. 2754-2760, 2012.

ZHANG, C.; GUAN, Y.; SUN, Y.; AI, D.; GUO, Q. Tumor heterogeneity and circulating tumor cells. **Cancer Letters**, v. 374, n.1, pp. 216-223, 2016.

ZHANG, K.; LI, J.; MENG, W.; XING, H.; YANG, Y. Tanshinone IIA inhibits acute promyelocytic leukemia cell proliferation and induces their apoptosis in vivo. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 56, n. 1, pp. 46-52, 2016.

ZHANG, L.; WANG, H. Multiple Mechanisms of Anti-Cancer Effects Exerted by Astaxanthin. **Marine Drugs**, v. 13, n. 7, pp. 4310-4330, 2015.

ZHANG, L.; WANG, K.; LEI, Y.; LI, Q.; NICE, E.C.; HUANG, C. Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, n. 1, pp. 452-465, 2015.

ZHAO, S.; PU, J.X.; SUN, H.D.; WU, Y.L. Longikaurin A induces apoptosis of multiple myeloma H929 cells. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 20, n. 3, pp. 611-615, 2012.



ZHOU, D.C.; ZITTOUN, R.; MARIE, J.P. Homoharringtonine: an effective new natural product in cancer chemotherapy. **Bulletin du Cancer**, v. 82, n. 12, pp. 987-995, 1995.

ZHOU, Q.; CHEN, Y.; ZHANG, L.; ZHONG, Y.; ZHANG, Z.; WANG, R.; JIN, M. Antiproliferative effect of ZSTK474 alone or in combination with chemotherapeutic drugs on HL60 and HL60/ADR cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, pp. 39064-39076, 2017.

ZHU, K.; LIU, Q.; ZHOU, Y.; TAO, C.; ZHAO, Z.; SUN, J.; XU, H. Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives. **BMC Genomics**, v.16, n. 7, pp. 1-11, 2015.

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 *Taxus baccata*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 229, n. 1, pp. 16-20, 1996.

ZWEIFEL, M.; JAYSON, G.C.; REED, N.S.; OSBORNE, R.; HASSAN, B.; LEDERMANN, J.; SHREEVES, G. Phase II trial of combretastatin A4 phosphate, carboplatin, and paclitaxel in patients with platinum-resistant ovarian cancer. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 9, pp. 2036-2041, 2011.

Capítulo 1

Associação do fitol com atividades tóxica e citotóxica em uma perspectiva antitumoral: uma meta-análise e revisão sistemática



Ilustração de Lara Crow, adaptada do periódico *Nature Reviews Cancer* (2011).

“Fitol: esquadrinhando seu potencial antitumoral” (Alencar, M.V.O.B.)



Associação do fitol com atividades tóxica e citotóxica em uma perspectiva antitumoral: uma meta-análise e revisão sistemática

Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Muhammad Torequl Islam, Muhammad Eunus Suad Ali, José Victor de Oliveira Santos, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, João Marcelo de Castro e Sousa, Sandra Maria Mendes de Moura Dantas, Luciano da Silva Lopes, Siddhartha Kumar Mishra e Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Artigo aceito no periódico *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* (ANEXO A)

QUALIS B1 – Biotecnologia

Resumo

O fitol possui diversas atividades farmacológicas, como antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, antimutagênica, antiaterogênica, antidiabética, hipolipemiante, antiespasmódica, antiepiléptica, antinociceptiva, antioxidante, anti-inflamatória, ansiolítica, antidepressiva e imunoadjuvante. Vários estudos apontam para uma associação do fitol com implicações para apoptose e necrose, a nível celular, em diferentes modelos tumorais, no entanto, essa relação ainda permanece mal compreendida. Para esclarecer isso, realizamos uma meta-análise de estudos não-clínicos do fitol e sua associação com toxicidade/citotoxicidade, enfatizando os mecanismos de indução de apoptose e necrose, bem como sua importância na terapia oncológica. Estudos relevantes foram pesquisados sistematicamente nos bancos de dados *PubMed* e *Web of Science*. A associação entre fitol e toxicidade/citotoxicidade foi avaliada por *odds ratio* (OR) e 95% de intervalo de confiança (IC). Por fim, vinte e três estudos foram incluídos na meta-análise. Uma associação significativa entre fitol e toxicidade (OR: 1,47; IC 95% = 0,86-2,48) foi identificada entre estudos *in vivo* e citotoxicidade (OR: 1,81; IC 95% = 1,12-2,65, $p < 0,05$) em estudos *in vitro* e *ex vivo*. Em estudos *in vitro*, 24% deles indicaram que o fitol, em altas concentrações, induz apoptose por vários mecanismos; enquanto que 40% dos estudos *ex vivo* apontaram que o fitol induz a geração de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, o fitol não age como um oxidante direto, ao contrário do seu metabólito ácido fitânico. Além disso, 24% dos estudos *in vivo* também destacaram entre os mecanismos de apoptose, a expressão de proteína Bcl2 ou mutações na proteína pró-apoptótica Bax. Destes supracitados, 8% também apontaram necrose e hepatotoxicidade. No entanto, em 24% dos artigos, os mecanismos de toxicidade e citotoxicidade ainda não são bem elucidados. Este estudo confirma que a associação entre fitol e toxicidade/citotoxicidade depende da dose e/ou concentração utilizada nas condições experimentais fornecidas. Assim, ainda existem excelentes perspectivas para novas pesquisas voltadas para o uso do fitol e seu metabólito como agentes anticancerígenos.

Palavras-chave: fitol, toxicidade, citotoxicidade, apoptose, necrose.



1 INTRODUÇÃO

O fitol, FIT, [(E,7R,11R)-3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol] é um diterpenoide de cadeia lateral longa (BLANKENSHIP, 2002; GONZALEZ-BURGOS; GOMEZ-SERRANILLOS, 2012; ISLAM et al., 2015), amplamente distribuído em algas (XIAO; YUAN; LI, 2013; ISHIBASHI et al., 2014), plantas e bactérias, especialmente cianobactérias (JUDAH; BURDICK; CARROLL, 1954; HANSEN, 1980; RONTANI; VOLKMAN, 2003; VAVILIN; VERMAAS, 2007; SCHOUTEN, 2008). Algumas atividades foram atribuídas ao composto, por exemplo, imunoadjuvante (LIM et al., 2006), antimutagênica (KAGOURA; MATSUI; MOROHASHI, 1993), antimicrobiana (INOUE, 2005), antiprotzoária (BERO et al., 2013), anti-inflamatória (SILVA et al., 2014), antiaterogênica (ARNHOLD; ELMAZAR; NAU, 2002), antidiabética (ELMAZAR, 2013), hipolipemiante (TAKAHASHI et al., 2002; PETER, 2014), antiespasmódica (PONGPRAYOON et al., 1992), antiepiléptica (COSTA et al., 2012), antinociceptiva (SANTOS et al., 2013), antidepressiva (COST et al., 2011), ansiolítica (COSTA et al., 2014) e antiteratogênica (ARNHOLD; ELMAZAR; NAU, 2002).

O FIT também exibiu hepatotoxicidade em ratos, com indução de apoptose e/ou necrose (MACKIE et al., 2009), bem como atividade antitumoral em diferentes linhagens cancerosas (MCF-7, PC-3, HT-29, A-549, Hs294T e MDA-MB-231) e em ratos (WALSH, 2005; THORNBURG et al., 2006; LISKA et al., 2012; WRIGHT et al., 2012; HELLGREN, 2014). Além disso, o ácido fitânico (AF), um metabólito do FIT, demonstrou induzir estresse oxidativo em cérebro de ratos e pode ser considerado um complemento a outros agentes farmacológicos, possivelmente devido aos efeitos oxidativos, evidenciados pela diminuição da concentração de GSH e redução de citocromo c (LEIPNITZ et al., 2010). No entanto, há algumas evidências sugerindo que o metabólito AF pode induzir câncer de próstata (PRICE et al., 2010; WRIGHT et al., 2014), mas ainda não são conclusivas (HELLGREN, 2014; KATARIA et al., 2015). Os resultados de um estudo com ratos, indicaram que o FIT inibe a progressão tumoral em glândulas mamárias (LISKA et al., 2011), mas também induz autofagia e apoptose (SONG et al., 2015).

A apoptose é uma via de morte celular programada e anormalidades nesse processo podem levar a sérios problemas na homeostase dos tecidos, ocasionando doenças autoimunes, afetando a integridade genômica e promovendo carcinogênese. Em células malignas, vários fatores ou mecanismos, como as proteínas da família Bcl2, mutações em proteínas pró-apoptóticas, processos de autofagia, necrose e necroptose, erros de sinalização nuclear, vias de proteassoma e mecanismos epigenéticos estão contribuindo para a resistência à apoptose (HASSAN et al., 2014; MOHAMMAD et al., 2015).

Portanto, a indução de apoptose e inibição da proliferação celular, por diferentes mecanismos, têm sido utilizadas para estudos de fitoquímicos com atividade antitumoral (BEEVI et al., 2010). Além



desses aspectos, os fitoquímicos derivados de produtos naturais são fontes promissoras para agentes terapêuticos, especialmente na área oncológica (LIBRO et al., 2010). A terapia oncológica avançou muito, no entanto, o desenvolvimento de novas drogas ainda encontra grandes desafios, incluindo o fato da heterogeneidade genética do câncer, que conduz a múltiplas resistências (SAMADI et al., 2015).

Para fins de estudo, o termo citotoxicidade é definido como o estado tóxico para as células, enquanto a toxicidade é definida como o grau em que uma substância tóxica pode prejudicar uma célula ou organismo. A presente revisão tem como objetivo estabelecer uma associação entre FIT com suas atividades tóxica e citotóxica em estudos *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, bem como apontar alguns dos principais mecanismos de ação que favorecem a indução de apoptose e/ou necrose.

2 METODOLOGIA

A meta-análise foi realizada conforme o guia prático de meta-análise para estudos não clínicos de acordo com Sena e colaboradores (2015).

2.1 Estratégia de pesquisa

A revisão sistemática da literatura foi realizada nos bancos de dados *PubMed* e *Web of Science*, a partir de 1º de janeiro de 1966, até dezembro de 2016. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa bibliográfica foram: [*phytol*] e [*toxicity* ou *cytotoxicity* ou *antitumoral activity*].

2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Somente os estudos em língua inglesa foram considerados nesta revisão. Os estudos foram incluídos quando atendiam aos seguintes critérios: (1) desenho do estudo *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*; (2) investigação da correlação entre fitol e toxicidade ou citotoxicidade; (3) presença de tamanho da amostra nos grupos teste e controle; (4) sugestão de mecanismos que induzam apoptose e/ou necrose.



2.3 Análise estatística

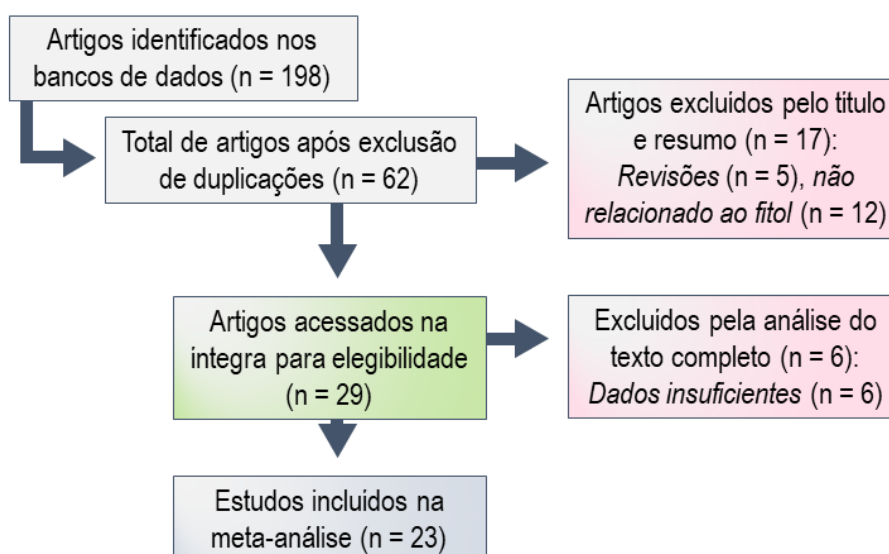
A força da associação entre FIT com toxicidade e citotoxicidade foi avaliada por *odds ratio* (OR), com 95% de intervalo de confiança (IC). Os dados foram agrupados em *forest plot* para correlações entre FIT com toxicidade e citotoxicidade, em estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Os "valores de p" relatados foram testados em duas vias. Também foi realizado o refinamento dos dados com teste de Mantel-Haenszel, considerando os modelos de estudos aleatórios (ADES; HIGGINS, 2005). Por fim, foram quantificadas as heterogeneidades entre os estudos por meio dos testes Q de Cochran e I^2 de Higgins e Thompson (2002). Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando GraphPad Prism (v. 7.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) e Review Manager (v. 5 para Windows, Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2014).

3 RESULTADOS

3.1 Identificação dos estudos

As estratégias de seleção dos estudos e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1. Os 6 artigos com insuficiência de dados foram eliminados. Vinte e nove artigos foram acessados quanto a elegibilidade. No total, 23 estudos foram qualificados e incluídos nesta meta-análise e correspondem a 5 *in vivo* e 18 estudos *ex vivo* e *in vitro*.

Figura 1. Estratégia de seleção dos estudos.

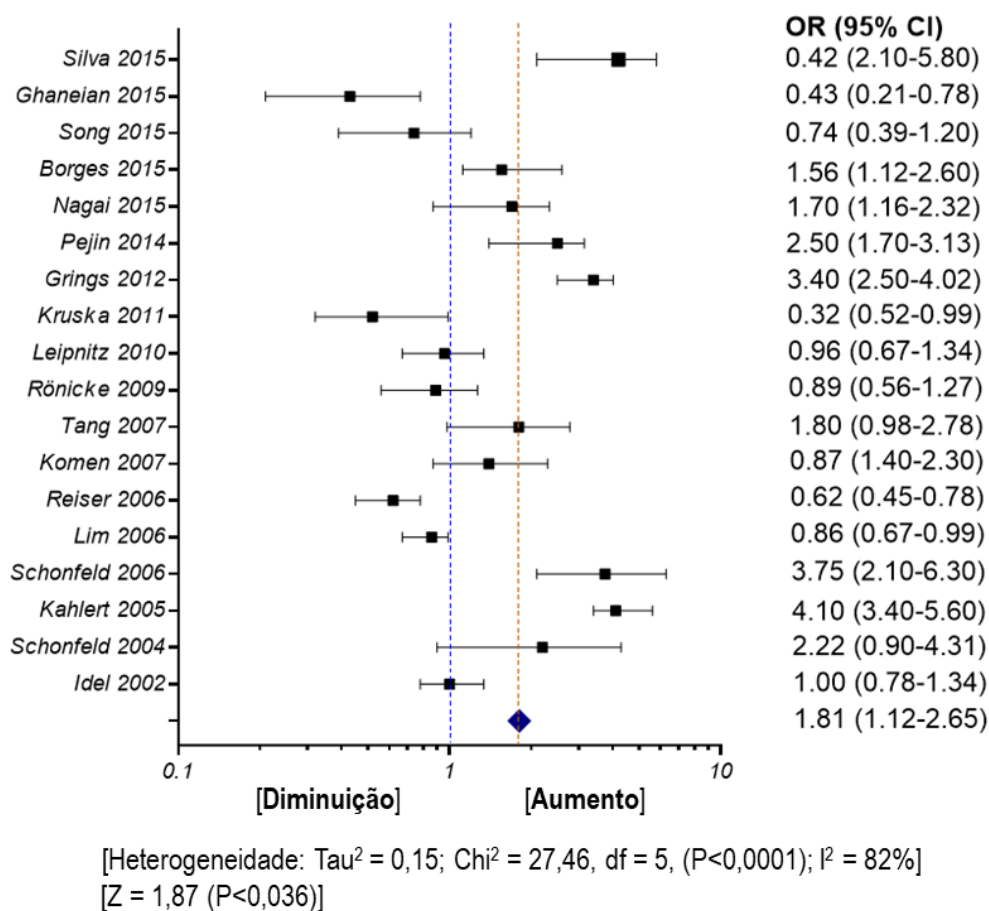




3.2 Associação entre fitol e citotoxicidade em modelos *in vitro* e *ex vivo*

Houve associação entre FIT e risco aumentado de citotoxicidade (OR: 1,81; IC 95% = 1,12-2,65, $p < 0,05$, Mantel-Haenszel – modelo de efeitos aleatórios). A citotoxicidade induzida por FIT em estudos *in vitro* e *ex vivo* foi associada a uma alta concentração durante os tratamentos, sugerindo atividade dose-dependente (Figura 2).

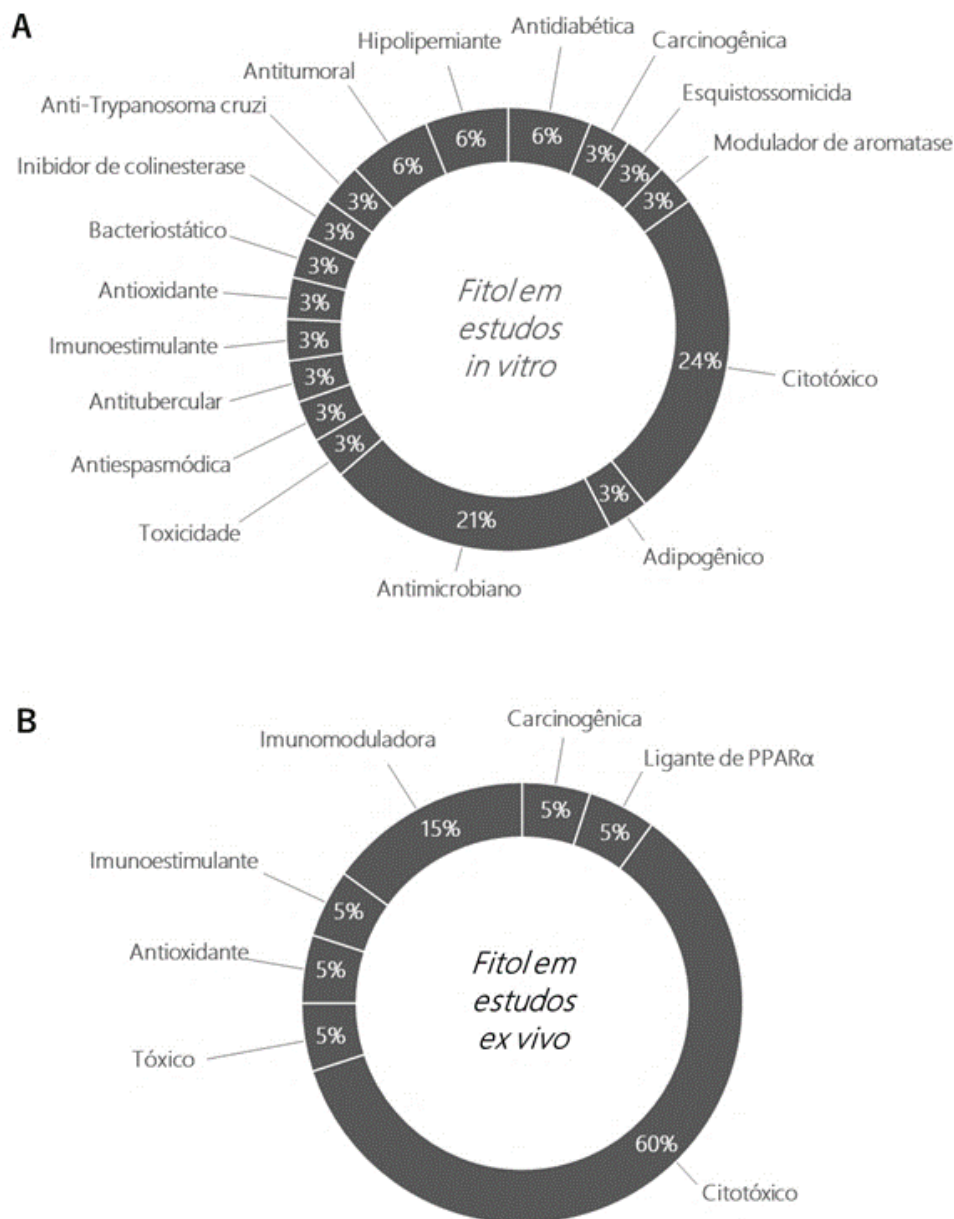
Figura 2. Forest plot da associação entre FIT e citotoxicidade em estudos *in vitro* e *ex vivo*.



A análise estratificada do FIT em evidências *in vitro*, demonstrou que as atividades mais frequentes foram citotoxicidade (24%), antimicrobiana (21%), antitumoral (6%), hipolipemiante (6%) e antidiabética (6%). Para os estudos *ex vivo*, as atividades mais frequentes foram citotoxicidade (60%) e imunomoduladora (15%) (Figura 3).



Figura 3. Atividades do FIT em estudos *in vitro* (A) e *ex vivo* (B).



Em seguida, os mecanismos de ação mais frequentes para o FIT, em estudos *in vitro*, foram analisados (Figura 4), dos quais, a ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α), correspondeu ao mais frequente (12%), semelhantemente para estudos *in vivo*, discutidos adiante. Por outro lado, para os estudos *ex vivo*, o mecanismo mais frequente para o FIT foi a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's), induzindo citotoxicidade (40%) (Figura 5).



Figura 4. Mecanismos de ação descritos para o FIT em estudos *in vitro*. **A:** remoção de radical hidroxila; **B:** promover respostas humorais efetivas e imune mediada por células. **C:** indução de depuração de bactérias. **D:** interferência com a contração de células musculares lisas vasculares. **E:** estimulação da absorção de glicose. **F:** ativação de PPAR α . **G:** geração de espécies reativas de oxigênio. **H:** inibição de p38 MAPK. **I:** lesão tegumentar. **J:** aumento da AMACR (alfa-metilacil-CoA racemase). **K:** indução de apoptose dependente de caspase. **L:** inibição de crescimento. **M:** indução de morte celular. **N:** inibidor da GAPDH tripanossomíaca. **O:** indução de anormalidade mitocondrial e morte celular. **P:** inibição do efluxo dependente de ATP. **Q:** nenhuma evidência clara do mecanismo envolvido. **R:** inibição de colinesterase. **S:** redução de motilidade flagelar.

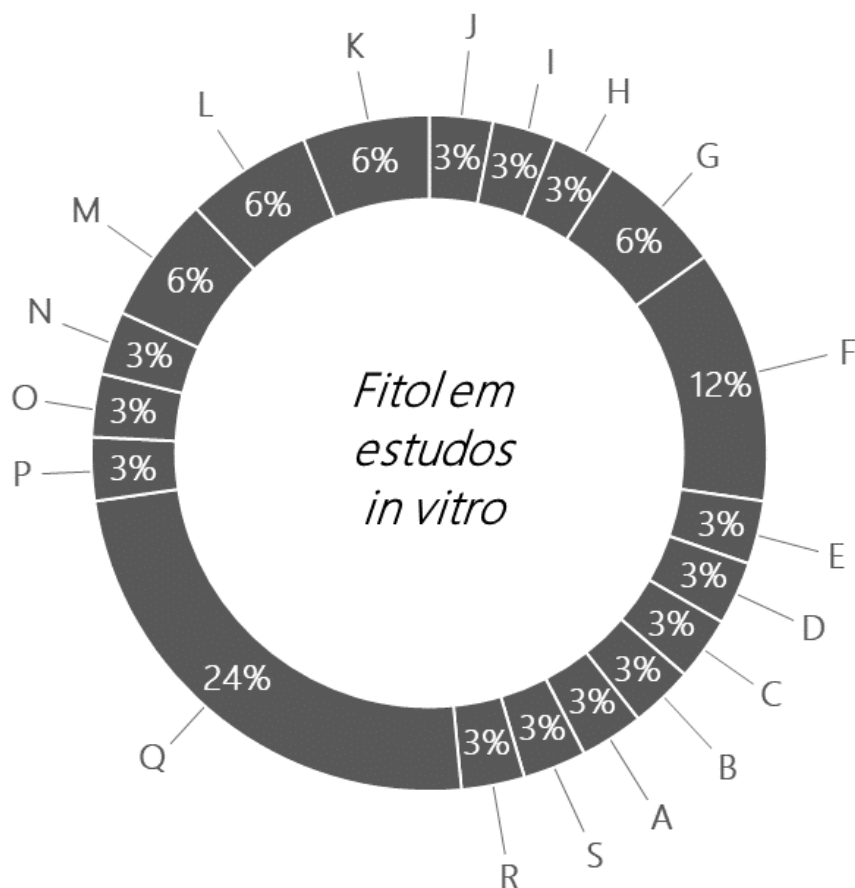
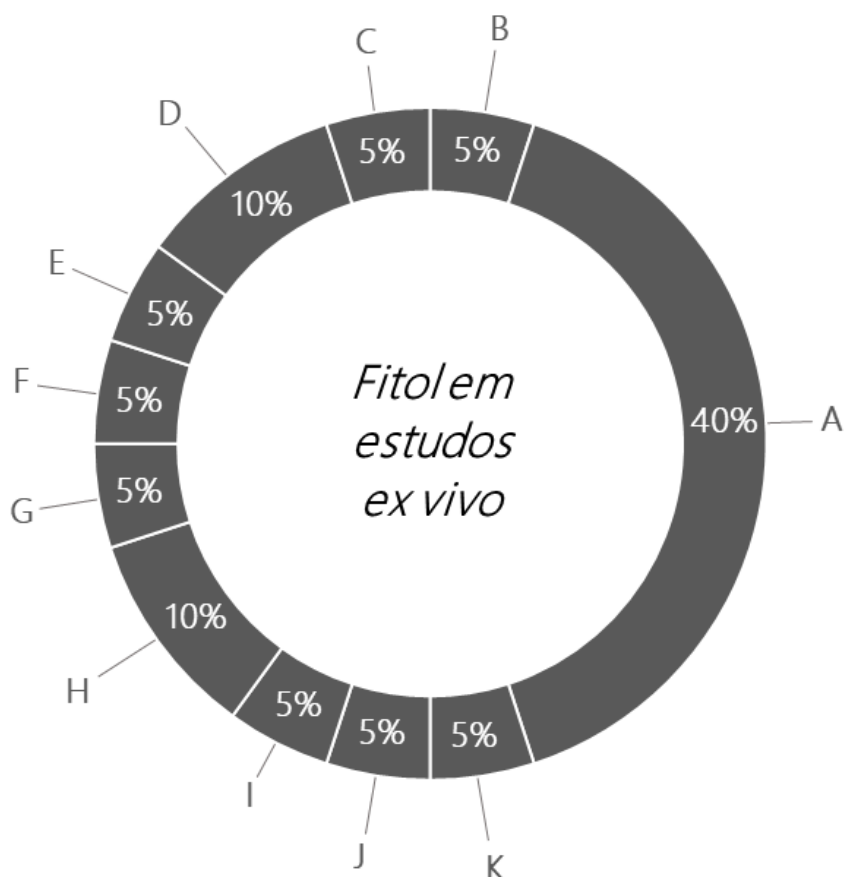




Figura 5. Mecanismos de ação descritos para o FIT em estudos *ex vivo*. **A:** geração de espécies reativas de oxigênio. **B:** ativação de PPAR α . **C:** impacto na expressão de CYP26 intestinal. **D:** produção reduzida de IFN- γ , IL-4 e IL-10. **E:** redução de radicais livres. **F:** inibidor metabólico que interrompe a homeostase mitocondrial. **G:** estimulação da absorção de glicose. **H:** liberação intracelular de Ca $^{2+}$. **I:** indução de apoptose dependente de óxido nítrico. **J:** distúrbio de energia celular e homeostase redox. **K:** redução de ATP mitocondrial.

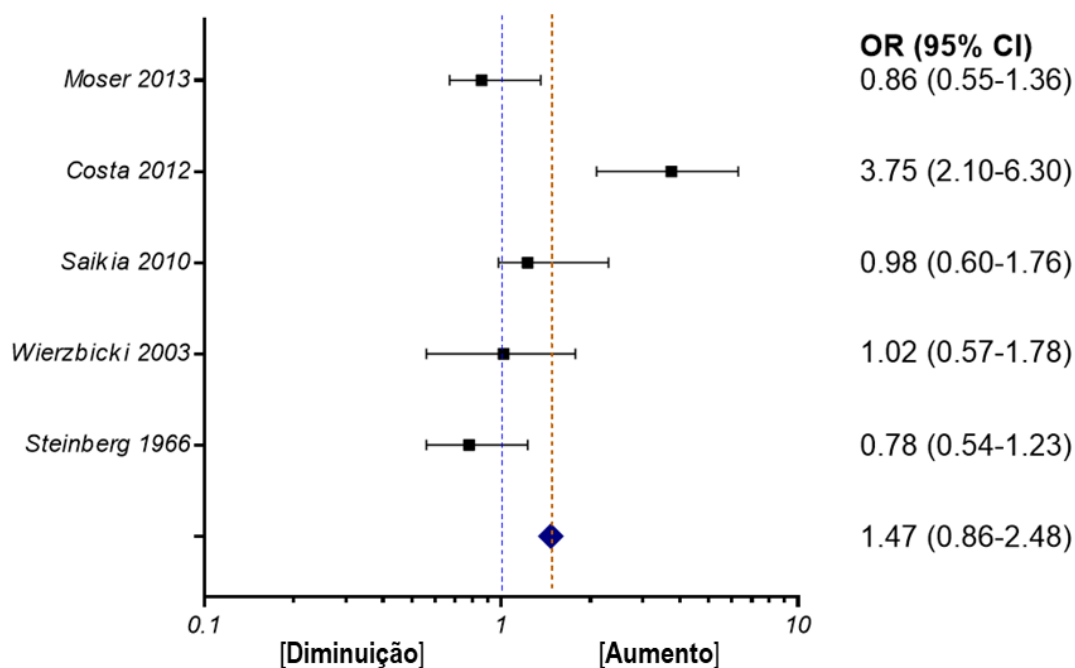


3.3 Associação entre FIT e toxicidade em estudos *in vivo*

O FIT demonstrou estar associado ao risco aumentado de toxicidade (OR: 1,47; IC 95% = 0,86-2,48, $p < 0,05$, Mantel-Haenszel – modelo de efeitos aleatórios) (Figura 6). Da mesma forma, como mencionado anteriormente, a toxicidade exibida pelo FIT em estudos *in vivo* foi associada a uma dose elevada durante os tratamentos.



Figura 6. Forest plot da associação entre FIT e toxicidade em estudos *in vivo*.

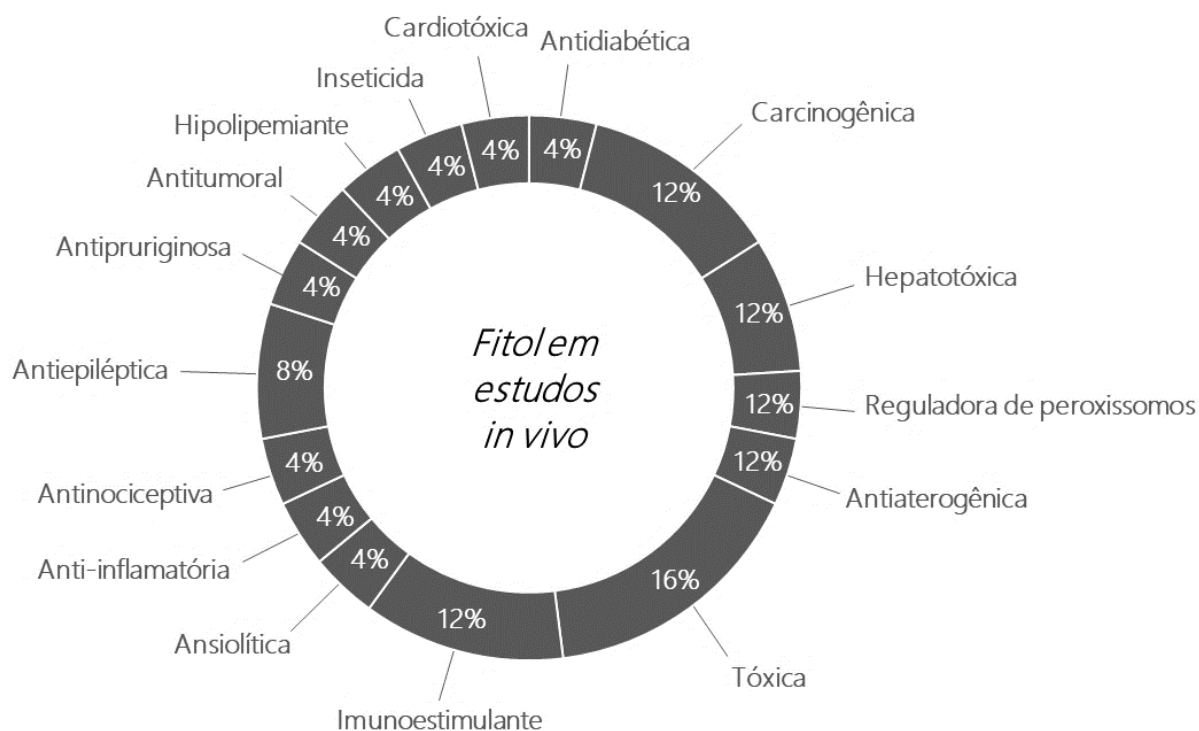


[Heterogeneidade: $\tau^2 = 0,07$; $\chi^2 = 15,36$; $df = 5$, ($P < 0,0009$); $I^2 = 67\%$]
[$Z = 0,36$ ($P < 0,045$)]

Posteriormente, os resultados da análise estratificada por atividade e mecanismo de ação envolvidos foram acessados. As atividades mais frequentes entre os diferentes estudos *in vivo* foram a toxicidade (16%), por avaliação da massa corporal e testes comportamentais, seguido de imunoestimulante (12%), antiaterogênica (12%), hepatotóxica (12%), carcinogênica (12 %) e reguladora de peroxissomos (12%) (Figura 7).



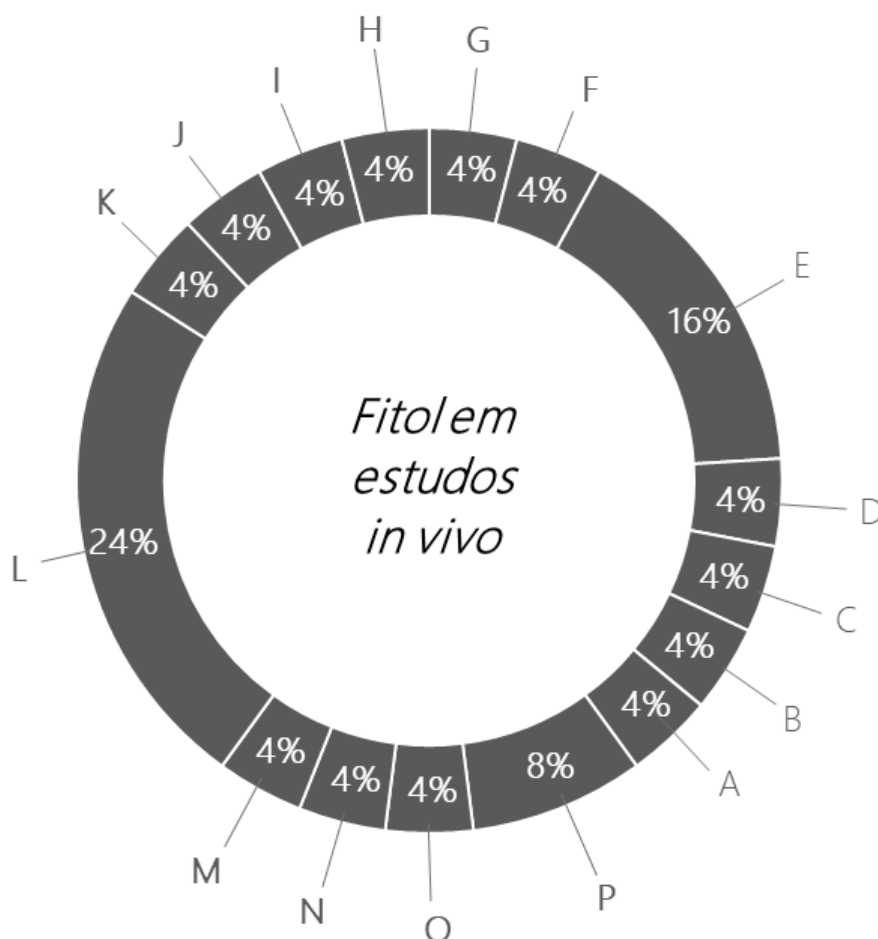
Figura 7. Atividades do FIT em estudos *in vivo*.



Além disso, em relação ao mecanismo descrito para o FIT, entre os diferentes estudos *in vivo*, destaca-se a ativação de PPAR (16%) (Figura 8), como o mais frequente.



Figura 8. Mecanismos de ação descritos para o FIT em estudos *in vivo*. **A:** promoção de respostas humorais efetivas e imune mediada por células. **B:** modulação de resposta imune por efeitos apoptóticos/necróticos. **C:** inibição do metabolismo do ácido *all-trans*-retinoico. **D:** necrose hepatocelular. **E:** ativação de PPAR α . **F:** indução de falência hepática. **G:** ativação de receptores nucleares e heterodimerização de RXR. **H:** bradicardia e distúrbios da condução de impulso intraventricular. **I:** expressão de citocinas e fatores quimiotáticos. **J:** Diminuição do volume tumoral. **K:** inibição do crescimento celular. **L:** nenhuma evidência clara do mecanismo envolvido. **M:** inibição da permeabilidade vascular e expressão de citocinas. **N:** modulação de neurotransmissores. **O:** redução nos níveis de IL-1 β , TNF- α e estresse oxidativo. **P:** interação com o sistema GABAérgico.

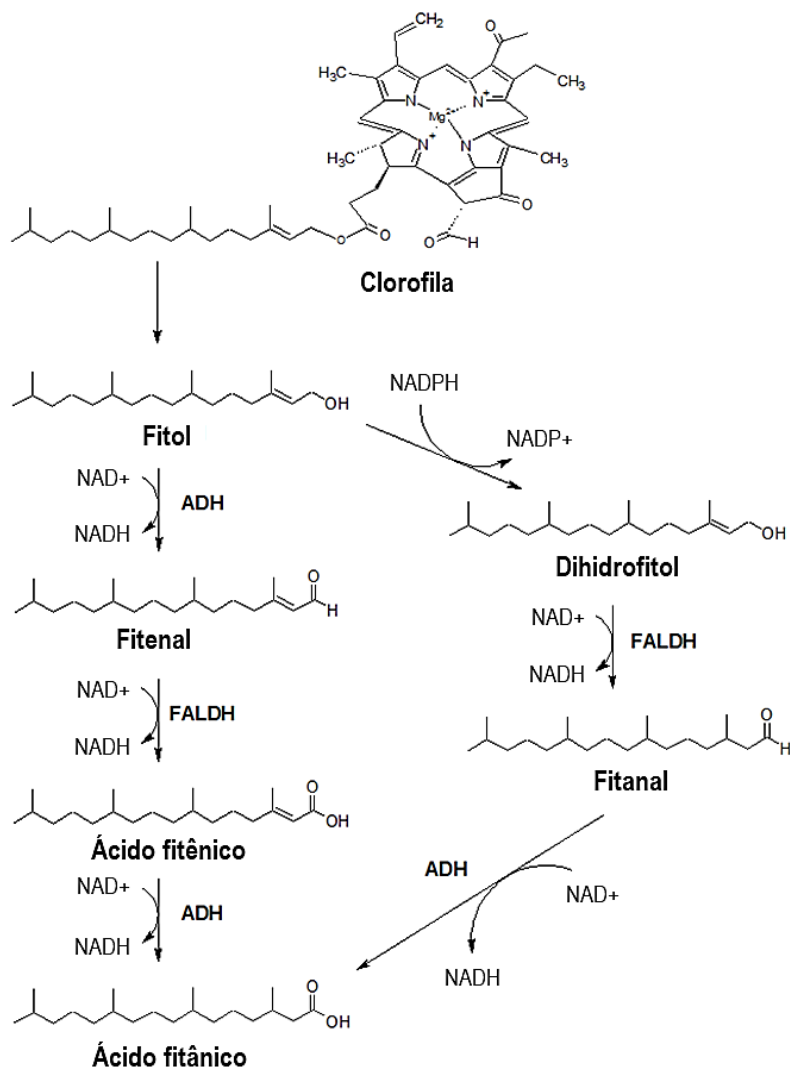


4 DISCUSSÃO

4.1 Mecanismos de toxicidade e citotoxicidade do FIT e AF em estudos *in vitro* e *ex vivo*

O FIT é produzido a partir da hidrólise da clorofila, no intestino de animais ruminantes, que por ação das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído graxo desidrogenase (FALDH), transforma-se em fitenal e ácido fitênico, respectivamente. No entanto, o FIT pode ser reduzido ao dihidrofitol e, após a oxidação na presença de FALDH, será convertido em fitanal. Finalmente, tanto o ácido fitênico, quanto o fitanal, na presença de ADH são oxidados para o AF (ISLAM et al., 2015) (Figura 9).

Figura 9. Biossíntese de ácido fitânico. ADH: álcool desidrogenase. FALDH: aldeído graxo desidrogenase. NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada. NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida. NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida.



Fonte: adaptado de Islam e colaboradores (2015).



Os estudos *in vitro*, avaliados nesta meta-análise, apontaram várias atividades para fitol com relevância para estudos de citotoxicidade (24%) e atividade antimicrobiana (21%); bem como suas propriedades antitumorais (6%) e carcinogênicas (3%). Os efeitos citotóxicos foram atribuídos a mecanismos de geração de ERO's, ativação de PPAR e caspases, inibição de ATP e ação antitumoral por indução de apoptose. Atividades semelhantes foram observadas em estudos *ex vivo*, no entanto, 40% dos estudos indicaram, indiretamente, que o FIT induz ERO's. Por outro lado, 24% dos estudos *in vitro* indicaram que os mecanismos de toxicidade e citotoxicidade ainda não são bem compreendidos. Estes mecanismos serão discutidos mais adiante.

O estresse oxidativo e a apoptose são mecanismos conhecidos para toxicidade, teratogênese e mortalidade (KUPSCO; SCHLENK, 2015). A apoptose de células T é mediada por proteínas BH3 e Noxa, que inibem a Mcl-1, podendo afetar a estabilidade entre essas proteínas e consequentemente, conduzir à apoptose. O eixo Noxa/Mcl-1 regula a susceptibilidade à apoptose sob limitação de glicose na divisão de células T, o que destaca, a condução de morte celular independentemente da geração de ERO's ou ativação do gene p38 e MAP quinase (WENSVEEN et al., 2011).

O FIT induz aumento na expressão de PPAR dependente da atividade da luciferase, em células HepG2 diretamente e, independentemente, o seu metabólito AF (GOTO et al., 2005; SCHÖNFELD; REISER, 2016). O mecanismo de necrose hepatocelular induzida por AF pode estar relacionado ao aumento de peróxido de hidrogênio, geração de ERO's, produção de intermediários tóxicos, como o ácido dicarboxílico, via indução de CYP4A, bem como alteração da função mitocondrial e acúmulo de lipídios nas membranas (KOMEN et al., 2007). O relato de que a biossíntese do colesterol atua como ponto de verificação do ciclo celular, regulando a proliferação celular (SINGH et al., 2013), favorece nossas observações e sugere um suposto mecanismo para os efeitos hipolipemiantes do FIT, associados à redução da proliferação de células cancerígenas. O controle da biossíntese de colesterol nas células está diretamente relacionado aos domínios de membranas (*raft* lipídicos), que orquestram diversos eventos de sinalização no crescimento celular.

Em estudos *in vitro*, o FIT é um agente antioxidante, no entanto, pode desempenhar eventos pró-oxidativos em células eucarióticas. Sendo um componente de óleo essencial, a atividade do FIT depende da sua concentração. Em baixas concentrações é citoprotetor, enquanto que em maior concentração, desempenha efeito citotóxico (ISLAM et al., 2016a). Facchini e colaboradores (2014) sugeriram que o FIT (10-60 μ M), diminui a atividade de SOD de forma concentração-dependente, exercendo efeito citotóxico por meio do desequilíbrio redox em células T98G e U87-MG. Além disso, em células KGN (granulosa ovariana humana), o FIT (10 μ g/mL) diminuiu a expressão de aromatase pela inibição da expressão de p38 MAPK (GOU et al., 2014).

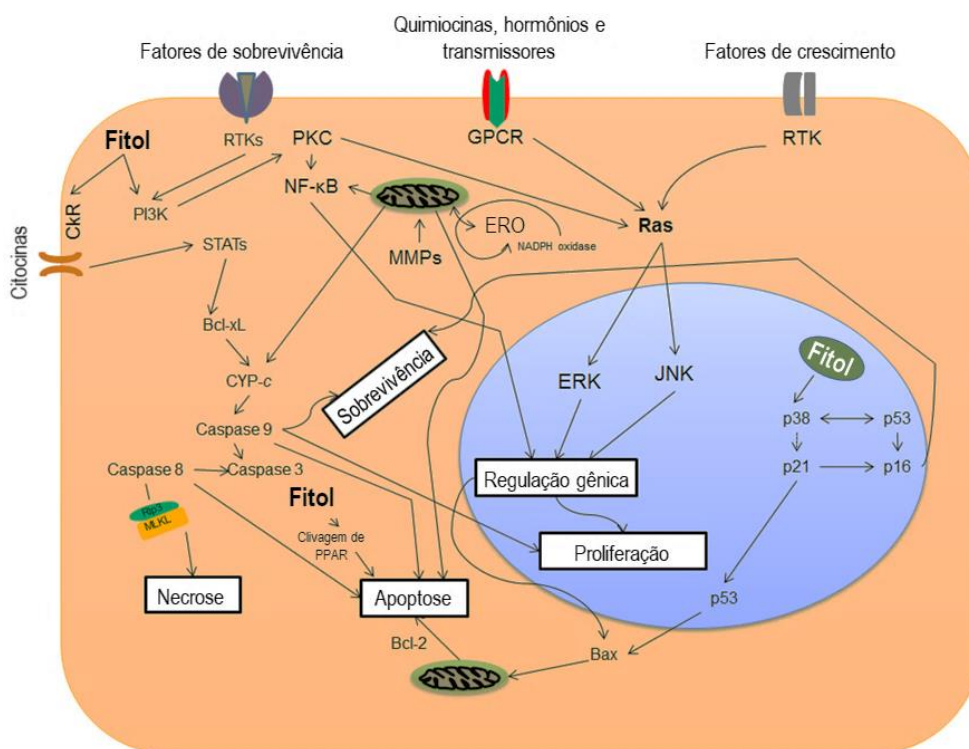


Quimicamente, o FIT tem um grupo OH em seu carbono (C1). Os compostos com grupos OH ativos, como os diterpenoides, podem eliminar microrganismos devido ao aumento da atividade citotóxica (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; SHAH; BOSCO; MIR, 2014). Por indução de OH•, é possível avaliar a capacidade oxidante das substâncias. Este mecanismo provavelmente pode ser sugerido para as atividades antimicrobianas e citotóxicas do FIT (ISLAM et al., 2015). Por sinal, este diterpenoide (62,5 µg/mL) apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *C. albicans* e *A. nigricans*. Em relatos anteriores, verificou-se que o FIT inibe o crescimento de células Molt 4B, por indução de apoptose (KOMIYA et al., 1999; HIBASAMI et al., 2002). Além disso, o estudo de Chikati (2013) sugeriu que o FIT inibia, de forma concentração-dependente, o crescimento de células MDA MB 231, juntamente com um efeito anti-invasivo. Outra evidência aponta que em células Huh7 e HepG2, o FIT (20-100 µM) exibiu efeito antitumoral, por meio de indução de apoptose via ativação de caspase-9/3 e inibição de transição epithelial-mesenquimal (EMT) (KIM et al., 2015).

A apoptose induzida por FIT, em células de adenocarcinoma gástrico (AGS), foi observada pelo aumento de células na fase mitótica sub G1, regulação negativa de Bcl-2, regulação positiva de Bax, ativação de caspases-3/9, clivagem de PARP, despolarização de membranas mitocondriais e indução de autofagia. Além disso, o FIT pode induzir citotoxicidade por geração de ERO's, bem como pelo aumento da expressão de p62 (SONG; CHO, 2015). Os mecanismos propostos que conduzem a apoptose e necrose, a partir de evidências anteriores, estão sumarizados na Figura 10.



Figura 10. Resumo dos mecanismos propostos para indução de apoptose e necrose pelo FIT, a partir de diferentes estudos. ERO: espécies reativas de oxigênio. PKC: proteína cinase C. NF- κ B: fator nuclear kappa B. RTK: receptor tirosino cinase. PI3K: fosfoinositídeo 3-cinase. CKR: receptor relacionado a citocinas. TATs: transdutor de sinal e ativador de transcrição. Bcl-xL: proteína linfoma de células B - extragrande. CYP-c: ciclofilina C. RIP-3: proteína de interação com receptor. MLKL: proteína domínio cinase de linhagem mista. PPAR: receptor ativado por proliferador de peroxissoma. Bax: proteína X associada a Bcl-2. ERK: cinases reguladas por sinal extracelular. JNK: cinases C-Jun N-terminal. MMPs: metaloproteinase de matriz. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida. GPCR: receptores acoplados a proteína G.



Diferentes fatores podem levar à apoptose no fígado, incluindo álcool, vírus, ácidos biliares tóxicos, ácidos graxos, drogas e respostas imunes por receptores de membrana, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático, permeabilização lisossômica e disfunção mitocondrial (WANG, 2014). O AF inibe a histona desacetilase (Hdac2) e induz morte celular, com efeitos citotóxicos associados a caspase-9, como observado em células neuronais (NAGAI, 2015). Também pode gerar ERO's durante a β -oxidação (TAMATANI et al., 1999). Além de induzir apoptose e necrose, o FIT possui alta hidrofobicidade, portanto, atravessa facilmente membranas celulares e mitocondriais, causando a perda de elementos essenciais para a célula, alterando o potencial de membrana, neutralizando espécies reativas, mas também podendo induzir autodestruição de estruturas celulares como proteínas, lipídios e DNA; isso reflete em citotoxicidade/genotoxicidade e disfunção mitocondrial, bem como eventos mutagênicos (ISLAM et al., 2016a).

Estudos *in vitro* revelaram que o AF pode induzir doenças peroxissomais e gerar estresse oxidativo em regiões cerebrais de ratos, sendo considerado neurotóxico (FERDINANDUSSE et al., 2008). Além disso, induz acumulação de lipídios e citotoxicidade em estudos *in vitro* com fibroblastos (ATSHAVES et al., 2002), o que pode ser explicado pela liberação de ácido dicarboxílico, um metabólito



do AF, resultante da ação de enzimas CYP4A (MACKIE et al., 2009). Entretanto, também pode aumentar a α -oxidação e levar ao estresse oxidativo com potencial para danificar o DNA (MACKIE et al., 2009). A oxidação está envolvida em vários tipos de cânceres, assim como a proliferação peroxissômica, como por exemplo, estando presente em hepatocarcinoma por meio do envolvimento da proteína PPAR α (YOUSSEF; BADR, 2011).

Os PPAR também são importantes para o tratamento de doenças metabólicas, figurando como fatores de riscos. Este grupo de biomoléculas são fatores transcricionais presentes em três isoformas, PPAR- α e PPAR- γ , envolvidos na regulação do metabolismo lipídico e homeostase da glicose e, PPAR- β/δ , que está envolvido no efeito anti-inflamatório (GONZALEZ; SHAH, 2008; MONSALVE et al., 2013). Estudos *in vitro* relataram atividades citotóxicas e antitumorais do FIT, as quais estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Efeitos citotóxicos, anticancerígenos e antitumorais atribuídos ao FIT e AF *in vitro*.

Sistema	Dose	Resultado	Referência
Citotoxicidade			
Linhagens de glioblastoma	10-60 μ M	Diminuiu a atividade de SOD (IC ₅₀ : 21,32 μ M). A citotoxicidade (30 μ M) e o equilíbrio redox podem ser primordiais para indução de morte nas células T98G e U87-MG, após o tratamento.	Facchini et al. (2014)
Células T98G e U87-MG	10-60 μ M	Diminuiu a atividade de SOD de forma concentração dependente, exercendo efeito citotóxico por meio do de desequilíbrio redox.	Facchini et al. (2014)
Células KGN (granulosa ovariana)	10 μ g/mL	Redução da expressão de aromatase em células KGN, bem como inibição de p38 MAPK (IC ₅₀ : 1 μ M).	Guo et al. (2014)
Células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS)	0-200 μ M/24 h de tratamento	Atividade antiproliferativa: autofagia com aumento da formação de vacúolos e agregados GFP-LC3.	Song et al. (2015)
Células Molt 4B	-	Indução de apoptose.	Komiya et al. (1999) Hibasami et al. (2002)
Astrócitos	50 mM	O ácido fitânico induziu morte celular por apoptose via mitocondrial.	Schonfeld e Reiser (2006)
Células N2A de neuroblastoma camundongos	10 μ M	Anormalidade mitocondrial induzida pelo ácido fitânico e morte celular por ativação de Hdac2,3.	Nagai (2015)
Células cerebrais de ratos	10-50 μ M	Estresse oxidativo induzido pelo ácido fitânico.	Ferdinandusse et al. (2008)
Fibroblastos de ratos	-	Acúmulo de lipídeos induzido pelo ácido fitânico e citotoxicidade.	Atshaves et al. (2002)
Atividade antitumoral e anticancerígena			



Leucemia linfóide, células Molt 4B	-	Inibição do crescimento das células Molt 4B devido à indução de apoptose.	Komiya et al. (1999) Hibasami et al. (2002)
Pele de camundongos ICR fêmeas	100 mg (topicamente; 16 semanas)	Fraca atividade carcinogênica.	Kagoura, Matsui e Morohashi (1993)
Ratas fêmeas Sprague-Dawley	0,5 a 7 µg/kg (i.p.) por semana	Inibição da progressão tumoral induzida por NMU em glândula mamária, juntamente com diminuição da carga e volume tumoral.	Liška et al. (2011)
Linhagem tumoral de mama (MDA MB 231)	-	Inibição dose-dependente (1 µM), juntamente com efeito anti-invasivo (2 µM).	Chikati et al. (2013)
Células Huh7 e HepG2 (hepatocarcinoma)	0, 20, 40, 80 e 100 µM/24 h de tratamento	Atividade antitumoral por indução de apoptose via caspase-9/3 e inibição da EMT em células de carcinoma hepatocelular.	Kim et al. (2015)

Legenda: i.p.: intraperitoneal; MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos; Hdac2,3: histona deacetilase; NMU: n-metil-n-nitrosourea; EMT: transição epitélio-mesênquimal.

4.2 Mecanismos de toxicidade e citotoxicidade do FIT e AF em estudos *in vivo*

Esta meta-análise apontou que o FIT está associado a atividades tóxicas *in vitro* e *ex vivo*, o que também foi verificado em estudos *in vivo*. O FIT, em altas doses, *in vivo*, induziu toxicidade (16% dos estudos) e hepatotoxicidade (12%), regulou atividades de peroxissomas e possuiu atividade imunoestimulante (12%). Os mecanismos apontados *in vivo* foram semelhantes aos observados em estudos *in vitro*. Entre estes, a ativação de proteínas PPAR (16%), indução de apoptose (24%) e necrose (8%), bem como a redução de interleucinas, por estresse oxidativo (4%). Estes mecanismos serão discutidos mais adiante.

Há relato de toxicidade do FIT em estudo com camundongos (CHOWDHURY; GHOSH, 2012). A toxicidade atribuída ao diterpenoide foi observada, de forma dose-dependente, na pele do animal (GHANEIAN et al., 2015), e demonstrou induzir hepatotoxicidade com lesões hepáticas, ruptura do cordão hepático e pequenas áreas multifocais de necrose em hepatócitos, com infiltração precoce de células inflamatórias (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010). O FIT, presente na dieta dos animais, foi associado à necrose hepatocelular e ao aumento das enzimas hepáticas (ALT e AST) (ISLAM et al., 2016b). Em um estudo *in vivo*, o FIT (5, 50 e 300 mg/kg [v.o.]), administrado durante 7 dias em camundongos, não causou alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e fisiopatológicos (SAIKIA et al., 2010). No entanto, nas doses de 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL, o FIT (tempo-dependente) demonstrou toxicidade considerável em camundongos (GHANEIAN et al., 2015). Em outro estudo, o diterpenoide (0,5 e 1,0% [v.o.]) administrado em camundongos C57BL/6NCR 129/SvJ, exibiu hepatotoxicidade com necrose celular, onde as fêmeas foram mais suscetíveis a ele, com uma expressão hepática inferior da proteína carreadora de esteróides x (SCP-x) (MACKIE et al., 2009).



Por outro lado, em ratos *Sprague-Dawley* machos, houve diminuição da atividade de ACMSD e expressão de mRNA, de forma dose-dependente, no fígado e em hepatócitos primários de ratos. A expressão de mRNA de ACO (um gene alvo de PPAR α) foi maior nos grupos tratados com baixa dose de FIT (MATSUDA et al., 2013). Outro estudo indicou que o FIT (5-40 mg/kg [i.p.]), em camundongos BALB/c, reduziu (tempo-dependente) várias quimiocinas e citocinas (IL-6, MCP-1 e MIP-1), implicando em mobilização e ativação de neutrófilos e monócitos, liberação de quimioatratantes de células B, ativação de quimiocinas de células T (TCA), IL-4, IL-12 e TIMP-1, bem como aumento da expressão de genes como NLRP3 (AACHOUI et al., 2011).

O estudo de Aachoui e colaboradores (2011), demonstrou que o FIT (5-40 mg/kg [i.p.]), aumentou significativamente as respostas de anticorpos IgG1 e IgG2 α , portanto, modulando a resposta imune em células tumorais alvo em C57Bl/6 e BALB/c. Além disso, tanto o FIT, como o AF (500 mg/kg [v.o.]), reduziram o efeito teratogênico induzido por retinol em camundongos fêmeas (ARNHOLD; ELMAZAR; NAU, 2002). O FIT também reduziu estresse oxidativo e atenuou a resposta inflamatória, por meio da inibição da migração de neutrófilos e redução nos níveis de IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-17A e TNF- α , em camundongos albinos (SILVA et al., 2014; NAKANISHI et al., 2016).

Por outro lado, o AF (50 mM), em cérebro de ratos, demonstrou induzir apoptose via disfunção mitocondrial (SCHONFELD; REISER, 2006). Em outro estudo, observou-se que o AF (10 mM), em células N2A (neuroblastoma de ratos) induziu anormalidade mitocondrial e morte celular por ativação de histona deacetilase (NAGAI, 2015). Além disso, verificou-se também aumento dos níveis de TBARS e indução de danos oxidativos em proteínas, tanto no cerebelo, quanto no córtex cerebral de ratos *Wistar* machos, acompanhado de uma redução significativa do conteúdo de GSH (LEIPNITZ et al., 2010). No entanto, o estudo de Nakanishi e colaboradores (2016), sugeriu que o AF, em camundongos, reduziu significativamente os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17A.

Curiosamente, o FIT (100 mg), quando aplicado topicamente durante 16 semanas na pele de camundongos fêmeas, induziu fraca atividade carcinogênica (KAGOURA; MATSUI; MOROHASHI, 1993). Contrariamente, o diterpenoide (0,5 a 7 μ g/kg (i.p./semana) inibiu a progressão tumoral, induzida por n-metil-n-nitrosourea, juntamente com a diminuição da carga e do volume do tumor em glândulas mamárias de ratas *Sprague-Dawley* (LISKA et al., 2011). O FIT pode ser convertido em AF, que por sua vez, pode se ligar a fatores de transcrição, ativando receptores PPAR α e induzir expressão de genes que codificam enzimas do metabolismo de ácidos graxos, em peroxissomos e mitocôndrias. Nos estudos com ratos, propõe-se que ele possa aumentar a expressão de catalases e indução de hipertrofia hepatocelular e necrose.

Não obstante, em um estudo, o FIT apresentou atividade antiproliferativa, em que a morte de células por autofagia foi caracterizada pelo aumento do número de organelas vacuolizadas e formação



de agregação GFP-LC3 (SONG et al., 2015). Como potente inibidor de aromatase, o FIT diminuiu a expressão de aromatase em células da granulosa humana via inibição de p38 MAPK; este efeito pode ser importante para a prevenção e tratamento de cânceres dependentes de estrogênio (GOU et al., 2014). Vários estudos *in vivo* com FIT e suas atividades tóxica, citotóxica, imunomoduladora e imunoestimulante estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Atividades tóxica, citotóxica, imunomoduladora e imunoestimulante atribuídas ao FIT e AF em estudos *in vivo*.

Sistema	Dose	Resultado	Referência
Toxicidade			
Camundongos (Swiss) albinos	5, 50 e 300 mg/kg (v.o.), durante 7 dias	Alterações bioquímicas e fisiopatológicas.	Saikia et al. (2010)
Camundongos (Swiss) albinos	-	Hepatotoxicidade	McGinty et al. (2010)
Camundongos (Swiss) albinos	-	Necrose hepatocelular e aumento das enzimas hepáticas (ALT e AST)	Islam et al. (2016b)
Camundongos (Swiss) albinos	62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL	Toxicidade tempo-dependente	Ghaneian et al. (2015)
Citotoxicidade			
Camundongos C57BL/6NCR 129/SvJ	0,5 e 1,0% (v.o.)	Necrose hepatocelular, padrão incomum de lesão hepatotóxica, maior susceptibilidade de camundongos fêmeas.	Mackie et al. (2009)
Ratos Sprague-Dawley machos	0,5%, 1% ou 2% (v.o.), durante 7 dias	Diminuição da atividade de ACMSD e expressão de RNAm, de forma dose-dependente em fígado. Expressão de RNAm de ACO (gene alvo de PPARα) foi maior nos grupos tratados com baixa dose de FIT. Aumento do nível de NAD no sangue por supressão da expressão de RNAm de ACMSD no fígado dos animais.	Matsuda et al. (2013)
Atividade imunomoduladora e imunoestimulante			
Camundongos BALB/c	5-40 mg/kg (i.p.)	Mobilização e ativação de neutrófilos e monócitos, liberação de quimioatratantes BLC de linfócitos B, quimiocinas TCA de linfócitos, IL-4, IL-12 e TIMP-1, bem como expressão aumentada de genes NLRP, incluindo NLRP3.	Aachoui et al. (2011a)
Camundongos C57Bl/6 e BALB/c	5-40 mg/kg (i.p.)	Aumento da resposta de anticorpos IgG1 e IgG2α específicas; modulação da resposta imune por meio de efeitos apoptóticos/necróticos em células tumorais alvo.	Aachoui et al. (2011b)
Camundongos	7,5, 25, 50 e 75 mg/kg (v.o.)	Atenuação da resposta inflamatória por inibição da migração de neutrófilos causada pela	Silva et al. (2014)



		redução nos níveis de IL-1 β e TNF- α , bem como estresse oxidativo.	
Camundongos C57BL/6 fêmeas	3, 10 e 30 μ M	Redução significativa de IFN- γ , IL-4 e IL-10, por todas as substâncias de teste e IL-17 por FIT e AF.	Nakanishi et al. (2016)

Legenda: IL: interleucina; IFN: interferon; FIT: fitol; AF: ácido fitânico; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; ACMSD: aminocarboximuconato semialdeído descarboxilase; NAD: niacina adenina dinucleotídeo; PPAR: receptor ativado por proliferador de peroxissoma; IgG: imunoglobulina; NLRP: proteína receptora tipo NOD.

5 CONCLUSÃO

Este estudo apontou a associação entre FIT e toxicidade/citotoxicidade, em estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, bem como alguns dos possíveis mecanismos de importância para a indução de apoptose e/ou necrose. Apesar das controvérsias quanto as doses e/ou concentrações e via de administração, observaram-se efeitos tóxicos e citotóxicos em doses/concentrações mais elevadas. Estudos *in vivo*, realizados principalmente em ratos e camundongos, demonstraram resultados similares para os mecanismos observados em estudos *in vitro* e *ex vivo*. No entanto, 24% dos artigos analisados indicaram que os mecanismos de toxicidade e citotoxicidade ainda precisam ser melhor compreendidos. Em relação à indução de apoptose, o FIT e AF podem afetar o equilíbrio da proteína Bcl2, ativar o gene p38, alterar a homeostase de Ca²⁺, induzir disfunção mitocondrial, ativar caspases, alterar o potencial de membrana, induzir a redução de interleucinas, inibir aromatase e induzir a geração de ERO's. Os mecanismos relatados para o FIT são importantes para a ação antitumoral. Estudos avançados, especialmente em células tumorais humanas e modelos animais, com diferentes tipos de câncer, são necessários para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas com fitol para terapias oncológicas.

REFERÊNCIAS

- AACHOUI, Y.; CHOWDHURY, R.R.; FITCH, R.W.; GHOSH, S.K. Molecular signatures of phytol-derived immunostimulants in the context of chemokine–cytokine microenvironment and enhanced immune response. **Cellular Immunology**, v. 271, p. 227-238, 2011a.
- AACHOUI, Y.; SCHULTE, M.L.; FITCH, R.W.; GHOSH, S.K. Synthetic adjuvants for vaccine formulations: Evaluation of new phytol derivatives in induction and persistence of specific immune response. **Cellular Immunology**, v. 271, p. 308-318, 2011b.
- ADES, A.E.; LU, G.; HIGGINS, J.P. The interpretation of random-effects meta-analysis in decision models. **Medical Decision Making**, v. 25, n. 6, p. 646-654, 2005.
- ARNHOLD, T.; ELMAZAR, M.M.A.; NAU, H. Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-transretinoic acid. **Toxicological Sciences**, v. 66, p. 274-282, 2002.



- ATSHAVES, B.; STOREY, S.; PETRESCU, A.; GREENBERG, C.; LYUKSYUTOVA, O.; SMITH, R.; SCHROEDER, F. Expression of fatty acid binding proteins inhibits lipid accumulation and alters toxicity in I cell fibroblasts. **Cell Physiology**, v. 283, p. C688-C703, 2002.
- BEEVI, S.; MANGAMOORI, L.; SUBATHRA, M.; EDULA, J. Hexane extract of raphanus sativus l. roots inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cancer cells by modulating genes related to apoptotic pathway. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, p. 200-209, 2010.
- BERO, J.; BEAUFAY, C.; HANNAERT, V.; HÉRENT, M.F.; MICHELS, P.A.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antitrypanosomal compounds from the essential oil and extracts of Keetia leucantha leaves with inhibitor activity on Trypanosoma brucei glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3-4, p. 270-274, 2013.
- BLANKENSHIP, R.E. Molecular mechanisms of photosynthesis. **Blackwell Scientif**, 2002.
- CHIKATI, R. Molecular evaluation of mase from aspergillus niger and phytol of nymphaea pubescens as cytoskeletal targeting elements in cancer. **Epidemiology**, Holiday Inn, Ormaldo-FL, USA, 2013.
- CHOWDHURY, R.R.; GHOSH, S.K. Phytol-derived novel isoprenoid immunostimulants. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 49, 2012.
- COSTA, J.P.; COSTA, D.A.; ALMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M.; SOUSA, D.P.; FORTES, A.C. et al. Applications of phytol in pharmaceutical formulations anxiolytic and antidepressant properties. BRPI1106397, 2011.
- COSTA, J.P.; DE OLIVEIRA, G.A.L.; DE ALMEIDA, A.A.C.; ISLAM, M.T.; DE SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, p. 34-42, 2014.
- COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; DE SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R.M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**, v. 523, p. 115-118, 2012.
- ELMAZAR, M.M.; EL-ABHAR, H.S.; SCHAAALAN, M.F.; FARAG, N.A. Phytol/phytanic acid and insulin resistance: potential role of phytanic acid proven by docking simulation and modulation of biochemical alterations. **PLoS One**, v. 8, 2013.
- FACCHINI, G.; IGNARRO, R.S.; CASTILHO, R.F.; ROGERIO, F. Evaluation of redox balance in glioblastoma cell lines after exposition to retinol or phytol. **Brain Pathology**, v. 24, p. 44-45, 2014.
- FERDINANDUSSE, S.; ZOMER, AW.; KOMEN, JC.; VAN DEN BRINK CE.; THANOS, M.; HAMERS, F.P. et al. Ataxia with loss of Purkinje cells in a mouse model for Refsum disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 46, p. 17712-17717, 2008.
- GHANEIAN, M.T.; EHRAPOUSH, M.H.; JEBALI, A.; HEKMATI MOGHADDAM, S.H.; MAHMOUDI, M. Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. **Environmental Health Engineering And Management Journal**, v. 2, n.1, p. 13-16, 2015.
- GONZALEZ, F.J.; SHAH, Y.M. PPAR-alpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. **Toxicology**, v. 246, p. 2-8, 2008.
- GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M.P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5319-5341, 2012.
- GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KATO, S.; EGAWA, K.; EBISU, S.; MORIYAMA, T.; FUSHIKI, T.; KAWADA, T. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPARalpha-expressing HepG2 hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 2, p. 440-445, 2005.



- GUO, J.; YUAN, Y.; LU, D.; DU, B.; XIONG, L.; SHI, J. et al. Two natural products, trans-phytol and (22e)-ergosta-6,9,22-triene-3 β ,5 α ,8 α -triol, inhibit the biosynthesis of estrogen in human ovarian granulosa cells by aromatase (CYP19). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 279, p. 23-32, 2014.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.
- HANSEN, R.P. Phytol: its metabolic products and their distribution. A review. **The New Zealand Journal of Science and Technology**, v. 23, p. 259-275, 1980.
- HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, 150845, 2014.
- HELLGREN, L.I. Phytanic acidean overlooked bioactive fatty acid in dairy fat? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1190, p. 42-49, 2014.
- HIBASAMI, H.; KYOHKON, M.; OWAKI, S.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; OHNISHI, K.; et al. Diol- and triol-types of phytol induce apoptosis in lymphoid leukemia Molt 4B cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 10, p. 555-559, 2002.
- HIGGINS, J.P.; THOMPSON, S.G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. **Statistics in Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1539-1558, 2002.
- INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; et al. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1770-1774, 2005.
- ISHIBASHI, Y.; NAGAMATSU, Y.; MIYAMOTO, T.; MATSUNAGA, N.; OKINO, N.; YAMAGUCHI, K.; ITO, M. A novel ether-linked phytol-containing digalactosylglycerolipid in the marine green alga, *Ulva pertusa*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 452, p. 873-880, 2014.
- ISLAM, M.; STRECK, L.; CORREIA JARDIM PAZ, M.; DE CASTRO E SOUSA, J.; OLIVEIRA BARROS DE ALENCAR, M.; OLIVEIRA FERREIRA DA MATA, A.M. et al., Preparation of phytol-loaded nanoemulsion and screening for antioxidant capacity. **International Archives of Medicine**, v. 9, n. 70, p. 1-15, 2016a.
- ISLAM, M.T.; ALENCAR, M.V.O.B.; MACHADO, K.C.; MACHADO, K.C.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; SOUSA, D.P.; et al. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 60-73, 2015.
- ISLAM, M.T.; ALI, E.S.; DE CARVALHO, R.M.; PAZ, M.F.C.J.P.; BRAGA, B.L.; DE LIMA, R.M.T. et al. Phytanic acid, a daily consumed chlorophyll-yielded phytol biometabolite: a comprehensive revision. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 48, p. 1025-1033, 2016b.
- JUDAH, M.A.; BURDICK, E.M.; CARROLL, R.G. Chlorophyll by solvent extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 2262-2271, 1954.
- KAGOURA, M.; MATSUI, C.; MOROHASHI, M. Carcinogenicity study of phytol (3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) in ICR mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, p. 460, 1993.
- KATARIA, Y.; WRIGHT, M.; DEATON, R.J.; RUETER, E.E.; RYBICKI, B.A.; MOSER, A.B.; ANANTHANAYANAN, V.; GANN, P.H. Dietary influences on tissue concentrations of phytanic acid and AMACR expression in the benign human prostate. **Prostate**, v. 75, p. 200-210, 2015.



- Kim, C.W.; Lee, H.J.; Jung, J.H.; Kim, Y.H.; Jung, D.B.; Sohn, E.J. et al. Activation of caspase-9/3 and inhibition of epithelial mesenchymal transition are critically involved in antitumor effect of phytol in hepatocellular carcinoma cells. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, p. 1026-31, 2015.
- KOMEN, J.; DISTELMAIER, F.; KOOPMAN, W.; WANDERS, R.; SMEITINK, J.; WILLEMS, P. Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 3271-3281, 2007.
- KOMIYA, T.; KYOHKON, M.; OHWAKI, S.; ETO, J.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K. et al. Phytol induces programmed cell death in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 4, n. 4, p. 377-80, 1999.
- KUPSCO, A.; SCHLENK, D. Oxidative stress, unfolded protein response, and apoptosis in developmental toxicity. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 317, p. 1-66, 2015.
- LEIPNITZ, G.; AMARAL, AU.; ZANATTA, A.; SEMINOTTI, B.; FERNANDES, CG.; KNEBEL, LA.; VARGAS, CR.; WAJNER M. Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats. **Life Sciences**, v. 87, n. 9-10, p. 275-280, 2010.
- LIBRO, R.; GIACOPPO, S.; SOUNDARA RAJAN, T.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. Natural phytochemicals in the treatment and prevention of dementia: an overview. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 518, 2016.
- LIM, S.Y.; BAUERMEISTER, A.; KJONAAS, R.A.; GHOSH, S.K. Phytol-based novel adjuvants in vaccine formulation: 2. Assessment of efficacy in the induction of protective immune responses to lethal bacterial infections in mice. **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**, v. 4, p. 5, 2006.
- LISKA, J.; MACEJOVA, D.; ONDKOVA, S.; BRTKO, J. Morphology of 1-methyl-1- nitrosourea induced rat mammary tumours after treatment with precursor of phytanic acid or its combination with vitamin D analogue. **Endocrine Regulations**, v. 46, p. 21-26, 2012.
- LÍŠKA, J.; ONDKOVÁ, S.; MACEJOVÁ, D.; BRTKO, J. Histological evaluation of rat mammary tumours after treatment with retinoic acid analogues — phytol, ttnpb and vitamin d3 analogue seocalcitol. **Biologia**, v. 66, n.2, p. 365-369, 2011.
- MACKIE, J.; ATSHAVES, B.; PAYNE, H.; MCINTOSH, A.; SCHROEDER, F.; KIER, A. Phytol-induced hepatotoxicity in mice. **Toxicologic Pathology**, v. 37, p. 201-208, 2009.
- MATSUDA, H.; GOMI, R.T.; HIRAI, S.; EGASHIRA, Y. Effect of dietary phytol on the expression of alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase, a key enzyme of tryptophan-niacin metabolism, in rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, p. 1416-1419, 2013.
- MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Review fragrance material review on phytol. **Food Chemical Manufacturer**, v. 48, p. 59-63, 2010.
- MOHAMMAD, R.; MUQBIL, I.; LOWE, L.; YEDJOU, C.; HSU, H.; LIN, L. et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S78-S103, 2015.
- MONSALVE, F.A.; PYARASANI, R.D.; DELGADO-LOPEZ, F.; MOORE-CARRASCO, R. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.
- NAGAI, K. Phytanic Acid Induces Neuro2a Cell Death Via Histone Deacetylase Activation and Mitochondrial Dysfunction. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 48, p. 33-39, 2015.



- NAKANISHI, T.; ANRAKU, M.; SUZUKI, R.; KONO, T.; ERICKSON, L.; KAWAHARA, S. Novel immunomodulatory effects of phytanic acid and its related substances in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 283-289, 2016.
- PETER, O. Phytol as a Cholesterol Lowering Agent. US20140073703, 2014.
- PONGPRAYOON, U.; BAECKSTRÖM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTRÖM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-PHY isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Medica**, v. 58, p. 19-21, 1992.
- PRICE, A.J.; ALLEN, N.E.; APPLEBY, P.N.; CROWE, F.L.; JENAB, M.; RINALDI, S.; et al. Plasma phytanic acid concentration and risk of prostate cancer: results from the European prospective investigation into cancer and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, p. 1769-1776, 2010.
- RONTANI, J.F.; VOLKMAN, J.K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 1-35, 2003.
- ROZMAN, R.; MENON, J.M. Effects of retinol and phytol on oxidative stress during anuran metamorphosis and regeneration. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, p. 1187, 2005.
- SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA, D.; OJHA, S.; KUMAR, J.K.; CHANOTIYA, C.S.; et al. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 508-512, 2010.
- SAMADI, A.; BILSLAND, A.; GEORGAKILAS, A.; AMEDEI, A.; AMIN, A.; BISHAYEE, A. et al. A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S151-S184, 2015.
- SANTOS, C.C.; SALVADORI, M.S.; MOTA, V.G.; COSTA, L.M.; DE ALMEIDA, A.A.; DE OLIVEIRA, G.A. et al. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. **Journal of Neuroscience**, v. 2013, 949452, 2013.
- SCHÖNFELD, P.; REISER, G. Brain lipotoxicity of phytanic acid and very long-chain fatty acids. harmful cellular/mitochondrial activities in refsum disease and x-linked adrenoleukodystrophy. **Aging and Disease**, v. 7, n. 2, p. 136, 2016.
- SCHONFELD, P.; REISER, G. Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 7136-7142, 2006.
- SCHOUTEN, S.; OZDIREKCAN, S.; VAN DER MEER, M.T.J.; BLOKKER, P.; BAAS, M.; HAYES, J.M.; DAMSTE, J.S.S. Evidence for substantial intramolecular heterogeneity in the stable carbon isotopic composition of phytol in photoautotrophic organisms. **Organic Geochemistry**, v. 39, p. 135-146, 2008.
- SENA, E.S.; CURRIE, G.L.; MCCANN, S.K.; MACLEOD, M.R.; HOWELLS, D.W. Systematic reviews and meta-analysis of preclinical studies: why perform them and how to appraise them critically. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 34, n. 5, p. 737-742, 2014.
- SHAH, M.A.; BOSCO, S.J.D.; MIR, S.A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v. 98, p. 21-33, 2014.
- SILVA, R.O.; SOUSA, F.B.; DAMASCENO, S.R.; CARVALHO, N.S.; SILVA, V.G.; OLIVEIRA, F.R. et al. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 455-464, 2014.
- SINGH, P.; SAXENA, R.; SRINIVAS, G.; PANDE, G.; Chattopadhyay, A. Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.



SONG, Y.; SHRESTHA, S.; GYAWALI, R.; LEE, D.; CHO, S. Citrus Unshiu Leaf Extract Containing Phytol as a major compound induces autophagic cell death in human gastric adenocarcinoma ags cells. **Applied Biological Chemistry**, v. 58, p. 257-265, 2015.

SONG, Y.W.; CHO, S.K. Phytol induces apoptosis and ros-mediated protective autophagy in human gastric adenocarcinoma ags cells. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 4, 1-7, 2015.

TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; GOTO, T.; YAMAMOTO, T.; TAIMATSU, A.; MATSUI, N. et al. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPARg and PPARa in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. **FEBS Letters**, v. 514, p. 315-322, 2002.

TAMATANI, T.; HATTORI, K.; NAKASHIRO, K.; HAYASHI, Y.; WU, S.; KLUMPP, D.; REDDY, J.; OYASU, R. Neoplastic conversion of human urothelial cells in vitro by overexpression of h2o2-generating peroxisomal fatty acyl coa oxidase. **International Journal of Oncology**, v. 15, p. 743-749, 1999.

THORNBURG, T.; TURNER, A.R.; CHEN, Y.Q.; VITOLINS, M.; CHANG, B.; XU, J. Phytanic acid, AMACR and prostate cancer risk. **Future Oncology**, v. 2, p. 213-223, 2006.

VAVILIN, D.; VERMAAS, W. Continuous chlorophyll degradation accompanied by chlorophyllide and phytol reutilization for chlorophyll synthesis in Synechocystis sp, PCC 6803. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1767, p. 920-929, 2007.

WALSH, P.C. Serum levels of phytanic acid are associated with prostate cancer risk. **Journal of Urology**, v. 174, p. 1824, 2005.

WANG, K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. **Cell Death & Disease**, v. 5, 2014.

WENSVEEN, F.M.; ALVES, N.L.; DERKS, I.A.; REEDQUIST, K.A.; ELDERING, E. Apoptosis induced by overall metabolic stress converges on the Bcl-2 family proteins Noxa and Mcl-1. **Apoptosis**, v. 16, n. 7, p. 708-21, 2011.

WRIGHT, M.; ALBANES, D.; MOSER, A.; WEINSTEIN, S.; SNYDER, K.; MÄNNISTÖ, S.; GANN, P. Serum phytanic and pristanic acid levels and prostate cancer risk in finnish smokers. **Cancer Medicine**, v. 3, p. 1562-1569, 2014.

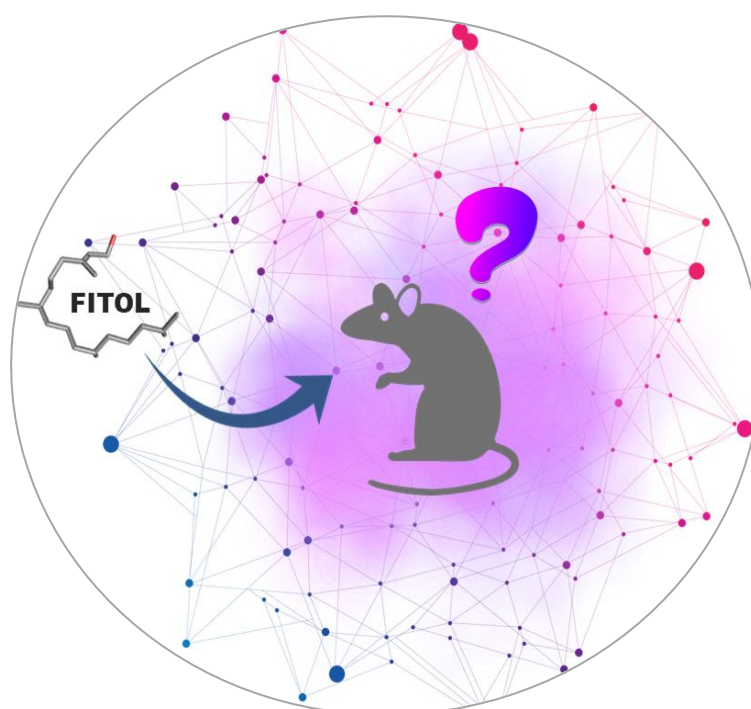
WRIGHT, M.; BOWEN, P.; VIRTAMO, J.; ALBANES, D.; GANN, P. Estimated phytanic acid intake and prostate cancer risk: a prospective cohort study. **International Journal of Cancer**, v. 131, p. 1396-1406, 2012.

XIAO, X.H.; YUAN, Z.Q.; LI, G.K. Preparation of phytosterols and phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 104, p. 284-289, 2013.

YOUSSEF J.; BADR, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 1, p. 68-82, 2011.

Capítulo 2

Perfil toxicogenético do fitol em ratos *Wistar* fêmeas



Alencar, M.V.O.B.

“Fitol no contexto toxicogenético: bom, ruim ou indiferente?”



Perfil toxicogenético do fitol em ratos *Wistar* fêmeas

Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Muhammad Torequl Islam, Antonielly Campinho dos Reis, José Victor de Oliveira Santos, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Adriana Maria Viana Nunes, Felipe Cavalcante Carneiro da Silva, Keylla da Conceição Machado, Sandra Maria Mendes de Moura Dantas, Luciano da Silva Lopes, João Marcelo de Castro e Sousa, Ana Amélia Melo Cavalcante

Artigo submetido ao periódico *Mutation Research* (ANEXO B)

QUALIS B1 – Biotecnologia

Resumo

O fitol é um diterpenoide imunoadjuvante, antimutagênico, ansiolítico, antimicrobiano, antiprotozoário, anti-inflamatório, antioxidante, antiteratogênico, antidiabético, hipoglicemiante, antiespasmódico, anticonvulsivante, antinociceptor e antidepressivo. Entretanto, seu perfil toxicológico não está bem esclarecido. Este estudo objetivou a investigação toxicogenética do fitol. Para tanto, 45 ratos *Wistar* albinos, fêmeas, não gestantes foram tratadas de forma aguda e subcrônica com fitol (v.o.) nas doses de 300 e 2000 mg/kg e 30, 60 e 90 mg/kg durante 14 dias e 28 dias, respectivamente. Foram realizadas avaliações hipocrática, neurofarmacológica, genotóxica em multiórgãos e mutagênica em medula, com aplicação do ensaio cometa e teste de micronúcleos. Os resultados demonstraram que a administração aguda de fitol não produziu morte, com DL_{50} acima de 2000 mg/kg. Entretanto, alterações toxicológicas (aumento do consumo de água e micção), de patologia clínica (eritropenia, eosinofilia, neutrofilia e linfopenia) e neurofarmacológica (aumento de autolimpeza e redução da atividade locomotora, especialmente nas maiores doses subcrônicas) foram observadas dependendo do tratamento e das doses testadas. Não foram evidenciadas alterações histopatológicas hepáticas. Por outro lado, o fitol induziu genotoxicidade em todos os tratamentos em células de medula óssea, fígado, rim e sangue periférico. Não foi evidenciado atividade de reparo de danos em sangue periférico, bem como não houve indícios de mutagenicidade em medula óssea. Diversos mecanismos poderiam justificar os possíveis efeitos toxicogenéticos observados no estudo. No entanto, os mecanismos oxidativos do fitol podem estar implicados nos seus efeitos toxicológicos pelas alterações neurofarmacológicas e de instabilidade genética. Os resultados desse estudo apontam para perspectivas do uso do fitol em doses oxidantes, especialmente em formulações farmacêuticas antitumorais.

Palavras-chave: fitol, toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, ensaio cometa, teste de micronúcleos.



1 INTRODUÇÃO

Diversos produtos naturais e seus derivados fitoquímicos, apresentam atividade farmacológica e, têm sido fontes de agentes terapêuticos (DEY; SHAH; BRADBURY, 2016). Os óleos essenciais, que compreendem complexas misturas de terpenos, protegem as plantas de doenças, bem como apresentam atividades farmacológicas (WITTAYALAI et al., 2014; STAPPEN et al., 2015). Os terpenos são sintetizados a partir de unidades de isopreno (C5), dentre eles os carotenoides (C40) que são pigmentos amarelos e vermelhos em plantas. A clorofila é um pigmento verde, composto de anel clorina com uma longa cadeia lateral, apresentando o diterpenoide fitol (C20) (GONZÁLEZ-BURGOS; GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

O fitol ([E,7R,11R]-3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol), neste estudo denominado FIT, é um diterpenoide presente em óleo essencial, com diversos efeitos biológicos como imunoadjuvante (LIM et al., 2006), antimutagênico (KAGOURA et al., 1993), ansiolítico (COSTA et al., 2014), antimicrobiano (INOUE et al., 2005; MORAES et al., 2014), antiprotozoário (BERO et al., 2014), anti-inflamatório (SILVA et al., 2014), antioxidante (PEJIN et al., 2014; ISLAM et al., 2015; ISLAM et al., 2016a), antiteratogênico (ARNHOLD; ELMAZAR; NAU, 2002), antidiabético (ELMAZAR et al., 2013), hipoglicemiante (PETER, 2014), antiespasmódico (PONGPRAYOON et al., 1992), anticonvulsivante (COSTA et al., 2012), antinociceptor (SANTOS et al., 2013), antidepressivo (COSTA et al., 2011) e anticâncer (GUO et al., 2014). Em virtude de sua cadeia química possuir caráter lipofílico, o FIT pode interagir com membranas celulares, assim como outras substâncias lipofílicas e metabólitos de importância como agente terapêutico e/ou protótipo no desenvolvimento de fármacos, a exemplo de outros óleos essenciais (MALLA; GAUCHAN; CHHETRI, 2015).

Entretanto, estudos toxicológicos não clínicos e clínicos de candidatos a fármacos são requeridos por agências reguladoras e pela indústria farmacêutica, a fim de avaliar os limites de toxicidade em animais e humanos para prevenção de riscos (VILLAIN et al., 2016; WARHEIT; BROWN; DONNER, 2015). Os estudos toxicológicos não clínicos são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2013) em análises de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade. A genotoxicidade induzida por agentes químicos e/ou físicos, que interagem com o DNA, bem como por outros caminhos celulares, pode ocasionar adutos, quebras de fitas, mutações de ponto e alterações estruturais e numéricas aos cromossomos que podem ser associadas à carcinogenicidade (BAUMSTARK-KHAN; HELLWEG; REITZ, 2010; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015).

Diversos estudos também apontam que os testes para detecção de genotoxicidade apresentam correlações positivas para carcinogenicidade. O ensaio cometa e teste de micronúcleos são indicados



na avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade, especialmente de forma associada (KANG et al., 2013), considerando que os danos ao DNA são críticos para sobrevivência celular, pois alguns danos não são reparados durante a parada do ciclo celular e podem induzir apoptose ou crescimento anormal de células (KLAPACZ et al., 2016; HYUN; JANG, 2015). Assim, esse estudo teve por objetivo avaliar os efeitos toxicogenéticos do fitol em ratos (fêmeas), por meio da aplicação de testes comportamentais, dosagens enzimáticas, análises hematológica e histopatológica, bem como o estudo da genotoxicidade, reparo de DNA e riscos de mutagenicidade, buscando correlações entre os biomarcadores toxicogenéticos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e químicos

O FIT e todos os outros produtos químicos e reagentes necessários para a realização deste estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Chem Ex. Co. St. Louis, Missouri, USA). O composto fitol foi solubilizado em 0,05% de Tween 80, dissolvido em 0,9% de Cloreto de Sódio. Nos experimentos *in vivo*, o fitol foi administrado oralmente em *Rattus norvegicus* em doses de 300 e 2000 mg/kg (toxicidade aguda) e 30, 60 e 90 mg/kg (toxicidade com doses repetidas). As doses nesse estudo foram escolhidas de acordo com o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança necessários ao desenvolvimento de Medicamentos (ANVISA, 2013), bem como os protocolos OECD n° 423 e 407.

2.2 Animais experimentais

Rattus norvegicus fêmeas (145-220 g), com 2 meses de idade, foram utilizadas neste estudo. Todos os animais foram mantidos em ambiente controlado de temperatura ($26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em ciclo claro/escuro de 12 horas (período claro de 6h – 18h), com livre acesso à água e ração (Purina®). Os animais permaneceram em aclimação durante sete dias antes do início dos experimentos. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle (água destilada, v.o.), fitol (300 e 2000 mg/kg, v.o., tratamento agudo e 30, 60 e 90 mg/kg, v.o., tratamento com doses repetidas). A quantidade de animais foi estabelecida de acordo com o guia para condução de estudo de toxicidade aguda e de doses repetidas via oral, da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD n° 423, 2001 e OECD n° 407, 2008, respectivamente). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (#004/15, ANEXO C).



2.3 Administração de FIT e triagem toxicológica

Após jejum noturno, os animais em exposição aguda foram tratados, via gavagem, com FIT nas doses de 300 e 2000 mg/kg (n=3/grupo) e avaliados durante 14 dias. Um grupo (n=3) de animais foi utilizado como controle (água destilada, v.o.) e avaliados durante o mesmo período. Os animais em exposição subcrônica (n=5/grupo) foram tratados, via gavagem, com doses repetidas de FIT (30, 60 e 90 mg/kg) e avaliados durante 28 dias. Similarmente, um grupo (n=5) de animais foi utilizado como grupo controle (água destilada, v.o.), sendo acompanhado durante o mesmo período. Os grupos de animais foram, frequentemente, observados em 30 min, 1h, 2h, 4h e 8h após administração, para análise hipocrática. Durante este período, foi realizada a triagem da atividade geral do animal, tremor vocal, irritabilidade, resposta de força, aderência da cauda, contorção, tônus corporal, força no agarramento, coordenação negativa, reflexo corneal, tremores, convulsão, hipnose, ptose (inclinação ou queda da pálpebra superior), micção, defecação, piloereção (ereção involuntária ou eriçamento dos pelos), respiração e mortalidade. No primeiro dia, após 30 min de administração de FIT, os animais foram submetidos a testes comportamentais de campo aberto (CA), durante 5 minutos; seguido por um teste de rotação (RR: *rota rod*), durante 3 min, considerando um intervalo de 5 min entre estes dois testes. Tanto o CA como o RR foram repetidos no 7º e 14º dia de tratamento (grupo de exposição aguda), bem como no 7º, 14º, 21º e 28º dia de tratamento (grupo de exposição subcrônica). As amostras de sangue periférico foram colhidas mediante pequenas incisões na cauda dos animais. O cronograma de coleta de sangue e a metodologia geral foram discutidos na seção de testes genotóxicos e mutagênicos. Após o período de observação, os animais foram sacrificados e amostras de tecido e órgãos foram coletadas conforme discutido na seção de procedimentos experimentais.

2.4 Procedimentos experimentais

2.4.1 Hábitos gerais

O peso corporal, consumo de água e alimentos, defecação e a micção foram observados a cada dia, após administração. Durante esse período, as atividades gerais dos animais e o número de mortes foram observados. Além disso, a gaiola de aço inoxidável, para cada animal, foi higienizada com água de torneira, seguido por assepsia com solução de álcool 70% em uma base regular.



2.4.2 Teste de campo aberto

O aparato do teste de campo aberto consistiu de uma caixa em acrílico (paredes transparentes e piso preto (diâmetro de 100 x 30 cm de altura), dividido em nove quadrados de iguais dimensões, com um disco central de 33 cm de diâmetro (ARCHER, 1973). Os ratos foram divididos, aleatoriamente, em 3 grupos (n = 5 animais) para avaliação de toxicidade com doses repetidas (FIT 30, 60 e 90 mg/kg, v.o.); e 2 grupos (n = 3 animais) para avaliação de toxicidade aguda (FIT 300 e 2000 mg/kg, v.o.). Ambos os regimes de avaliação toxicológica foram acompanhados de grupos tratados com veículo (0,05% de Tween 80 dissolvido em 0,9% de Cloreto de Sódio, v.o.). Após 30 minutos e 1h de cada aplicação, cada animal foi colocado, individualmente, no aparato e 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, foram computados. Após cada avaliação individual, o equipamento foi lavado com água e sabão, seguido de assepsia com álcool 70%. O campo aberto foi repetido a cada sete dias durante os tratamentos.

2.4.3 Teste de *rota rod*

Geralmente este teste 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 ratos foram colocados com as quatro patas numa barra cilíndrica de aço inoxidável, com 25 mm de diâmetro, a uma velocidade de rotação de 17 rpm/min durante um período de 3 min. O tempo de permanência na barra em segundos (TP) e o número de quedas (NQ) foram mensurados três vezes (MACHADO et al., 2015). O *rota rod* também foi repetido a cada sete dias durante os tratamentos.

2.4.4 Eutanásia e coleta dos órgãos

Os animais foram sacrificados no 14° dia (toxicidade aguda); e 28° dia de tratamento (toxicidade doses repetidas) por sobredose de solução anestésica (pentobarbital sódico + xilazina [1:1], i.p.). O cérebro, coração, pulmão, fígado, baço e rim foram, imediatamente, separados numa caixa de gelo. Os órgãos foram lavados com solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7.4), pesados e conservados em solução de formalina a 10%, até o início da análise histopatológica.



2.4.5 Análises bioquímica, hematológica, histopatológica e urinária

Para a análise bioquímica, o sangue do coração foi colhido logo após eutanásia dos animais e foi centrifugado a 4000 x g durante 5 min (a 4°C). O plasma foi submetido a uma análise bioquímica automática utilizando aparelho Labmax 240, com *kits* comerciais Labtest® para os parâmetros: glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, 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. Enquanto que 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). Para a análise histopatológica, os fragmentos de órgãos (cérebro, fígado e rim) foram fixados em formaldeído a 3,5% em tampão fosfato (pH 7.6), adicionado solução de sacarose a 1% e armazenados durante 12h a 4°C até à sua utilização. A fixação foi processada durante 20 h, 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, antes de finalmente ser emblocado (BEHMER; TOLOSA; NETO, 1976). Os blocos obtidos foram seccionados (5 a 6 µM) em micrótomo e as secções distendidas em lâminas, de modo a serem submetidas à bateria de coloração. As secções distendidas foram desparafinizadas em três banhos sucessivos de xileno PA e desidratadas em diluições decrescentes de etanol, conforme supracitado. Em seguida, as lâminas foram coradas 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. A análise de urina foi realizada a cada sete dias durante os tratamentos, utilizando *kits* comerciais Labtest®. Nesta análise foram determinados os seguintes parâmetros: bilirrubina, urobilrubina, cetonas, ácido ascórbico, glicose, proteína, sangue, pH, nitrito, leucócitos e gravidade específica.

2.4.6 Ensaio cometa em diferentes tecidos

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Speit e Hartmann (2005). Para avaliação genotóxica do tratamento agudo, alíquotas de 10 µL de sangue periférico caudal de ratos fêmeas foram coletadas nos períodos de 0, 24 e 72h, 7º e 14º dia de tratamento e submetidas ao ensaio cometa. Para a análise genotóxica do tratamento subcrônico, alíquotas de 10 µL de homogenato celular de medula óssea, rim, fígado e sangue periférico foram coletadas após 28 dias de tratamento e submetidas ao ensaio cometa. O material celular foi misturado com uma fina camada de agarose *low melting point* 0,75% (90 µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%. 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: $FD = 100 - \text{nº de células classe 0}$. Para o tratamento agudo, a medula óssea foi colhida apenas no 14º dia (após eutanásia dos animais). Enquanto que para o tratamento com doses repetidas, o ensaio cometa foi realizado apenas no 28º dia de tratamento (após eutanásia dos animais), utilizando células nucleadas de sangue periférico, fígado, rim e medula óssea. A medula óssea foi coletada da epífise com soro bovino fetal, centrifugada a 1500 rpm. Após a coleta do fígado e do rim, os órgãos foram macerados em PBS, centrifugados e submetidos ao procedimento supracitado.

2.4.7 Avaliação *ex vivo* de danos oxidativos do FIT em linfócitos de ratos fêmeas

Neste experimento, alíquotas de 10 µL de sangue periférico caudal de ratos fêmeas foram misturados com uma fina camada de agarose *low melting point* 0,75% (90 µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%. Em seguida, as lâminas foram expostas *ex vivo* ao FIT (4,72, 7,08 e 14,16 mM), isoladamente e em co-tratamento com H₂O₂ (10 mM), por 5 minutos. As concentrações do FIT foram determinadas de acordo com estudo anterior (ISLAM et al., 2017). Depois, 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 5 minutos, a 4°C. Após este procedimento, procedeu-se a continuação do ensaio cometa, conforme supracitado.

2.4.8 Teste de micronúcleos em medula óssea

O teste foi realizado de acordo com Moraes e colaboradores (2016). Resumidamente, componentes de medula óssea foram colhidos e misturados com 0,3 mL de soro fetal bovino e espalhados em lâminas. Os esfregaços foram secos durante 30 min à temperatura ambiente e fixados em metanol durante 10 min. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0,2 M (pH 5,8). A contagem de micronúcleos em 2000 eritrócitos policromáticos foi realizada por fotomicrografia com aumento de 1000X em microscópio óptico.



2.4.9 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 uma via, 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). Todos os estudos foram realizados em duplicata, a partir de avaliações biológicas independentes. Para realizar a associação entre os parâmetros avaliados, utilizou-se o teste de correlação linear de *Pearson*.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação toxicológica

Nenhuma morte foi observada após administração de FIT. Portanto, para ratos fêmeas não gestantes, a DL_{50} pode estar acima da dose de 2000 mg/kg. Apenas no grupo tratado com 2000 mg/kg foi observado presença de *straub* nos primeiros 30 minutos da análise hipocrática. Os tratamentos com FIT 300 e 2000 mg/kg não interferiram no aumento do peso corporal em relação ao controle negativo. Entretanto, na dose de 90 mg/kg induziu redução do ganho de peso e consumo de ração em relação às demais doses do FIT. Por outro lado, verificou-se aumento do consumo de água e micção do tratamento subcrônico em comparação com o grupo controle (Tabela 1). Entretanto, não houve alterações para defecação nos tratamentos em relação ao controle.



Tabela 1. Perfil de ração diária após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos *Wistar*.

Parâmetros	Administração oral aguda (14 dias) de fitol		
	Controle	FIT 300 mg/kg	FIT 2000 mg/kg
Ganho de massa (g)	23,71 ± 3,20	30,01 ± 5,21	26,62 ± 4,72
Consumo de ração (g)	24,51 ± 4,23	21,61 ± 7,72	22,01 ± 4,41
Consumo de água (mL)	39,70 ± 5,51	38,60 ± 4,33	33,61 ± 8,61
Micção (mL)	9,20 ± 1,82	8,30 ± 5,32	8,60 ± 1,83
Defecação (g)	5,91 ± 0,42	5,10 ± 2,33	5,00 ± 0,72

Parâmetros	Administração oral subcrônica (28 dias) de fitol			
	Controle	FIT 30 mg/kg	FIT 60 mg/kg	FIT 90 mg/kg
Ganho de massa (g)	23,7 ± 3,2	26,6 ± 3,8 ^{a,c,d}	21,0 ± 4,5 ^d	16,0 ± 7,2
Consumo de ração (g)	24,5 ± 4,2	30,0 ± 6,4 ^{a,c,d}	26,5 ± 6,2 ^d	21,7 ± 6,9
Consumo de água (mL)	39,7 ± 12,5	52,7 ± 21,2 ^a	57,1 ± 20,5 ^a	60,0 ± 25,4 ^a
Micção (mL)	8,2 ± 1,8	18,6 ± 8,8 ^a	13,5 ± 6,6 ^a	14,3 ± 7,4 ^a
Defecação (g)	4,8 ± 0,3	7,4 ± 1,4	6,1 ± 1,0	6,0 ± 1,1

Valores representam a média ± desvio padrão (n = 3/5); FIT: fitol; p<0,05 comparado ao grupo controle^a, FIT 30^b, FIT 60^c e FIT 90^d (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

3.2 Análise comportamental (neurofarmacológica)

Os dados obtidos no campo aberto e *rota rod* para tratamento agudo e subcrônico estão apresentados na Tabela 2. O FIT (300 e 2000 mg/kg) induziu aumento (p<0,05) no número de cruzamentos e autolimpeza durante o 1º dia de tratamento, comparado ao grupo controle. Já o comportamento de levantamento dos animais tratados com 300 e 2000 mg/kg foi semelhante aos do grupo controle. No teste *rota rod*, os animais utilizados no grupo controle demonstraram um desempenho sem quedas em tempo integral (180s), no 1º, 7º e 14º dia de tratamento agudo. O grupo tratado com FIT 300 mg/kg, no 1º dia, também demonstrou resultado semelhante ao grupo controle. No entanto, foi observado aumento do número de quedas no grupo tratado com 300 mg/kg para o 14º dia. Já a dose de 2000 mg/kg induziu redução do tempo de permanência na barra giratória e aumento do número de quedas durante o 7º e 14º dias.



Tabela 2. Perfil comportamental e locomotor após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos Wistar.

Grupos e dias de tratamento		Administração oral aguda (14 dias) de fitol				
		Campo aberto			Rota rod	
		Cruzamento	Autolimpeza	Levantamento	TP (s)	NQ
Controle	1º dia	8,6 ± 1,1	1,3 ± 0,5	4,6 ± 1,5	180 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	7º dia	10,0 ± 1,0	2,6 ± 0,5	4,6 ± 0,5	180 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	14º dia	8,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5	4,3 ± 0,5	180 ± 0,0	0,0 ± 0,0
FIT 300 mg/kg	1º dia	16,0 ± 7,2 ^a	4,6 ± 1,5 ^a	4,3 ± 0,5	180 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	7º dia	15,3 ± 3,0	4,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5	176,0 ± 3,6	0,6 ± 0,5
	14º dia	13,0 ± 5,5	4,3 ± 0,5	3,6 ± 0,5	171,0 ± 4,5	1,0 ± 1,0 ^a
FIT 2000 mg/kg	1º dia	16,6 ± 3,0 ^a	6,3 ± 1,5 ^a	4,3 ± 2,0	179,3 ± 1,2	0,3 ± 0,5
	7º dia	16,0 ± 2,6	3,6 ± 1,5	3,6 ± 1,5	171,7 ± 2,1 ^a	1,3 ± 0,5 ^a
	14º dia	10,0 ± 1,0	4,3 ± 1,1	4,3 ± 1,1	165,3 ± 4,9 ^a	1,6 ± 0,5 ^a
Grupos e dias de tratamento		Administração oral subcrônica (28 dias) de fitol				
		Campo aberto			Rota rod	
		Cruzamentos	Autolimpeza	Levantamentos	TP (s)	NQ
Controle	1º dia	27,9 ± 7,3	4,6 ± 1,1	9,0 ± 0,5	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	7º dia	26,2 ± 5,3	5,0 ± 0,7	10,0 ± 0,5	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	14º dia	28,6 ± 0,5	4,0 ± 0,7	11,0 ± 3,5	174,6 ± 2,5	0,2 ± 0,5
	21º dia	27,2 ± 3,3	4,6 ± 0,5	9,0 ± 0,5	175,2 ± 3,5	0,2 ± 0,5
	28º dia	26,6 ± 3,5	4,0 ± 0,7	10,0 ± 2,5	175,0 ± 5,6	0,6 ± 0,8
FIT 30 mg/kg	1º dia	28,8 ± 3,6	4,8 ± 1,6	10,6 ± 1,6	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	7º dia	26,6 ± 3,2	5,6 ± 1,8	10,2 ± 2,1	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	14º dia	27,6 ± 6,4	6,0 ± 1,8	10,0 ± 2,0	178,6 ± 3,1	0,2 ± 0,4
	21º dia	23,8 ± 4,9	5,6 ± 1,1	8,0 ± 1,1	177,0 ± 4,1	0,4 ± 0,5
	28º dia	25,2 ± 4,6	6,2 ± 0,8	8,4 ± 0,8	175,0 ± 7,5	0,6 ± 0,8
FIT 60 mg/kg	1º dia	31,4 ± 6,1	8,8 ± 1,9 ^{ab}	10,2 ± 1,4	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	7º dia	30,2 ± 5,1	7,4 ± 2,0 ^{ab}	9,6 ± 2,0	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	14º dia	32,4 ± 3,4	8,6 ± 1,2 ^{ab}	9,4 ± 2,0	178,6 ± 3,1	0,2 ± 0,4
	21º dia	29,8 ± 3,1	7,8 ± 0,8 ^{ab}	8,6 ± 1,5	175,4 ± 4,3	0,6 ± 0,5
	28º dia	25,2 ± 2,3	8,8 ± 1,3 ^{ab}	9,4 ± 2,4	174,0 ± 6,6	0,8 ± 0,8
FIT 90 mg/kg	1º dia	29,6 ± 2,4	8,4 ± 1,1 ^{ab}	9,2 ± 1,7	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	7º dia	29,8 ± 3,1	7,6 ± 1,1 ^{ab}	10,8 ± 1,3	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	14º dia	29,0 ± 5,7	8,6 ± 1,6 ^{ab}	9,8 ± 1,3	177,0 ± 4,1	0,4 ± 0,5
	21º dia	27,8 ± 2,5	7,6 ± 1,1 ^{ab}	10,0 ± 2,0	175,0 ± 4,6	0,6 ± 0,5
	28º dia	25,0 ± 4,8	8,0 ± 1,5 ^{ab}	7,8 ± 2,0	164,6 ± 6,0 ^{a,b,c}	1,2 ± 0,8 ^{a,b,c}

Valores representam a média ± desvio padrão (n = 3/5); FIT: fitol; TP: tempo de permanência; NQ: número de quedas; p<0,05 comparado ao grupo controle^a, FIT 30^b, FIT 60^c e FIT 90^d no respectivo dia (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

Os animais tratados de forma subcrônica exibiram comportamentos de cruzamentos e levantamentos de forma similar ao controle negativo. Para o comportamento de autolimpeza não foi observado alterações para a dose de 30 mg/kg, comparado ao controle. Contudo, nas doses de 60 e 90 mg/kg foi observado aumento (p<0,05) do número de autolimpeza em relação aos grupos controle e FIT 30 mg/kg.



No teste *rota rod* foi observado que o FIT nas doses testadas, durante o tratamento subcrônico, não demonstrou alterações no tempo de permanência e número de quedas dos animais na barra giratória, exceto para o 28º dia na dose de 90 mg/kg, comparado ao controle negativo.

3.3 Avaliação do perfil hematológico

Os animais tratados de forma aguda (300 e 2000 mg/kg) e subcrônica (30, 60 e 90 mg/kg) exibiram neutrofilia e eosinofilia, comparado ao grupo controle. O tratamento subcrônico com doses repetidas de FIT também induziu redução na quantidade de hemácias na dose de 90 mg/kg e linfócitos, em todas as doses, comparado ao controle (Tabela 3).

**Tabela 3.** Parâmetros hematológicos após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos *Wistar*.

Administração oral aguda (14 dias) de fitol				
Parâmetros	Controle	FIT 300 mg/kg	FIT 2000 mg/kg	
Série vermelha				
HEM (10 ¹² /L)	6,6 ± 0,3	5,27 ± 0,2	6,18 ± 0,8	
HGB (g/dL)	11,3 ± 0,2	9,75 ± 0,2	10,2 ± 0,6	
HTC (%)	38,2 ± 0,7	35,6 ± 4,5	33,8 ± 2,7	
VCM (fL)	52,7 ± 0,4	53,0 ± 0,5	54,2 ± 2,9	
HCM (pg)	17,5 ± 0,3	15,3 ± 1,7	16,6 ± 3,1	
CHCM (g/dL)	31,1 ± 0,5	29,8 ± 1,6	30,7 ± 2,3	
Série branca				
Leucócitos (p/mm ³)	1,235 ± 430	1,300 ± 264	1,450 ± 858	
Neutrófilos (10 ⁹ /L)	26 ± 3,2	35 ± 9,2 ^a	42 ± 6,1 ^a	
Linfócitos (10 ⁹ /L)	70,2 ± 2,2	60,2 ± 9,0	50,5 ± 2,5	
Eosinófilos (10 ⁹ /L)	0,45 ± 0,3	1,23 ± 0,4 ^a	1,25 ± 0,5 ^a	
Monócitos (10 ⁹ /L)	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,0	2,5 ± 0,5	
Outros				
Plaquetas (10 ⁹ /L)	523,5 ± 16,5	485,2 ± 35,1	489,6 ± 29,4	
Administração oral subcrônica (28 dias) de fitol				
Parâmetros	Controle	FIT 30 mg/kg	FIT 60 mg/kg	FIT 90 mg/kg
Série Vermelha				
HEM (10 ¹² /L)	6,6 ± 0,3	6,1 ± 0,4	5,4 ± 0,2	4,7 ± 0,3 ^a
HGB (g/dL)	11,3 ± 0,2	11,0 ± 0,7	11,2 ± 0,4	11,0 ± 0,5
HTC (%)	37,2 ± 0,7	33,4 ± 2,6	35,2 ± 3,2	36,1 ± 2,5
VCM (fL)	52,7 ± 0,4	51,0 ± 0,5	52,4 ± 1,3	53,2 ± 2,1
HCM (pg)	17,5 ± 0,3	16,6 ± 1,4	17,3 ± 2,3	16,1 ± 2,4
CHCM (g/dL)	31,1 ± 0,5	30,2 ± 3,1	32,4 ± 4,4	31,2 ± 0,9
Série Branca				
Leucócitos (p/mm ³)	1,235 ± 430	1,500 ± 145	1,560 ± 232	1,420 ± 340
Neutrófilos (10 ⁹ /L)	26 ± 3,2	40 ± 1,5 ^a	38 ± 4,0 ^a	45 ± 2,2 ^a
Linfócitos (10 ⁹ /L)	70,2 ± 2,2	58,4 ± 1,2 ^a	51,2 ± 1,0 ^a	42,8 ± 2,0 ^a
Eosinófilos (10 ⁹ /L)	0,45 ± 0,3	1,0 ± 0,5 ^a	1,5 ± 0,5 ^a	1,0 ± 0,4 ^a
Monócitos (10 ⁹ /L)	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,5 ^d	1,5 ± 0,5	1,2 ± 0,3
Outros				
Plaquetas	523,5 ± 16,5	510,0 ± 20,4	511,3 ± 32,2	484,0 ± 28,3

Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 3/5); FIT: fitol; HEM: hemácias; HGB: hemoglobina, HTC: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; p<0,05 comparado ao grupo controle^a, FIT 30^b, FIT 60^c, FIT 90^d (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

3.4 Avaliação do perfil bioquímico, peso de órgãos e análise histopatológica

No tratamento agudo (14 dias), o FIT (300 e 2000 mg/kg) induziu aumento (p<0,05) dos níveis de ureia e creatinina, comparado ao controle. Em relação ao tratamento subcrônico (28 dias), observou-se que as doses de FIT induziram elevação (p<0,05) da maioria dos parâmetros bioquímicos comparado ao grupo controle, especialmente a dose de 90 mg/kg (Tabela 4).



Tabela 4. Parâmetros bioquímicos após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos *Wistar*.

Parâmetros	Administração oral aguda (14 dias) de fitol		
	Controle	FIT 300 mg/kg	FIT 2000 mg/kg
Glicose (mg/dL)	117,0 ± 9,00	114,67 ± 9,45	116,67 ± 29,26
Ureia (mg/dL)	26,4 ± 0,40	44,00 ± 2,00 ^a	39,33 ± 2,08 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,41 ± 0,03	0,51 ± 0,08 ^a	0,55 ± 0,05 ^a
Ácido úrico (mg/dL)	3,22 ± 0,75	3,31 ± 1,01	2,46 ± 0,67
Colesterol total (mg/dL)	81,50 ± 6,86	73,00 ± 7,00	66,67 ± 15,51
ALT (IU/L)	36,8 ± 4,41	38,33 ± 12,50	31,33 ± 5,77
AST (IU/L)	118,0 ± 10,77	117,67 ± 8,39	108,33 ± 25,79
Bilirrubina total (mg/dL)	0,36 ± 0,03	0,31 ± 0,06	0,38 ± 0,02

Parâmetros	Administração oral subcrônica (28 dias) de fitol			
	Controle	FIT 30 mg/kg	FIT 60 mg/kg	FIT 90 mg/kg
Glicose (mg/dL)	117,0 ± 9,00	176,6 ± 12,4 ^{ad}	174,6 ± 67,2 ^{ad}	142,0 ± 33,1 ^a
Ureia (mg/dL)	26,4 ± 0,4	36,6 ± 7,5 ^a	32,6 ± 3,5 ^a	58,3 ± 2,1 ^{acd}
Creatinina (mg/dL)	0,41 ± 0,3	0,53 ± 0,2	0,53 ± 0,4	1,9 ± 0,3 ^{abc}
Ácido úrico (mg/dL)	3,22 ± 0,8	2,4 ± 0,8	2,2 ± 0,4	1,9 ± 0,2 ^a
Colesterol total (mg/dL)	81,50 ± 6,86	82,00 ± 25,63	77,67 ± 9,24	78,00 ± 5,39
ALT (IU/L)	36,8 ± 4,4	41,0 ± 8,1 ^a	43,3 ± 6,0 ^a	57,0 ± 14,0 ^{acd}
AST (IU/L)	118,0 ± 10,77	117,3 ± 29,7	101,6 ± 23,7	173,6 ± 3,5 ^{acd}
Bilirrubina total (mg/dL)	0,36 ± 0,03	0,33 ± 0,06	0,31 ± 0,02	0,29 ± 0,03

Valores representam a média ± desvio padrão (n = 3/5); FIT: fitol; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; p<0,05 comparado ao grupo controle^a, FIT 30^b, FIT 60^c, FIT 90^d (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

3.5 Avaliação de alterações patológicas

Não foram evidenciadas alterações histoarquiteturais hepáticas, após os diferentes tratamentos, comparado ao grupo controle (Figura 1). Além disso, a administração oral aguda e subcrônica do FIT não induziu aumento do peso de órgãos dos animais, comparado ao grupo controle (Tabela 5).



Figura 1. Análise histopatológica do efeito do tratamento agudo e subcrônico do fitol em fígado de ratos *Wistar*. A: veículo (controle). B e C: FIT 2000 e 300 mg/kg v.o., respectivamente. D, E e F: FIT 30, 60 e 90 mg/kg v.o., respectivamente). A histopatologia hepática no grupo controle, assim como no grupo tratado apresentou estrutura e disposição de hepatócitos normais. Veia central (seta preta completa) e sinusoides normais (ponta de seta preta). Veia portal (seta branca completa). Ducto biliar (ponta de seta branca). Presença discreta de células de Küpffer (seta seccionada). Congestão (asterisco). Coloração com H&E (200X).

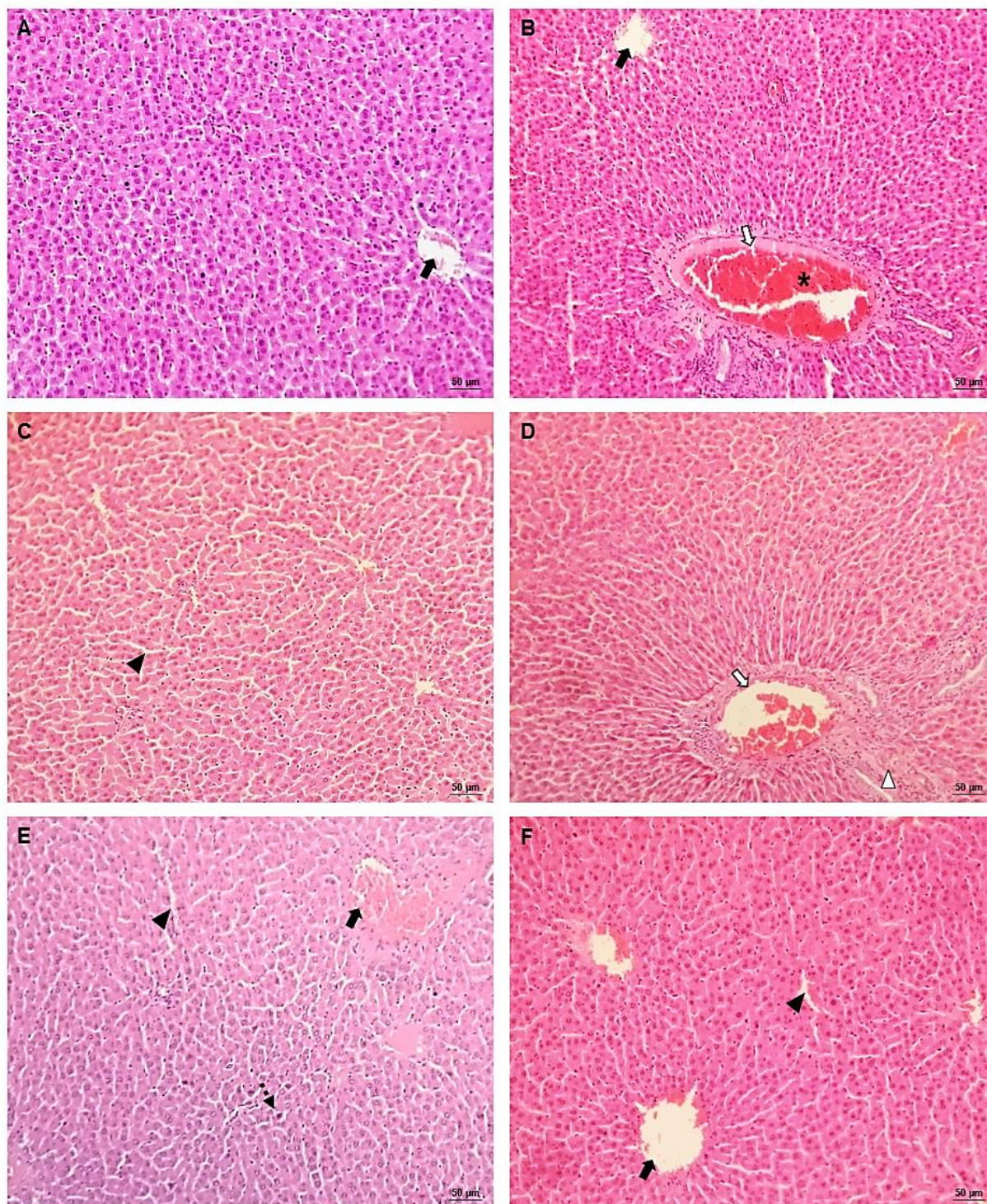




Tabela 5. Perfil do peso de órgãos após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos *Wistar*.

Órgãos	Administração oral aguda (14 dias) de fitol		
	Controle	FIT 300 mg/kg	FIT 2000 mg/kg
Cérebro	1,14 ± 0,03	1,59 ± 0,24	1,76 ± 0,03
Coração	0,46 ± 0,01	0,62 ± 0,11	0,67 ± 0,02
Fígado	4,29 ± 0,30	4,24 ± 1,58	5,46 ± 0,31
Pulmão	1,12 ± 0,06	1,23 ± 0,25	1,31 ± 0,03
Baço	0,51 ± 0,01	0,63 ± 0,26	0,66 ± 0,05
Rins	1,23 ± 0,01	1,26 ± 0,45	1,49 ± 0,03

Órgãos	Administração oral subcrônica (28 dias) de fitol			
	Controle	FIT 30 mg/kg	FIT 60 mg/kg	FIT 90 mg/kg
Cérebro	1,61 ± 0,030	1,65 ± 0,20	1,72 ± 0,11	1,69 ± 0,14
Coração	0,74 ± 0,007	0,75 ± 0,14	0,83 ± 0,12	0,82 ± 0,19
Fígado	5,75 ± 0,304	6,32 ± 1,95	6,33 ± 1,11	5,85 ± 1,36
Pulmão	1,51 ± 0,063	1,58 ± 0,29	1,89 ± 0,31	1,80 ± 0,40
Baço	0,54 ± 0,010	0,51 ± 0,16	0,56 ± 0,16	0,62 ± 0,32
Rins	1,46 ± 0,010	1,69 ± 0,28	1,66 ± 0,26	1,79 ± 0,25

Valores representam a média ± desvio padrão (n = 3/5); FIT: fitol. p>0,05 comparado ao grupo controle (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

3.6 Urinálise

Os dados observados no sumário de urina sugerem que os animais tratados de forma aguda com FIT aumentaram o conteúdo de proteína e de nitrito na urina. No entanto, os demais parâmetros permaneceram inalterados em comparação com o grupo controle. Já o tratamento subcrônico com FIT, especialmente nas doses de 60 e 90 mg/kg, exibiu a presença de bilirrubina, proteína e nitrito na urina dos animais, enquanto que os demais parâmetros permaneceram similares ao grupo controle (Tabela 6).

**Tabela 6.** Relatório do sumário de urina após administração aguda e subcrônica de fitol em ratos *Wistar*.

Administração oral aguda (14 dias) de fitol				
Parâmetros	Controle	FIT 300 mg/kg	FIT 2000 mg/kg	
Bilirrubina	-	-	-	
Urobilinogênio	-	-	-	
Cetonas	-	-	-	
Ácido ascórbico	+	-	-	
Glicose	-	-	-	
Proteína	31,24 ± 2,78	61,11 ± 13,48 ^a	84,45 ± 13,47 ^{a,b}	
Sangue	-	-	-	
pH	7,01 ± 1,10	7,39 ± 0,48	7,06 ± 0,79	
Nitritos	-	+	++	
Leucócitos	-	-	-	
Gravidade específica	1,01 ± 0,01	1,01 ± 0,01	1,02 ± 0,01	
Administração oral subcrônica (28 dias) de fitol				
Parâmetros	Controle	FIT 30 mg/kg	FIT 60 mg/kg	FIT 90 mg/kg
Bilirrubina	-	-	+	+
Urobilinogênio	-	-	-	-
Cetonas	-	-	-	-
Ácido ascórbico	+	+	+	+
Glicose	-	-	-	-
Proteína	30,24 ± 3,78	77,60 ± 5,69 ^a	94,40 ± 7,63 ^{a,c}	131,20 ± 11,96 ^{a,c,d}
Sangue	-	-	-	-
pH	7,08 ± 1,12	7,08 ± 1,12	7,56 ± 0,65	7,60 ± 0,66
Nitritos	-	-	+	+
Leucócitos	-	-	-	-
Gravidade específica	1,0102 ± 0,01	1,0102 ± 0,01	1,0086 ± 0,01	1,0094 ± 0,01

Valores representam a média ± desvio padrão (n = 3/5); FIT: fitol; p<0,05 comparado ao grupo controle^a; p<0,05 comparado ao FIT 300^b, FIT 30^c e FIT 60^d (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

3.7 Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade

A genotoxicidade do FIT foi avaliada em células nucleadas de sangue periférico, medula óssea, fígado e rim. O FIT induziu genotoxicidade (pelo aumento do ID e FD) durante o tratamento agudo (300 e 2000 mg/kg) em células de sangue periférico e medula óssea de ratos, quando comparado aos danos observados no controle, exceto para a dose de 300 mg/kg em relação ao ID no 7º dia. Além disso, não foram evidenciadas atividades de reparo de DNA durante o período de exposição aguda (Tabela 7). Em relação aos danos mutagênicos, não foram evidenciados eventos clastogênicos/aneugênicos em eritrócitos policromáticos de medula óssea, comparado ao grupo controle.



Tabela 7. Avaliação genotóxica e capacidade de reparo de DNA em linfócitos de sangue periférico e medula óssea de ratos tratados de forma aguda (300 e 2000 mg/kg) com fitol.

Tratamentos e parâmetros		Linfócitos de sangue periférico					Medula
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 7	Dia 14	
Controle	ID	15,2 ± 3,4	15,4 ± 3,2	14,8 ± 4,2	15,2 ± 3,4	14,8 ± 3,4	14,8 ± 6,4
	FD	18,4 ± 2,8	17,6 ± 2,4	16,8 ± 2,8	17,2 ± 2,6	18,2 ± 2,6	17,6 ± 3,2
	MN						2,8 ± 0,8
FIT 300 mg/kg	ID	25,4 ± 4,8 ^a	21,6 ± 3,2 ^a	20,2 ± 3,2 ^a	19,2 ± 3,2	19,2 ± 3,4 ^a	20,8 ± 4,2 ^a
	FD	38,2 ± 3,8 ^a	32,8 ± 2,8 ^a	30,6 ± 2,2 ^a	29,4 ± 2,4 ^a	30,2 ± 3,2 ^a	32,2 ± 3,4 ^a
	MN						2,8 ± 0,6
FIT 2000 mg/kg	ID	34,6 ± 5,2 ^{a,b}	33,4 ± 3,4 ^{a,b}	31,4 ± 4,8 ^{a,b}	30,8 ± 4,2 ^{a,b}	30,2 ± 3,8 ^{a,b}	36,8 ± 4,4 ^{a,b}
	FD	39,8 ± 5,4 ^a	39,2 ± 4,6 ^{a,b}	37,6 ± 2,4 ^{a,b}	36,2 ± 2,8 ^{a,b}	32,4 ± 3,4 ^a	40,6 ± 3,4 ^{a,b}
	MN						3,4 ± 0,6

Valores representam a média ± desvio padrão (n = 3); FIT: fitol; ID: índice de danos; FD: frequência de danos; MN: micronúcleos; p<0,05 comparado ao grupo controle^a no mesmo dia; p<0,05 comparado ao grupo FIT 300 mg/kg^b no mesmo dia (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

Nas Figuras 2 e 3 estão apresentados os índices e frequências de danos ao DNA em células de sangue periférico, medula óssea, fígado e rim dos animais após tratamento subcrônico. As doses do tratamento subcrônico exibiram danos tipo 1 e 2 com maior frequência, seguido pelo tipo 3 e 4, em contraste com o grupo controle, em que o tipo 0 foi o mais frequente. Os níveis de danos 1 a 4 foram mais proeminentes (p<0,05) para a dose de 90 mg/kg, comparado ao controle e à dose de 60 mg/kg. O FIT, em todas as doses do tratamento subcrônico, em células de sangue periférico, medula óssea, rim e fígado induziram genototoxicidade, comparado ao grupo controle.

Além disso, o FIT exibiu aumento dose-dependente do ID e FD em rim e fígado dos animais; enquanto que, em células de sangue periférico, não houve diferença entre as doses administradas. Na medula óssea, as doses de 60 e 90 mg/kg exibiram ID e FD superior à dose de 30 mg/kg (Figuras 2 e 3). Em síntese, o FIT nas doses testadas induziu genotoxicidade em células de sangue periférico, medula óssea, fígado e rim de ratos tratados de formas aguda e subcrônica.



Figura 2. Índice de Danos em ratos tratados com fitol. Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5); FIT: fitol. $p < 0,05$ comparado ao controle^a, FIT 30^b e FIT 60^c (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

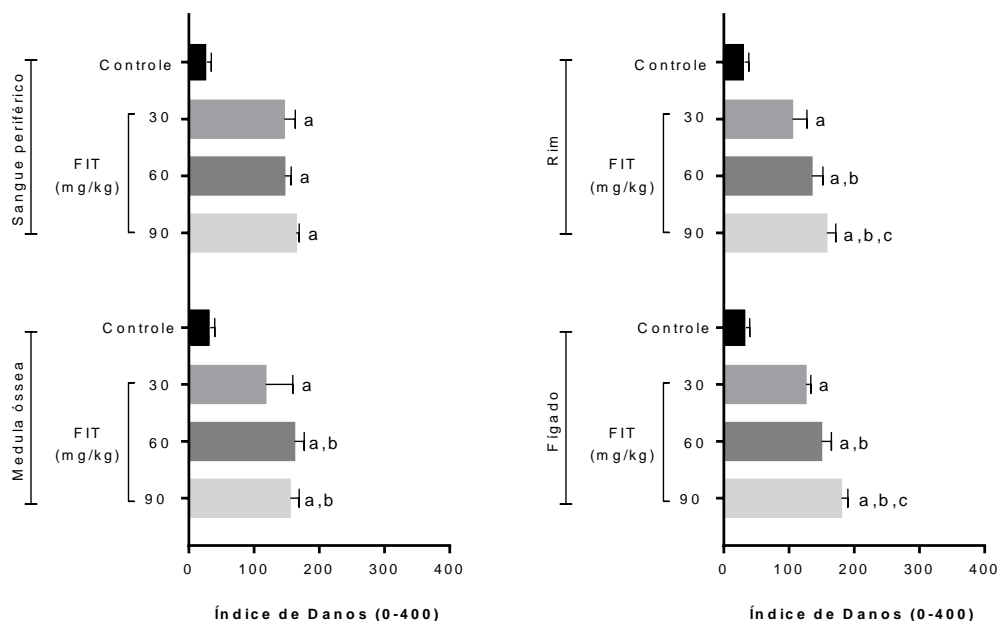
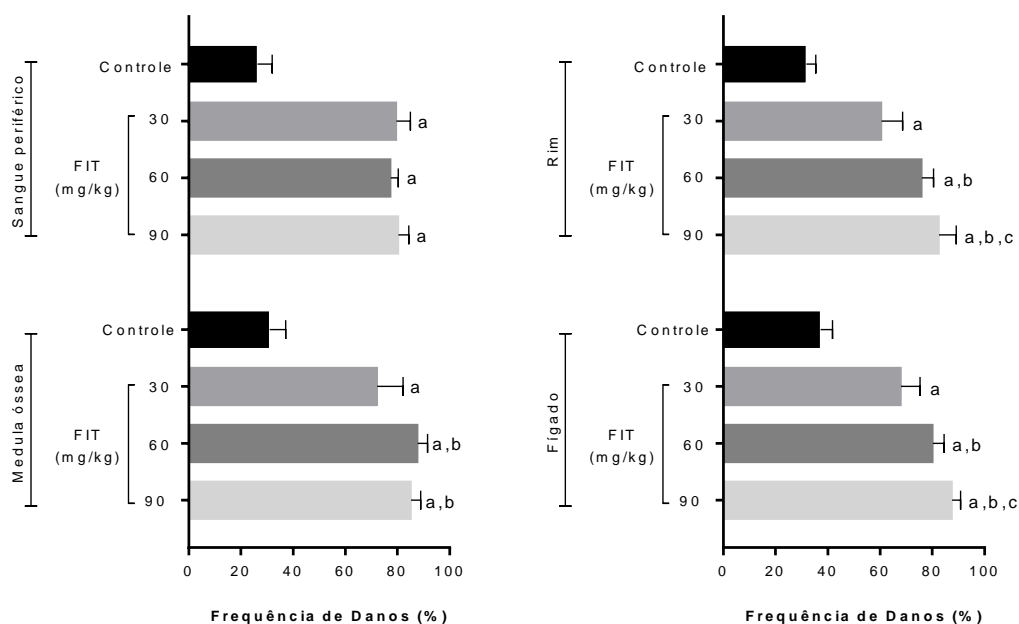


Figura 3. Frequência de Danos em ratos tratados com fitol. Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5); FIT: fitol. $p < 0,05$ comparado ao controle^a, FIT 30^b e FIT 60^c (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).



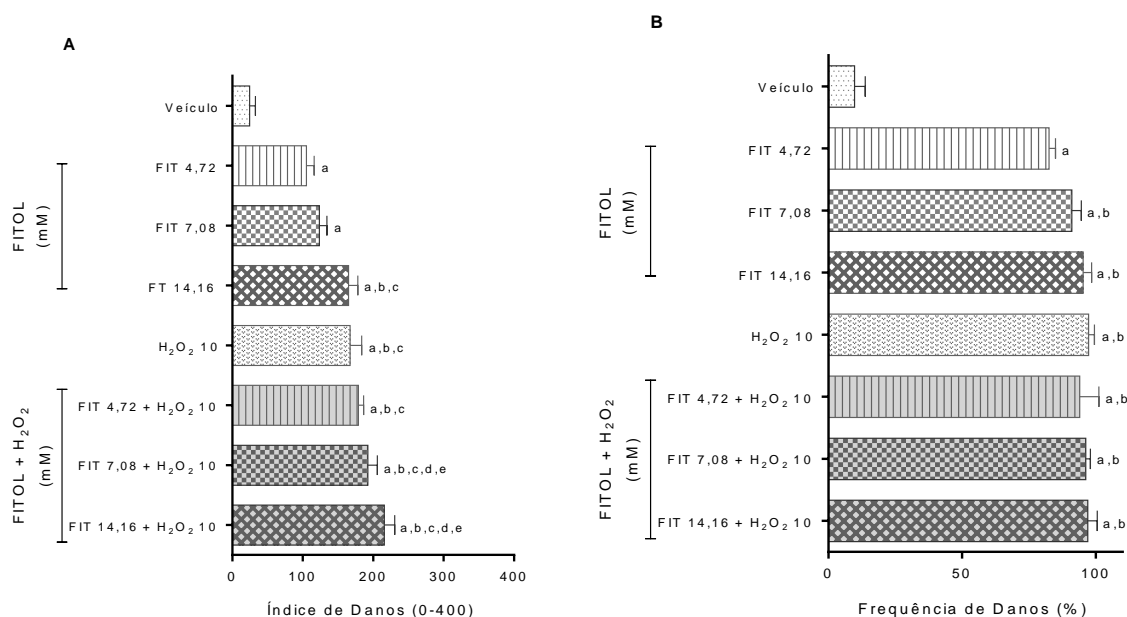
3.8 Avaliação da genotoxicidade do fitol em comparação ao peróxido de hidrogênio

O FIT, nas concentrações testadas, induziu genotoxicidade em exposição *ex vivo* em linfócitos de sangue periférico de ratas, tanto pelo aumento do índice (Figura 4A), como também pela frequência (Figura 4B) de danos. Foram observadas diferenças entre os índices de danos da maior concentração



(14,16 mM) em relação às menores (4,72 e 7,08 mM). Os efeitos do FIT também foram similares aos danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 . No entanto, o FIT (7,08 e 14,16 mM) em cotratamento com peróxido de hidrogênio demonstrou maior índice de danos em comparação ao agente estressor (H_2O_2). Cabe ressaltar que o FIT não teve efeitos antioxidantes.

Figura 4. Genotoxicidade do fitol (4,72; 7,08 e 14,16 mM), em exposição *ex vivo* a linfócitos de sangue periférico de ratas, pelo aumento do índice (A) e frequência de danos ao DNA (B), em comparação ao peróxido de hidrogênio. H_2O_2 : peróxido de hidrogênio. FIT: fitol. ANOVA, uma via, e pós-teste de Tukey. $p < 0,05$, comparado ao veículo ^a, FIT 4,72^b e FIT 7,08^c.



3.9 Correlações entre parâmetros comportamentais e genotóxicos

Com a aplicação do teste de correlação linear de *Pearson* foi possível avaliar as associações entre os parâmetros estudados (Tabela 8). Fortes correlações positivas foram observadas entre autolimpeza e ID em células de sangue periférico e medula óssea, bem como entre cruzamento e ID em células de sangue periférico para as doses de 300 e 2000 mg/kg. Na dose de 300 mg/kg também foi observada forte correlação entre ureia e ID em medula. Para a dose de 2000 mg/kg foi observada correlação positiva entre levantamento e ID em células de sangue periférico. Por outro lado, para o tratamento com doses repetidas, evidenciou-se significantes correlações entre parâmetros comportamentais (cruzamento, autolimpeza e levantamento) com ID em células de sangue periférico, medula óssea, rins e fígado, especialmente para as doses de 60 e 90 mg/kg. Cabe enfatizar que foram observadas correlações entre parâmetros da patologia clínica e urinálise com genotoxicidade no tratamento subcrônico.



Tabela 8. Correlação de *Pearson* entre os parâmetros comportamentais e biomarcadores citogenéticos para instabilidade genética induzida pelo fitol em ratos tratados de forma aguda e subcrônica.

Parâmetros	Tratamento agudo		Tratamento subcrônico		
	300 mg/kg	2000 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg	90 mg/kg
Autolimpeza X ID sp	1.000**	1.000*	- 0.976**		- 0.981**
Autolimpeza X ID mo	1.000**	1.000*	- 0.881*	- 0.885*	
Autolimpeza X ID rm	ns			- 0.989**	
Autolimpeza X ID fg	ns				
Cruzamentos X ID sp	1000*	0.997*		- 0.907*	-0.896*
Cruzamentos X ID mo				0.885*	
Cruzamentos X ID rim			0.984**	- 0.922*	
Cruzamentos X ID fg					- 0.906*
Levantamento X ID sp		0.997*	0.934*	0.953*	- 0.896*
Levantamento X ID mo					- 0.887*
Levantamento X ID rm			-0.941*	0.917*	0.022*
Levantamento X ID fg			0.887*	0.887*	0.906*
Bilirrubina X ID mo	ns			1000*	- 0.940*
Ureia X ID mo	1.000*				- 0.917*
Hemácias X ID rm	ns		0.980*		
AST X ID mo	ns			0.980*	

ID: índice de danos; sp: sangue periférico; mo: medula óssea; rm: rim; fg: fígado; MN: micronúcleos; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. Coeficiente de correlação de *Pearson*. * p<0,05 e ** p<0,001.

4 DISCUSSÃO

Os riscos de toxicidade do FIT, em tratamento agudo e subcrônico, foram avaliados de acordo com a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) *Guidelines* n° 423 e n° 407. Na avaliação hipocrática, os resultados apontaram que o FIT não induziu óbitos. Para o tratamento subcrônico observou-se aumento do consumo de água e micção nos ratos fêmeas. A toxicidade sistêmica de um composto pode ser manifestada por meio de alterações no desenvolvimento ponderal dos animais experimentais, redução do consumo de água e ração e alterações na excreção de urina e fezes (PINTO et al., 2007).

Dados toxicológicos agudos revelaram que o FIT é bem tolerado em roedores (CHOI et al., 1993; ATSHAVES et al., 2004; SAIKIA et al., 2010). Para ratos albinos e normais, a DL₅₀ foi calculada acima de 5 e 10 g/kg (RIFM, 1978). Diterpenos fenólicos podem reduzir o consumo de água e alimentos, alterando a palatabilidade, além de efeitos tóxicos diretos. Estes efeitos podem ser decorrentes da diminuição de hormônios gastrointestinais como o glucagon e o polipeptídeo pancreático, que atuam como neurotransmissores no sistema nervoso central e têm ação periférica mediada por receptores específicos semelhantes ao glucagon (GLP-1) e YY, respectivamente (SANTOS et al., 2013). Evidências indicam que o FIT pode atuar no sistema nervoso (COSTA et al., 2011 e 2014). Assim, em grupos tratados com FIT, o consumo de alimentos pode afetar diretamente o peso corporal, bem como o consumo de água e a micção.



Os testes campo aberto e *rota rod* são amplamente utilizados para verificar o comportamento exploratório e a coordenação motora de animais testados com candidatos a fármacos (MACHADO et al., 2015). Esses experimentos com roedores, em estudos sobre mecanismos neurobiológicos, são similares aos de humanos (RAMOS, 2008; VAN DER STAAY; ARNDT; NORDQUIST, 2009). No teste de campo aberto são observados o número de cruzamento, levantamento e autolimpeza, atribuídos à ação sedativa. Enquanto que no teste *rota rod* é verificado o tempo de permanência e número de quedas da barra giratória, atribuído à ação locomotora (HUERTA-REYES; HERRERA-RUIZ; GONZALEZ-CORTAZAR, 2013; KHAN et al., 2016). No tratamento agudo com FIT ocorreu aumento de cruzamentos no campo aberto, indicando que o composto não apresenta atividade sedativa, observou-se, também, o aumento no número de quedas no *rota rod*, sugerindo uma ação miorelaxante, visto que o animal não conseguiu manter o equilíbrio sobre a barra giratória. Essas alterações comportamentais podem sugerir efeitos tóxicos durante o período de tratamento (HÅNELL; MARKLUND, 2014).

De forma similar ao observado com os cruzamentos, também foi observado que o FIT induziu aumento do comportamento de autolimpeza durante tratamento agudo e nas maiores doses do tratamento subcrônico. O estudo de autolimpeza é de importância para a identificação de vários distúrbios cerebrais (CHEN et al., 2010; ESTANISLAU, 2012). Estudos também apontam que em roedores esse comportamento está associado à excitação (FENTRESS, 1988) e à ansiedade (KYZAR et al., 2011). O ácido fitânico, metabólito do fitol, causa distúrbios em células neuronais por alterar a homeostase de Ca^{2+} , induzir estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, acelerando a morte celular, além de reduzir a produção de ATP (SCHONFELD; REISER, 2016).

Além dos mecanismos citados, há relatos de necroses hepatocelulares, induzidas pelo ácido fitânico, que podem ser relacionadas ao aumento do peróxido de hidrogênio, geração de ERO's, produção de compostos tóxicos intermediários, como o ácido descarboxílico via indução de CYP4A. Além disso, disfunção nas mitocôndrias e acumulação de lipídios em membranas (KOMEN et al., 2007). Cabe enfatizar que os diterpenos derivados de óleos essenciais em alta concentração, devido aos seus efeitos pró-oxidantes, podem aumentar os níveis de ERO's e malondialdeído. Como citado anteriormente, as ERO's, principalmente o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), eventualmente, liga-se aos íons metálicos distribuídos aleatoriamente no DNA, conduzindo a quebras de fitas simples (SAGE; HARRISON, 2011).

A avaliação da homeostase e do desenvolvimento de processos patológicos também pode ser feita por parâmetros hematológicos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM, plaquetas, leucócitos totais, segmentados e linfócitos) e bioquímicos (glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, AST, ALT, e colesterol total) cujos índices são indicativos de toxicidade (OKONKWO et al., 2016). O FIT aumentou a quantidade de neutrófilos e eosinófilos. Estes dados estão de acordo com o estudo desenvolvido por Costa e colaboradores (2012), em camundongos *Swiss*. No tratamento subcrônico com



FIT, em especial para a dose de 90 mg/kg foram observadas alterações renais e hepáticas. Alterações dos valores do ácido úrico, ureia e creatinina, especialmente nas maiores doses dos tratamentos agudo e subcrônico forneceram indícios da disfunção renal dos animais experimentais, cuja elevação de seus níveis plasmáticos indicam sinais de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo proteico (ADEBAYO et al., 2003).

Em estudo *in vivo*, o FIT nas doses de 5, 50 e 400 mg/kg, administrado durante 7 dias em camundongos Swiss não induziu alterações nos parâmetros bioquímicos e patofisiológicos (SAIKIA et al., 2010). Entretanto, nas doses de 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL, o FIT demonstrou toxicidade em camundongos de forma dose-dependente (GHANEIAN et al., 2015). No presente estudo não foram observadas alterações no tamanho dos órgãos, bem como alterações histopatológicas em fígado. Em outro estudo, o FIT 250 mg/kg, provocou alterações histopatológicas com lesões hepáticas, ruptura do cordão hepático e pequenas áreas multifocais de necrose nos hepatócitos, com infiltração precoce de células inflamatórias em camundongos machos e fêmeas (C57BL/6J) (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010).

No estudo também foi observado, especialmente na dose de 90 mg/kg do tratamento subcrônico, aumento em ALT e AST, que são enzimas consideradas sinalizadores sensíveis de dano hepatocelular (BINDER, 2016). O FIT, presente em dietas de animais, está associado com necrose hepatocelular, que induz o aumento de enzimas hepáticas (ALT e AST) (LANDROCK et al., 2017). A oxidação/peroxidação de lipídeos por produtos químicos exógenos é uma das principais causas de lesão hepática (DIRLIK et al., 2009). Por outro lado, em ratos machos *Sprague-Dawley*, o FIT reduziu a expressão e atividade de descarboxilase ACMSD dose-dependente em fígado e hepatócitos primários. A expressão do mRNA de oxidase ACO (um dos alvos do gene PPAR α) foi elevada em grupos tratados com FIT em baixas doses (MATSUDA et al., 2013).

O FIT (0,5 ou 1%) pode ser convertido em ácido fitânico, que pode se ligar a fatores de transcrição. Este, em estudos com camundongos, podem ativar os receptores PPAR α e induzir genes que codificam enzimas que oxidam ácido fático em peroxissomos e mitocôndrias. E ainda levar ao aumento da expressão de catalases e indução de hipertrofia e necroses hepatocelulares (MACKIE et al., 2009), devido ao acúmulo de lipídios em membranas de hepatócitos (KOMEN et al., 2007) sugerindo efeitos oxidativos. Existem relatos sobre a toxicidade dose-dependente do FIT em estudos em camundongos (CHOWDHURY; GHOSH, 2012), e em pele de ratos (GHANEIAN et al., 2015).

A toxicidade também ocorre devido a danos ao DNA que sugerem genotoxicidade, que pode ser avaliada pelo ensaio cometa. Este ensaio vem sendo aplicado na avaliação dos níveis de danos e mecanismos de reparo de DNA (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015), cujo princípio é a migração de fragmentos de DNA durante a eletroforese em gel de agarose (TICE et al., 2000; DUSINSKA; COLLINS, 2008). Na sua versão alcalina, pode detectar sítios álcali lábeis, quebras de fitas e danos oxidativos em



células eucarióticas e procarióticas (SINGH et al., 1988, FAIRBAIRN; OLIVE; NEILL, 1995). Neste estudo, o tratamento com FIT aumentou as frequências de ID e FD em células de sangue periférico, medula óssea, fígado e rim, demonstrando efeitos genotóxicos. Os dados apontam que o FIT é genotóxico, como relatado em outros estudos na dose de 120 mg/kg (v.o.); entretanto, não foi mutagênico em camundongos (KAGOURA et al., 1993).

O FIT, sendo um componente de OEs, em altas concentrações pode atuar como um pró-oxidante e transmitir efeitos prejudiciais sobre as células (ISLAM et al., 2016a). Muitos derivados de OEs podem induzir danos sobre o DNA em consequência da presença do radical hidroxil que, eventualmente, liga-se a íons metálicos aleatoriamente distribuídos no DNA, resultando na indução de quebras de fita simples (SAGE; HARRISON, 2011) e danos oxidativos (RUCINSKA; SOBKOWIAK; GWOZDZ, 2004).

Em estudos de reparo de DNA durante os tratamentos foi possível verificar que os danos induzidos ao DNA, em sangue periférico não foram reparados. Entretanto, em outros estudos do nosso grupo os danos causados ao DNA em meristemas de raízes de *Allium cepa*, foram reparados, mas o tratamento foi feito com o FIT em pequenas concentrações (ISLAM et al., 2017). Os danos genotóxicos podem desencadear instabilidade genômica não reparada e, em nível cromossômico/molecular, podem causar mutações no DNA (ZHANG et al., 2014). Isto pode ser decorrente da capacidade de ruptura de cromossomos, rearranjo e perda, não disjunção e amplificação de genes, resultando na formação de micronúcleos, principalmente a partir de rupturas cromossômicas ou cromossomos inteiros que falham em serem segregados durante o fuso mitótico quando a célula se divide (SCOTT; EVANS, 1967; BHATIA; KUMAR, 2013).

Assim, o teste de micronúcleos assume importância para detectar agentes mutagênicos com atividades clastogênicas e/ou aneugênicas (RIM; KIM, 2015; NETO et al., 2016). Entretanto, o FIT não aumentou a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea de ratos, sugerindo que, os tratamentos e doses testadas, não induzem mutagenicidade. O FIT foi considerado não mutagênico em *Salmonella typhimurium*, como também em camundongos, em baixas doses (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010).

O FIT, assim como o H_2O_2 , pode induzir danos oxidativos (Figura 4) por mecanismos similares a exemplo da baixa regulação de Bcl-2, superregulação de Bax e ativação de caspases-9 e -3 (SONG; CHO, 2015; ISLAM et al., 2017), como apontado também para o H_2O_2 , que pode induzir apoptose e necrose por interferência na expressão de proteínas pró-apoptóticas caspases-8, caspases-9, caspases-3 e Bcl2 (LIMA et al., 2014). O fitol tem um grupo OH no seu carbono (C1) e os compostos com grupos OH ativos, tais como diterpenoides, podem apresentar citotoxicidade por danos oxidativos (GYAWALI; IBRAHIM, 2014). O H_2O_2 é um dos principais metabólitos redox em condições fisiológicas (1-10 nM), mas em concentrações >100 nM leva a danos às macromoléculas, incluindo o DNA, caracterizando o



estresse oxidativo, levando à toxicidade celular (SIESA, 2017). Estudos em fibroblastos humanos mostraram indução de apoptose por interferência na expressão de citocromo c, Bcl-2, Bax, Bid e caspase-3 (GUTIÉRREZ-VENEGAS et al., 2015), com eficácia citotóxica em uma ampla gama de concentrações, e por alterações na expressão das proteínas caspase-9, p53, NF- κ B e RIP podendo atuar em apoptose e em necrose (XIANG et al., 2016; LENNICKE et al., 2015).

O ácido fitânico, metabólito do FIT, inibe a histona deacetilase (Hdac2) e induz morte celular, com efeitos citotóxicos associados à caspase-9, como observado em células neuronais (NAGAI, 2015), como também pode gerar ERO's durante a β -oxidação (TAMATANI et al., 1999), podendo levar ao estresse oxidativo com potencial para danificar o DNA (STADELMANN-INGRAND et al., 2004). Além de induzir apoptose e necrose, o FIT devido sua alta hidrofobicidade, atravessa facilmente as membranas celulares e mitocondriais, causando a perda de elementos essenciais à célula, alterando o potencial de membrana, neutralizando espécies reativas, mas também pode induzir autodestruição de estruturas celulares, como proteínas, lipídeos e DNA; o que leva à cito/genotoxicidade e à disfunção mitocondrial (ISLAM et al., 2016b).

Associado a esses mecanismos, o FIT também induz aumento na expressão de PPAR dependente da atividade de luciferase em células HepG2 de forma direta, independente do seu metabólito ácido fitânico (GOTO et al., 2005). O FIT pode atuar com efeitos antagônicos e/ou contraditórios, pois, em altas concentrações, tem ação como pró-oxidante; e, em menores concentrações, tem atividades antioxidante e citoprotetora em diversos sistemas teste (BAKKALI et al., 2008; ISLAM et al., 2016a). Assim, o FIT, dependendo de suas concentrações, em organismos testes pode ser constituinte químico para formulações farmacêuticas como antitumoral; e ainda, na prevenção e/ou indução de estresse oxidativo (ISLAM et al., 2016a).



5 CONCLUSÃO

O FIT, nas doses agudas de 300 e 2000 mg/kg, assim como em doses repetidas de 60 e 90 mg/kg, induz toxicidade em ratos como demonstrado por diversos parâmetros toxicológicos. Também foram observadas alterações comportamentais, especialmente nas maiores doses testadas, que são compatíveis com excitação e/ou sedação, estresse e ansiedade. Algumas alterações indicativas de anemia, linfopenia neutrofilia e eosinofilia foram observadas no perfil hematológico. Nas avaliações em enzimas renais e hepáticas foram verificadas alterações para ureia, creatinina, AST e ALT, bem como aumento de proteína e nitrito na urina, além da presença de bilirrubina nas duas maiores doses repetidas. Não foram observadas alterações no peso dos órgãos e histologia hepática. Os resultados do biomonitoramento citogenético de ratos tratados com FIT, de forma aguda e subcrônica, apontou genotoxicidade em medula óssea, sangue periférico, fígado e rim pelo significativo aumento do índice e frequência de danos ao DNA, que durante os tratamentos não foram reparados. Entretanto, não foi observado riscos para mutagenicidade. Estudos devem ser feitos para a caracterização dos mecanismos das alterações comportamentais e de instabilidade genética que podem ser associadas, também, ao estresse oxidativo para o uso do FIT em formulações farmacêuticas.



REFERÊNCIAS

- ADEBAYO, J.O.; YAKUBU, M.T.; EGWIM, E.C.; OWOYELE, V.B.; ENAIBE, B.U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 1, p. 69-72, 2003.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia, Brasília, DF, p. 1-48, 2013.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.
- ARNHOLD, T.; ELMAZAR, M.M.A; NAU, H. Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-transretinoic acid. **Toxicology Science**, v. 66, n. 1, pp. 274-282, 2002.
- ATSHAVES, B.P.; PAYNE, H.R.; MCINTOSH, A.L.; S.E. TICHY, S.E.; RUSSELL, D.; KIER, A. B.; Schroeder, F. Sexually dimorphic metabolism of branched-chain lipids in C57BL/6J mice. **Journal of Lipid Research**, v.45, n.1, pp. 812-830, 2004.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-75, 2008.
- 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, 2010. p. 113-151.
- 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.
- BERO, J.; BEAUFAY, C.; HANNAERT, V.; HÉRENT, M.F.; MICHELS, P.A.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antitrypanosomal compounds from the essential oil and extracts of *Keetia leucantha* leaves with inhibitor activity on *Trypanosoma brucei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3-4, p. 270-4, 2013.
- BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. **APMIS**, v. 121, n. 7, p. 569-81, 2013.
- BINDER, C. Does acute alcohol intoxication cause transaminase elevations in children and adolescents?. **Alcohol**, v. 51, p. 57-62, 2016.
- CHEN, S. K.; TVRDIK, P.; PEDEN, E.; CHO, S.; WU, S.; SPANGRUDE, G.; CAPECCHI, M. R. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. **Cell**, v. 141, n. 5, p. 775-785, 2010.
- CHOI, Y.H.; AHN, S.J.; PARK, K.Y.; YOO, M.A.; LEE, W.H. Effects of phytol on the mutagenicity of UV and EMS in salmonella and drosophila mutation assaying systems. **Environmental Mutagenesis Carcinogenesis**, v. 13, n. 1, pp. 92-100, 1993.
- CHOWDHURY, R.R.; GHOSH, S.K. Phytol-derived novel isoprenoid immunostimulants. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 49, 2012.
- CORTÉS-GUTIÉRREZ, E.I.; HERNÁNDEZ-GARZA, F.; GARCÍA-PÉREZ, J.O.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M.I.; AGUADO-BARRERA, M.E.; CERDA-FLORES, R.M. Evaluation of DNA single and double strand



breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

COSTA, J.P.; COSTA, D.A.; ALMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M.; SOUSA, D.P.; FORTES, A.C. et al. Applications of Phytol in Pharmaceutical Formulations Anxiolytic and Antidepressant Properties, BRPI1106397, 2011.

COSTA, J.P.; DE OLIVEIRA, G.A.; DE ALMEIDA, A.A.; ISLAM, M.T.; DE SOUSA, D.P.; DE FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, p. 34-42, 2014.

COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; DE SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R.M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**, v. 523, n. 1, pp. 115-118, 2012.

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.

DIRLIK, M.; KARAHAN, A.; CANBAZ, H.; CAGLIKULEKCI, M.; POLAT, A.; TAMER, L.; AYDIN, S. Effects of sulfasalazine on lipid peroxidation and histologic liver damage in a rat model of obstructive jaundice and obstructive jaundice with lipopolysaccharide-induced sepsis. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, v. 70, n. 4, p. 299-315, 2009.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 191-205, 2008.

ELGENGAHI, 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.

ELMAZAR, M.M.; EL-ABHAR, H.S.; SCHAAALAN, M.F.; FARAG, N.A. Phytol/Phytanic acid and insulin resistance: potential role of phytanic acid proven by docking simulation and modulation of biochemical alterations. **PLoS One**, v. 8, n. 1, 2013.

ESTANISLAU, C. Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. **Psychology & Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 105-112, 2012.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FENTRESS, J.C. Expressive contexts, fine structure, and central mediation of rodent grooming. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 525, n. 1, p. 18-26, 1988.

GAFTER-GVILI, A.; ZINGERMAN, B.; ROZEN-ZVI, B.; ORI, Y.; GREEN, H.; LUBIN, I. et al. Oxidative stress-induced DNA damage and repair in human peripheral blood mononuclear cells: protective role of hemoglobin. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.

GHANEIAN, M.T.; EHRAPOUSH, M.H.; JEBALI, A.; HEKMATIMOUGHADDAM, S.; MAHMOUDI, M. Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 2, n. 1, p. 13-16, 2015.

GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5319-5341, 2012.

GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KATO, S.; EGAWA, K.; EBISU, S.; MORIYAMA, T. et al. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and regulates gene expression



involved in lipid metabolism in PPAR α -expressing HepG2 hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 2, p. 440-5, 2005.

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. GE01-5, 2015.

GUO, J.; YUAN, Y.; LU, D.; DU, B.; XIONG, L.; SHI, J.; YANG, L.; LIU, W.; YUAN, X.; ZHANG, G.; WANG, F. Two natural products, trans-phytol and (22E)-ergosta-6,9,22-triene-3 β ,5 α ,8 α -triol, inhibit the biosynthesis of estrogen in human ovarian granulosa cells by aromatase (CYP19). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.15, n. 1, pp. 23-32, 2014.

GUTIÉRREZ-VENEGAS, G.; GUADARRAMA-SOLÍS, A.; MUÑOZ-SECA, C.; ARREGUÍN-CANO, J.A. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gingival fibroblasts. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 12, p. 15563-15572, 2015.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HÄNELL, A.; MARKLUND, N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.8, p. 252, 2014.

HUERTA-REYES, M.; HERRERA-RUIZ, M.; GONZALEZ-CORTAZAR, M.; ZAMILPA, A.; LEON, E.; REYES-CHILPA, R.; TORTORIELLO, J. Neuropharmacological in vivo effects and phytochemical profile of the extract from the aerial parts of *Heteropterys brachiata* (L.) DC. (Malpighiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 311-317, 2013.

HYUN, S.Y.; JANG, Y.J. p53 activates G1 checkpoint following DNA damage by doxorubicin during transient mitotic arrest. **Oncotarget**, v. 6, n. 7, p. 4804, 2015.

INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; et al. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1770-1774, 2005.

ISLAM, M. T.; STRECK, L.; DE ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, S. W. C.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DA COSTA JUNIOR, J. S. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, v. 177, p. 93-101, 2017.

ISLAM, M.T.; DE ALENCAR, M.V.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A.A.; DE SOUSA, D.P.; DE FREITAS, R.M. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 5, n. 240, pp. 60-73, 2015.

ISLAM, M.T.; SANTOS, J.V.O.; FERREIRA, J.R.O.; SOUSA, J.M.C.; PAZ, M.F.C.J.; CARVALHO, R.M.C. et al. A Possible Phytol-cytoprotective Trait through Reactive Species-Induced Oxidative Stress Ebbing Pathway. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-11, 2016b.

ISLAM, M.T.; STRECK, L.; PAZ, M.F.C.J.; SOUSA, J.M.C.; ALENCAR, M.V.O.B.; MATA, A.M.O.F. et al. Preparation of phytol-loaded nanoemulsion and screening for antioxidant capacity. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-15, 2016a.

KADEKAR, S.; PEDDADA, S.; SILINS, I.; FRENCH, J. E.; HÖGBERG, J.; STENIUS, U. Gender differences in chemical carcinogenesis in National Toxicology Program 2-year bioassays. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 8, p. 1160-1168, 2012.

KAGOURA, M.; MATSUI, C.; MOROHASHI, M. Carcinogenicity study of phytol (3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) in ICR mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, n.460, 1993.



- 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. 277-88, 2013.
- KHAN, A. A.; SIDDIQUI, N.; AKHTAR, M.; ALI, Z.; YAR, M. S. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 6-(2-Amino-substituted phenyl)-4-(substituted phenyl)-1, 2, 4-triazine-3, 5 (2H, 4H)-dione Derivatives as Anticonvulsant Agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 349, n. 4, p. 277-292, 2016.
- KIRKIM, G.; OLGUN, Y.; AKTAS, S.; KIRAY, M.; KOLATAN, E.; ALTUN, Z. et al. Is there a gender-related susceptibility for cisplatin ototoxicity? **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 272, n. 10, p. 2755-63, 2015.
- KLAPACZ, J.; POTTENGER, L.H.; ENGELWARD, B.P.; HEINEN, C.D.; JOHNSON, G.E.; CLEWELL, R.A. et al. Contributions of DNA repair and damage response pathways to the non-linear genotoxic responses of alkylating agents. **Mutation Research**, v. 767, p. 77-91, 2016.
- KOMEN, J.C.; DISTELMAIER, F.; KOOPMAN, W.J.; WANDERS, R.J.; SMEITINK, J.; WILLEMS, P.H. Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 3271–3281, 2007.
- KYZAR, E.; GAIKWAD, S.; ROTH, A.; GREEN, J.; PHAM, M.; STEWART, A. et al. Towards high-throughput phenotyping of complex patterned behaviors in rodents: focus on mouse self-grooming and its sequencing. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 2, p. 426-31, 2011.
- LANDROCK, D.; MILLIGAN, S.; MARTIN, G.G.; MCINTOSH, A.L.; LANDROCK, K.K.; SCHROEDER, F.; KIER, A.B. Effect of Fabp1/Scp-2/Scp-x Ablation on Whole Body and Hepatic Phenotype of Phytol-Fed Male Mice. **Lipids**, v. 52, n. 5, p. 385-397, 2017.
- LEIPNITZ, G.; AMARAL, A.U.; ZANATTA, A.; SEMINOTTI, B.; FERNANDES, C.G.; KNEBEL, L.A. et al. Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats. **Life Science**, v. 87, n. 9-10, p. 275-80, 2010.
- LENNICKE, C.; RAHN, J.; LICHTENFELS, R.; WESSJOHANN, L. A.; SELIGER, B. Claudia et al. Hydrogen peroxide–production, fate and role in redox signaling of tumor cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 13, n. 1, p. 39, 2015.
- LIM, S.Y.; MEYER, M.; KJONAAS, R.A.; GHOSH, S.K. Phytol-based novel adjuvants in vaccine formulation: 1. assessment of safety and efficacy during stimulation of humoral and cell-mediated immune responses. **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**, v. 4, n. 6, 2006.
- LIMA, A.P.; PEREIRA, F.C.; ALMEIDA, M.A.; MELLO, F.M.; PIRES, W.C.; PINTO, T.M. et al. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.
- MACHADO, K.C.; OLIVEIRA, G.L.; MACHADO, K.C.; ISLAM, M.T.; JUNIOR, A.L.; 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. 273-9, 2015.
- MACKIE, J.T.; ATSHAVES, B.P.; PAYNE, H.R.; MCINTOSH, A.L.; SCHROEDER, F. Phytol-induced hepatotoxicity in mice. **Toxicologic Pathology**, v. 37, p. 201-208, 2009.
- MALLA, B.; GAUCHAN, D.P.; CHHETRI, R.B. An ethnobotanical study of medicinal plants used by ethnic people in Parbat district of western Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 165, p. 103-117, 2015.



- MATSUDA, H.; GOMI, R.T.; HIRAI, S.; EGASHIRA, Y. Effect of dietary phytol on the expression of α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase, a key enzyme of tryptophan-niacin metabolism, in rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 7, p. 1416-9, 2013.
- MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, Suppl 3, p. S59-63, 2010.
- MORAES, G.P.; ALENCAR, M.V.O.B.; ISLAM, M.T.; ARAÚJO, S.; SOBRAL, A.P.; MACHADO, K.C.; AGUIAR, R.P.S.; GOMES JÚNIOR, A.L.; CORRÊA, D.; PAZ, M.F.C.J.; FERREIRA, P.M.P.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; FERRAZ A.; GRIVICICH, I.; PICADA, J.N. Cytogenotoxic and oxidative status evaluation of *Morinda citrifolia*. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-13, 2016.
- MORAES, J.; DE OLIVEIRA, R. N.; COSTA, J. P.; JUNIOR, A. L.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; PINTO, P. L. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease Schistosomiasis mansoni. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2617, 2014.
- NAGAI, K. Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation and mitochondrial dysfunction. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 48, p. 33-9, 2015.
- NETO, M.P.L.; GOMES, D.C.V.; JÚNIOR, A.L.G.; PAZ, M.F.C.J.; ALENCAR, M.V.O.B.; ISLAM, M.T. et al. Toxicogenetic evaluation of an imidazolidine derivative PT-31. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, p. 1043-1048, 2016.
- OECD, **Test Guideline TG-407**. 2008. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en> Acesso em 20 setembro de 2017.
- OECD, **Test Guideline TG-423**. 2002. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en> Acesso em 20 setembro de 2017.
- OKONKWO, C.O.J.; EHILEBOH, A.D.; NWOBODO, E.; DIKE, C.C. The effects of acute gasoline vapour inhalation on some haematological indices of albino Wistar rats. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 2, p. 123-125, 2016.
- PEJIN, B.; SAVIC, A.; SOKOVIC, M.; GLAMOCLIIJA, J.; CIRIC, A.; NIKOLIC, M.; RADOTIC, K.; MOJOVIC, M. Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. **Natural Product Research**, v. 28, n. 6, pp. 372-376, 2014.
- PETER O. Phytol as a Cholesterol Lowering Agent, US20140073703, 2014.
- PINTO, M.V.; MELLO, F.B.; ROBERTO, J.; MELLO, B. Avaliação toxicológica de preparação fitoterápica contendo Piper methysticum Forst Piperaceae (Kava Kava ®) sobre o desenvolvimento pré-natal em ratos Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 818-824, 2007.
- PONGPRAYOON, U.; BAECKSTRÖM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTRÖM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-PHY isolated from Ipomoea pes-caprae. **Planta Medica**, v. 58, p. 19-21, 1992.
- RAMOS, M. L. C.; GRAGNANI, A.; FERREIRA, L. M. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? **Journal of Burn Care & Research**, v. 29, n. 2, p. 363-368, 2008.
- RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.). **Acute Toxicity Studies on Phytol**. RIFM Report Number 4455, 20 July, RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA. 1978.



- 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.
- RUCIŃSKA, R.; SOBKOWIAK, R.; GWÓŹDŹ, E.A. Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 9, n. 3, p. 519-528, 2004.
- SAGE, E.; HARRISON, L. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: relevance to mutagenesis and cell survival. **Mutation Research**, v. 711, n. 1-2, p. 123-33, 2011.
- SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA, D.; OJHA, S.; KUMAR, J.K.; CHANOTIYA, C.S.; et al. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 508-12, 2010.
- SANTOS, C.C.M.P.; SALVADORI, M.S.; MOTA, V.G.; COSTA, L.M.; ALMEIDA, A.A.C.; OLIVEIRA, G.A.L.; COSTA, J.P.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. **Neuroscience Journal**, v. 2013, n. 1, pp. 1-9, 2013.
- SCHÖNFELD, P.; REISER, G. Brain Lipotoxicity of Phytanic Acid and Very Long-chain Fatty Acids. Harmful Cellular/Mitochondrial Activities in Refsum Disease and X-Linked Adrenoleukodystrophy. **Aging Disease**, v. 7, n. 2, p. 136-49, 2016.
- SCOTT, D.; EVANS, H.J. X-ray-induced chromosomal aberrations in vicia faba: changes in response during the cell cycle. **Mutation Research**, v. 4, p. 579-599, 1967.
- SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, p. 613-619, 2017.
- SILVA, R.O.; SOUSA, F.B.; DAMASCENO, S.R.; CARVALHO, N.S.; SILVA, V.G.; OLIVEIRA, F.R. et al. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 455-64, 2014.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.
- SONG, Y.W.; CHO, S.K. Phytol Induces Apoptosis and ROS-Mediated Protective Autophagy in Human Gastric Adenocarcinoma AGS Cells. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 211, 2015.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Molecular Toxicology Protocols**, p. 85-95, 2005.
- STADELMANN-INGRAND, S.; PONTCHARRAUD, R.; FAUCONNEAU, B. Evidence for the reactivity of fatty aldehydes released from oxidized plasmalogens with phosphatidylethanolamine to form Schiff base adducts in rat brain homogenates. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 131, n. 1, p. 93-105, 2004.
- STAPPEN, I.; TABANCA, N.; ALI, A.; WEDGE, D. E.; WANNER, J.; KAUL, V. K.; JIROVETZ, L. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils from Wild Growing Aromatic Plant Species of *Skimmia laureola* and *Juniperus macropoda* from Western Himalaya. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 6, p. 1071-1074, 2015.
- TAMATANI, M.; CHE, Y.H.; MATSUZAKI, H.; OGAWA, S.; OKADO, H.; MIYAKE, S. et al. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 13, p. 8531-8, 1999.



TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

VAN DER STAAY, F.J.; ARNDT, S.S.; NORDQUIST, R.E. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. **Behavioral and Brain Functions**, v. 5, n. 11, 2009.

VILLAIN, J.; MINGUEZ, L.; HALM-LEMEILLE, M.P.; DURRIEU, G.; BUREAU, R. Acute toxicities of pharmaceuticals toward green algae. mode of action, biopharmaceutical drug disposition classification system and quantile regression models. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 337-343, 2016.

WARHEIT, D. B.; BROWN, S. C.; DONNER, E. M. Acute and subchronic oral toxicity studies in rats with nanoscale and pigment grade titanium dioxide particles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 208-224, 2015.

WITTAYALAI, S.; MAHIDOL, C.; PRACHYAWARAKORN, V.; PRAWAT, H.; RUCHIRAWAT, S. Terpenoids from the roots of *drypetes hoaensis* and their cytotoxic activities. **Phytochemistry**, v. 99, p. 121-126, 2014.

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

ZHANG, Q.; MATZKE, M.; SCHEPMOES, A.A.; MOORE, R.J.; WEBB-ROBERTSON, B.J.; HU, Z. et al. High and low doses of ionizing radiation induce different secretome profiles in a human skin model. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014.

Capítulo 3

Alterações citogenéticas indicativas de atividade antitumoral do fitol em cultura primária de Sarcoma 180 e em linhagem HL-60

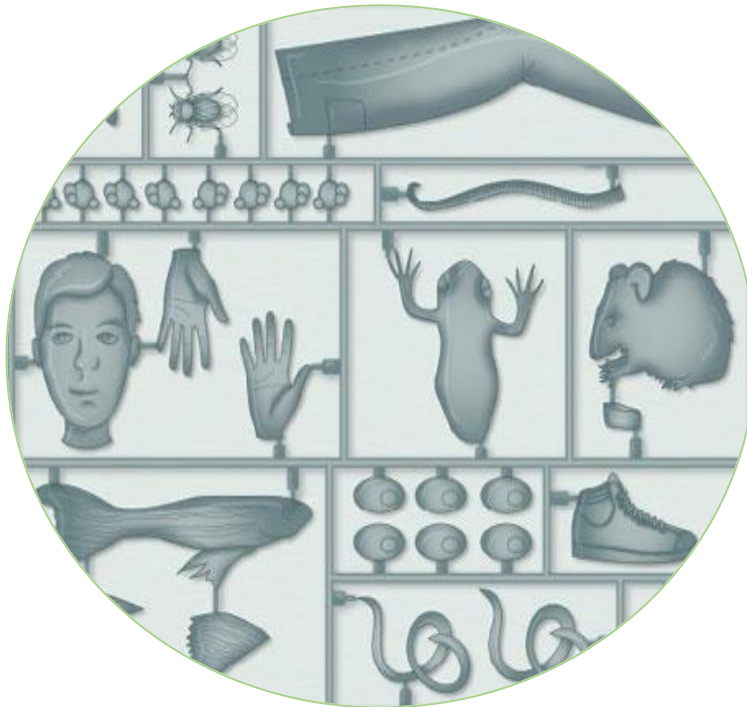


Ilustração de Lara Crow, “Kit de modelos”, adaptada do periódico *Nature Reviews Cancer* (2010)

“Na ciência, há um modelo para tudo, menos para a imaginação humana” (Alencar, M.V.O.B.)



Alterações citogenéticas indicativas de atividade antitumoral do fitol em cultura primária de Sarcoma 180 e em linhagem HL-60

Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Antonielly Campinho dos Reis, Rosália Maria Torres de Lima, José Victor de Oliveira Santos, Antonio Lima Braga, José Roberto de Oliveira Ferreira, Muhammad Torequl Islam, João Marcelo de Castro e Sousa, Paulo Michel Pinheiro Ferreira e Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Artigo submetido ao periódico *Journal of Cellular Biochemistry* (ANEXO D)

QUALIS A2 – Biotecnologia

Resumo

O fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol) é um diterpenoide com diversas propriedades farmacológicas. Esse estudo avaliou os efeitos do fitol em cultura primária de Sarcoma 180, linhagem leucêmica humana (HL-60), bem como em linfócitos de sangue periférico de ratos, por mecanismos citotóxicos e citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose. As células foram tratadas com fitol (4,72; 7,08 e 14,16 μM) e submetidas aos ensaios de citotoxicidade por Azul de Tripan e MTT (viabilidade celular), bem como ao ensaio cometa e teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. A doxorrubicina (2 $\mu\text{g/mL}$) e o peróxido de hidrogênio (10 mM) foram utilizados como controle positivo. A citotoxicidade do fitol foi observada em Sarcoma 180 e em HL-60 pela diminuição de viabilidade celular e dos índices de divisão celular, incluindo a apoptose e necrose. A genotoxicidade nas concentrações usadas foi pontuada pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA nos modelos testados. O fitol, em todas as concentrações, induz mecanismos aneugênicos e/ou clastogênicos em Sarcoma 180 e em HL-60, por indução de micronúcleos, como também outras anormalidades nucleares, tais como pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares. O fitol, em todas as concentrações, também induziu apoptose nos modelos utilizados. No entanto, a indução de necrose foi observada apenas na concentração de 14,16 μM para HL-60. O fitol é um candidato a formulações farmacêuticas antitumorais devido sua citotoxicidade e por mecanismos citogenéticos associados com instabilidade genética, incluindo morte celular por apoptose e necrose.

Palavras-chave: fitol, genotoxicidade, apoptose, necrose, Sarcoma 180, HL-60.



1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma das maiores causas de mortalidade no mundo (FERLAY et al., 2015) e tem etiologia complexa, com envolvimento de diversos mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares (OUYANG et al., 2012; SWARTZ et al., 2012). Os sarcomas são neoplasias malignas heterogêneas, de origem mesenquimal, que podem ocorrer em vários tecidos, tais como osteossarcomas, rabdomiossarcomas e lipossarcomas. O estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na doença, investigados em diferentes modelos, contribui para o avanço das terapias dessas neoplasias (POST, 2012). Geralmente complexos, os sarcomas implicam múltiplas alterações cromossômicas numéricas e estruturais, especialmente em sarcomas epiteliais. Assim, pesquisas são necessárias para elucidar danos citogenéticos (HUSAIN; VERMA, 2011; TAYLOR et al., 2013).

As leucemias são desordens hematopoiéticas que também ainda necessitam de entendimentos biológicos e moleculares. Estas elucidações podem ser estudadas em linhagens celulares, a exemplo da HL-60, para a busca de novos compostos naturais com efeitos antitumorais (CHIEN et al., 2017). Cabe enfatizar que existem similaridades entre animais e humanos quanto ao comportamento biológico, resposta à terapia e a agentes citotóxicos (CEKANOVA; RATHORE, 2014). O desenvolvimento dos fármacos ainda se constitui como um desafio para a terapia oncológica devido a diversos aspectos, incluindo o fato da heterogeneidade genética do câncer que leva a muitas resistências às terapias (SAMADI et al., 2015).

Diversos estudos com fitoquímicos apontam para atividades antitumorais de produtos naturais, por indução de apoptoses e inibição de proliferação celular (BEEVI et al., 2010; WU et al., 2017). Vários diterpenos e seus derivados foram relatados para atividades citotóxicas e genotóxicas em diferentes sistemas teste, a exemplo do manool extraído da *Salvia officinalis* (NICOLELLA et al., 2014), do paclitaxel (TURKEZ et al., 2010), ácido 7,15-trien-3-óico (DI SOTTO et al., 2012) e taxodiona (KUŽMA et al., 2016).

O fitol (FIT) é um diterpenoide, componente de óleo essencial, com muitos efeitos biológicos (ISLAM et al., 2015; ISLAM et al., 2016). Há relatos de que o composto apresenta atividades antiespasmódica (PONGPRAYOON et al., 1992), antimutagênica (KAGOURA; MATSUI; MOROHASHI, 1993), antiteratogênica (ARNHOLD; ELMAZAR; NAU, 2002), antimicrobiana (INOUE et al., 2005), imunoadjuvante (LIM et al., 2006), antiepiléptica (COSTA et al., 2012), antiprotozoária (BERO et al., 2013), anti-inflamatória (SILVA et al., 2014), antioxidante (PEJIN et al., 2014), antidiabética (ELMAZAR et al., 2013), hipolipemiante (HOLMDAHL; HULTQVIST; OLOFSSON, 2011), antinociceptiva (SANTOS et al., 2013) antidepressiva (COSTA et al., 2011), bem como citotóxica, genotóxica e mutagênica (ISLAM et al., 2015; ISLAM et al., 2016).



A instabilidade cromossômica e os danos ao DNA estão bem associados a diversas doenças, especialmente o câncer. Portanto, as anormalidades citogenéticas são importantes para o entendimento dos mecanismos da tumorigênese (GRADE; DIFILIPPANTONIO; CAMPS, 2015). As alterações citogenéticas envolvem aneuploidia, deleções, inserções, quebras e perdas de cromossomos (SAMUELSON et al., 2012; GIAM; RANCATI, 2015). O teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) pode determinar níveis de danos citogenéticos de vários agentes citotóxicos em células binucleadas (FENECH, 2006; FENECH et al., 2011; NAKAMURA et al., 2016). Em outras abordagens, o ensaio cometa pode detectar danos mais simples ao DNA, não detectáveis em ensaio cromossômicos, a exemplo de quebras de fitas simples e duplas (KAWAGUCHI et al., 2010), como também danos oxidativos (FANG et al., 2015; DAVISON, 2016). O estudo teve por objetivo a avaliação dos possíveis efeitos antitumorais do FIT, por mecanismos citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose em cultura primária de Sarcoma 180 (S-180) e em linhagem leucêmica humana (HL-60), por meio da aplicação do ensaio cometa e CBMN.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes químicos utilizados no estudo

O diterpenoide FIT foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). 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_2O_2) foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (São Paulo, Brasil). O FIT foi solubilizado em três diferentes concentrações (4,72; 7,08 e 14,16 μM), utilizando os solventes Tween 80 0,05% e Cloreto de Sódio 0,9%, conforme estudo anterior sobre citotoxicidade (ISLAM et al., 2017). A Dox foi utilizada em uma única concentração (2 $\mu g/mL$, solubilizada em dH_2O). O H_2O_2 foi preparado a uma concentração final de 10 mM (diluído em dH_2O).

2.2 Cultura primária de Sarcoma 180

As células de S180 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 (4×10^6 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 e controles.

2.3 Cultivo de linhagem HL-60

No laboratório, as células HL-60 foram armazenadas em nitrogênio líquido até o uso. A linhagem foi descongelada por suave agitação de seus recipientes durante 2 min em banho-maria a 37°C. Após o descongelamento, o conteúdo de cada recipiente contendo as células foi transferido para um frasco de cultura e diluído com até 10 mL de meio RMPI 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). Os frascos de cultura (contendo 2×10^6 células viáveis) foram observados sob o microscópio invertido, seguido de incubação em estufa a 37°C, umidade de 95% e com atmosfera de CO₂ a 5%. Periodicamente, as culturas foram diluídas e mantidas nas mesmas condições com uma densidade de 5×10^5 células/mL e colhidas na fase exponencial de crescimento (YEDJOU et al., 2010).

2.4 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.

2.5 Viabilidade celular pelo método do MTT em linhagem HL-60

O ensaio do MTT foi realizado de acordo com Mosmann (1983). As células foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades, numa densidade de $0,8 \times 10^6$ células/mL. As substâncias teste e controles foram incubadas durante 68 horas juntamente com as células. Após o período de incubação, foi adicionado às culturas, 20 µL da solução de MTT (5 mg/mL) e reincubadas durante 4h em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as placas, cuidadosamente, armazenadas ao abrigo da luz, sendo deixadas *overnight* para secagem completa. Posteriormente, o precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de álcool isopropílico. Para a quantificação do sal reduzido nas



células vivas, as absorbâncias foram analisadas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm.

2.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese

O CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI 1640 (fiohemaglutinina 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) e HL-60 ($0,8 \times 10^6$ células/mL). Em cada frasco de cultura foram acrescidas 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 72h, 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. O índice de divisão nuclear (IDN) foi calculado por meio da seguinte fórmula: $\text{IDN} = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4)/N$, onde M1-M4, representa o número de células viáveis com 1-4 núcleos e N*, o número total de células viáveis. Além disso, o índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade (IDNC) foi calculado de acordo com a seguinte equação: $\text{IDNC} = (Ap + Nec + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4))/N^*$, onde Ap representa o número de células em apoptose; Nec, o número de células em necrose; M1-M4, o número de células viáveis com 1-4 núcleos; e N*, o número total de células viáveis e não viáveis, de acordo com Fenech (2000).

2.7 Ensaio cometa

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Speit e Rothfuss (2012). Aliquotas 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 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: $ID = \sum (\text{número de células em determinada classe de dano} \times \text{classe de dano})$, que variou de 0 a 400 e FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - \text{nº de células classe 0}$.

2.8 Estudo de mecanismo para genotoxicidade pelo cotratamento com H₂O₂

Neste experimento, avaliou-se o envolvimento do estresse oxidativo como mecanismo para a indução de genotoxicidade de acordo com Luz et al. (2013). Para tanto, alíquotas de 10 µL de suspensão celular de S180 (0,5 x 10⁶ 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 expostas ao FIT (14,16 µM), isoladamente e em cotratamento com H₂O₂ (10 mM), por 5 minutos. Depois, 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 5 minutos, a 4°C. Após este procedimento, procedeu-se a continuação do ensaio cometa, conforme o tópico anterior.

2.9 Análise estatística

A fim de determinar as diferenças entre os tratamentos, dados expressos como a média ± desvio padrão foram comparados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de Tukey (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.

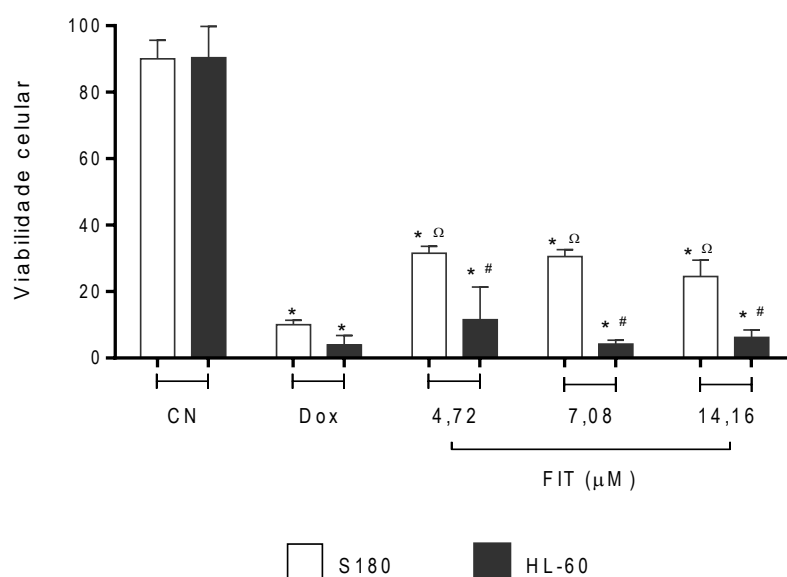


3 RESULTADOS

3.1 Efeito do FIT na viabilidade celular em cultura primária de S180 e em linhagem HL-60

O FIT, nas concentrações testadas, assim como a Dox (2 µg/mL) interferiram, significativamente, na viabilidade celular da cultura primária de S180 (CE_{50} : 3,23 µM [IC: 2,751-3,806 e $R^2=0,932$]) e linhagem HL-60 (CE_{50} : 0,75 µM [IC: 0,661-0,871 e $R^2=0,947$]) (Figura 1), indicando efeitos citotóxicos. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações do diterpenoide, para ambas as células, bem como em relação à diminuição da viabilidade celular induzida pelo FIT em HL-60, comparado à Dox.

Figura 1. Viabilidade celular avaliada pelo teste de exclusão por azul de Tripan em S180 e ensaio MTT em HL-60 após 72 h de exposição. Valores representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: Doxorubicina (2 µg/mL). FIT: Fitol. ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. * $p<0,05$ comparado ao grupo CN. # $p<0,05$ comparado ao S180, na mesma concentração. Ω $p<0,05$ comparado à Dox.

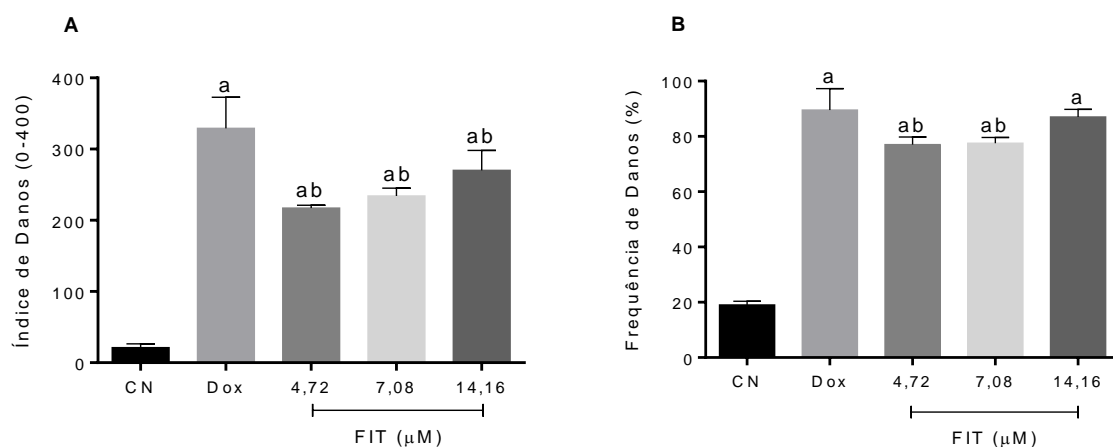


3.2 Efeitos genotóxicos do FIT em cultura primária de S180 avaliados pelo ensaio cometa

O FIT, em todas as concentrações testadas, induziu genotoxicidade em células S180 pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA quando comparado com os danos observados nas células tumorais sem tratamento (Figura 2). Em relação à frequência de danos, não foram observadas diferenças significantes entre a maior concentração de FIT, comparada ao quimioterápico Dox.

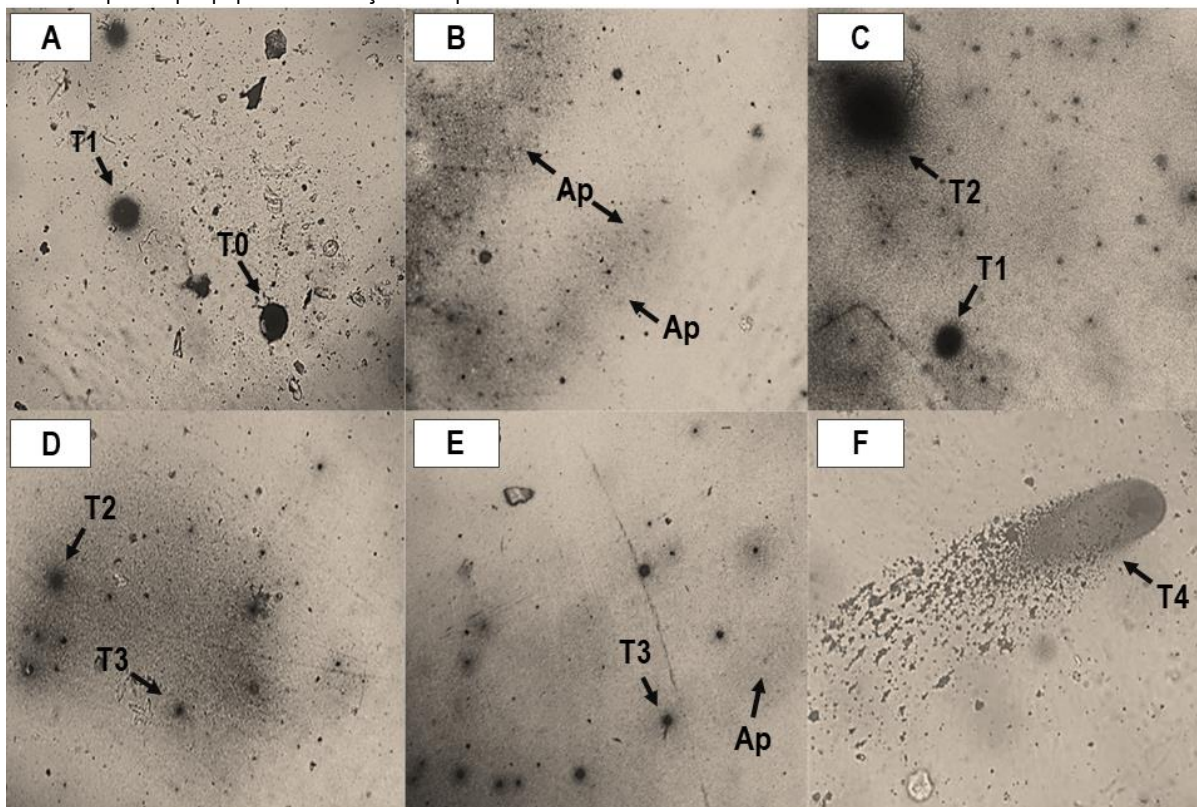


Figura 2. Genotoxicidade em cultura primária de S180 após 72 h de exposição. A: Índice de Danos. B: Frequência de Danos. Valores representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: Doxorubicina 2 $\mu\text{g/mL}$. FIT: fitol. ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. $p < 0,05$ comparado ao grupo CN^a e Dox^b.



Em análise do perfil fotomicrográfico foi possível evidenciar diferenças entre os grupos de estudo em relação aos tipos (classes) de danos ao DNA (0, 1, 2, 3 e 4). O FIT apresentou similaridade de danos com o grupo tratado com Dox, especialmente nas duas maiores concentrações (7,08 e 14,16 μM), pela frequência dos danos 3 e 4, bem como por indicativo de apoptose, como apresentado na Figura 3.

Figura 3. Perfil fotomicrográfico de cultura primária de S180 no ensaio cometa. A: células sem tratamento. B: doxorubicina 2 $\mu\text{g/mL}$. C: fitol 4,72 μM . D: fitol 7,08 μM . E e F: 14,16 μM . T0: dano tipo 0. T1: dano tipo 1. T2: dano tipo 2. T3: dano tipo 3. T4: dano tipo 4. Ap: apoptose. Coloração com prata. Aumento de 400X.

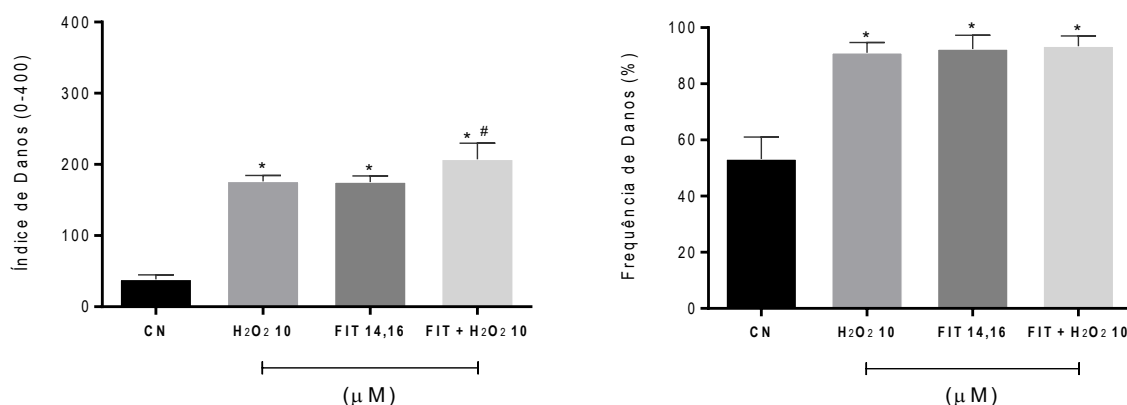




3.3 Avaliação da indução de danos oxidativos como mecanismo para genotoxicidade do FIT em cultura primária de S180 em cotratamento com H₂O₂

O fitol também demonstrou induzir danos genotóxicos por mecanismos oxidativos em cultura primária de S180 (Figura 4). O índice de danos das células cotratadas com FIT (14,16 µM) e H₂O₂ foi maior ($p < 0,05$), comparado ao tratamento com H₂O₂, demonstrando similaridade entre FIT e o agente estressor (H₂O₂) para mecanismos de indução de danos oxidativos. Não houve diferença significativa para a frequência de danos nos tratamentos.

Figura 4. Genotoxicidade do fitol, por mecanismos associados a danos oxidativos, em cultura primária de S180 cotratada com peróxido de hidrogênio. Valores representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. H₂O₂: peróxido de hidrogênio (10 mM). FIT: fitol (14,16 µM). ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. $p < 0,05$ comparado ao grupo CN* e H₂O₂†.



3.4 Efeitos citogenéticos do FIT em cultura primária de S180 e linhagem HL-60 avaliados pelo teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese

O FIT é um produto natural com efeitos mutagênicos em todas as concentrações, por indução de micronúcleos em S180, como também por aumento significativo no número de pontes e brotos nucleares, principalmente nas duas maiores concentrações testadas (7,08 e 14,16 µM), quando comparado ao CN (células não tratadas). Também foi observado citotoxicidade pela redução do índice de divisão celular (IDN) e considerando apoptose e necrose (IDNC), comparado ao CN. Esses dados apontam que o FIT causa danos fixos ao DNA pela indução de micronúcleos; e tem atividade antitumoral por indução de citotoxicidade, especialmente por apoptose e necrose (Tabela 1). Cabe ressaltar que as alterações induzidas pelo FIT foram similares à Dox, especialmente na maior concentração (14,16 µM). A Figura 5 apresenta o perfil das alterações citogenéticas observadas em S180 tratadas com FIT (14,16 µM).

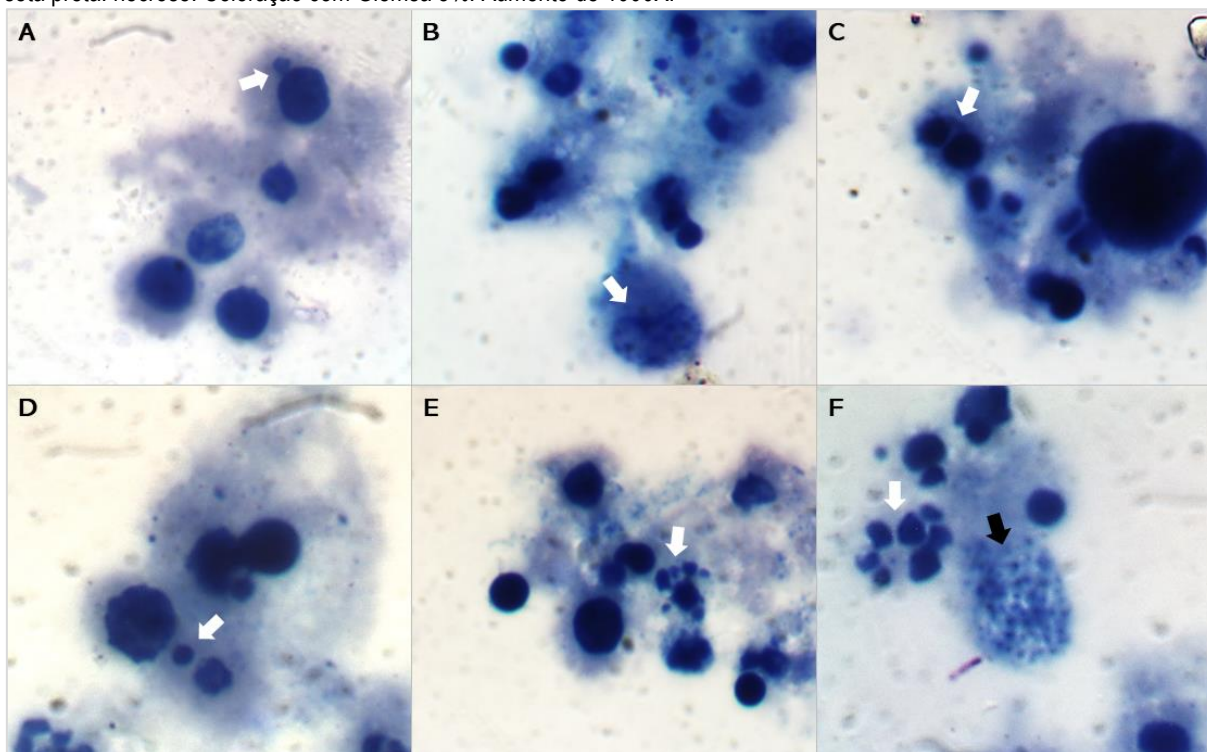


Tabela 1. Danos citogenéticos do fitol avaliados em cultura primária de S180 após 72h de exposição por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

Tratamento	Danos citogenéticos			Citotoxicidade	
Sarcoma 180					
	Micronúcleos	Pontes	Brotos	IDN	IDNC
CN	1,75 ± 1,02	2,80 ± 0,41	1,70 ± 0,12	1,69 ± 0,037	1,60 ± 0,033
Dox	36,50 ± 0,35 ^a	35,5 ± 3,53 ^a	17,0 ± 1,41 ^a	1,11 ± 0,04 ^a	1,23 ± 0,007 ^a
FIT 4,72 µM	8,00 ± 0,70 ^{a#}	5,55 ± 2,12 [#]	2,00 ± 1,41 [#]	1,40 ± 0,018 ^{a#}	1,26 ± 0,062 ^a
FIT 7,08 µM	10,70± 1,76 ^{a#}	8,50 ± 2,25 ^{a#}	11,0 ± 1,82 ^{a#}	1,35 ± 0,281 ^{a#}	1,19 ± 0,146 ^a
FIT 14,16 µM	29,70 ± 3,18 ^{abc}	27,00 ± 7,04 ^{abc}	28,50 ± 2,12 ^{ab}	1,25 ± 0,054 ^a	1,16 ± 0,032 ^a

Valores representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: doxorubicina 2 µg/mL. FIT: fitol. IDN: índice de divisão nuclear. IDNC: índice de divisão nuclear considerando apoptose e necrose. ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao grupo CN. ^b p<0,05 comparado ao grupo FIT 4,72. ^c p<0,05 comparado ao grupo FIT 7,08. [#] p<0,05 comparado à Dox.

Figura 5. Perfil fotomicrográfico de Sarcoma 180 tratada com fitol (14,16 µM) no teste CBMN. Seta em A: broto nuclear. Seta em B: necrose. Seta em C: ponte nucleoplásmica. Seta em D: micronúcleo. Seta em E: apoptose. Seta branca em F: apoptose; seta preta: necrose. Coloração com Giemsa 5%. Aumento de 1000X.



Danos citogenéticos compatíveis com atividade antitumoral do FIT também foram observados em linhagem HL-60, por meio do significativo aumento de micronúcleos, pontes e brotos em todas as concentrações testadas, comparadas ao grupo CN. Também foi observado citotoxicidade pela redução do IDN e IDNC em todas as concentrações do FIT, comparadas ao CN (Tabela 2). Não houve diferença de indução de micronúcleos e pontes pelo FIT (14,16 µM), comparado ao quimioterápico Dox.



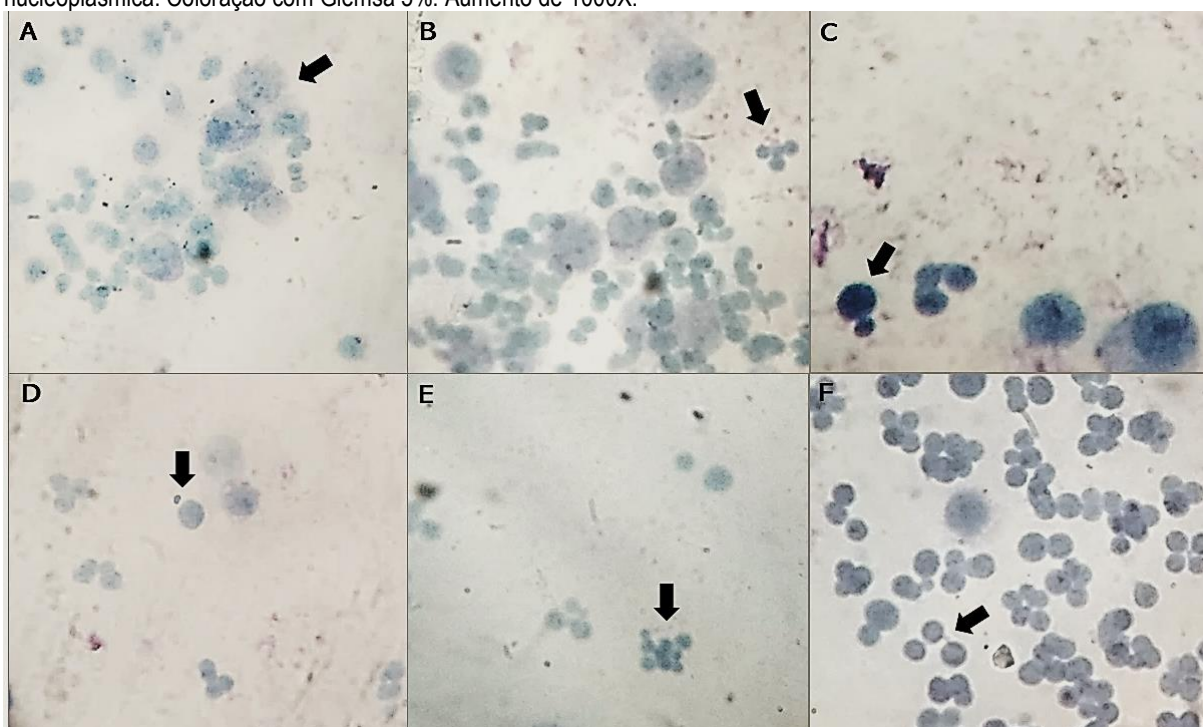
Tabela 2. Danos citogenéticos do FIT avaliados em linhagem HL-60 após 72h de exposição por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

Tratamento	Danos citogenéticos			Citotoxicidade	
Linhagem HL-60					
	Micronúcleos	Pontes	Brotos	IDN	IDNC
CN	2,00 ± 1,41	2,50 ± 0,70	1,50 ± 0,70	1,73 ± 0,03	1,64 ± 0,004
Dox	28,0 ± 11,3 ^a	41,5 ± 7,77 ^a	26,00 ± 2,80 ^a	1,07 ± 0,002 ^a	1,16 ± 0,007 ^a
FIT 4,72 µM	9,50 ± 3,53 ^{a#}	13,0 ± 1,41 ^{a#}	11,00 ± 2,42 ^{a#}	1,55 ± 0,12 ^{a#}	1,36 ± 0,14 ^{a#}
FIT 7,08 µM	12,50 ± 3,45 ^{a#}	19,5 ± 2,21 ^{ab#}	25,00 ± 4,23 ^{ab}	1,30 ± 0,08 ^{ab#}	1,24 ± 0,07 ^{a#}
FIT 14,16 µM	26,00 ± 5,65 ^{abc}	39,0 ± 5,65 ^{abc}	28,50 ± 2,12 ^{ab}	1,33 ± 0,12 ^{ab#}	1,24 ± 0,05 ^{a#}

Valores representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: doxorubicina 2 µg/mL. FIT: fitol. IDN: índice de divisão nuclear. IDNC: índice de divisão nuclear considerando apoptose e necrose. ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao grupo CN. ^b p<0,05 comparado ao FIT 4,72. ^c p<0,05 comparado ao FIT 7,08. [#] p<0,05 comparado à Dox.

Na Figura 6 estão apresentados os marcadores citogenéticos evidenciados para ação citotóxica e antitumoral do FIT (14,16 µM), tais como micronúcleos, brotos nucleares, pontes nucleoplásmicas, figuras trirradiais (núcleo trilobulado), bem como apoptose e necrose.

Figura 6. Perfil fotomicrográfico de linhagem HL-60 tratadas com fitol (14,16 µM) no teste CBMN. Seta em A: necrose. Seta em B: figura trirradial. Seta em C: broto nuclear. Seta em D: micronúcleo. Seta em E: apoptose. Seta em F: ponte nucleoplásmica. Coloração com Giemsa 5%. Aumento de 1000X.

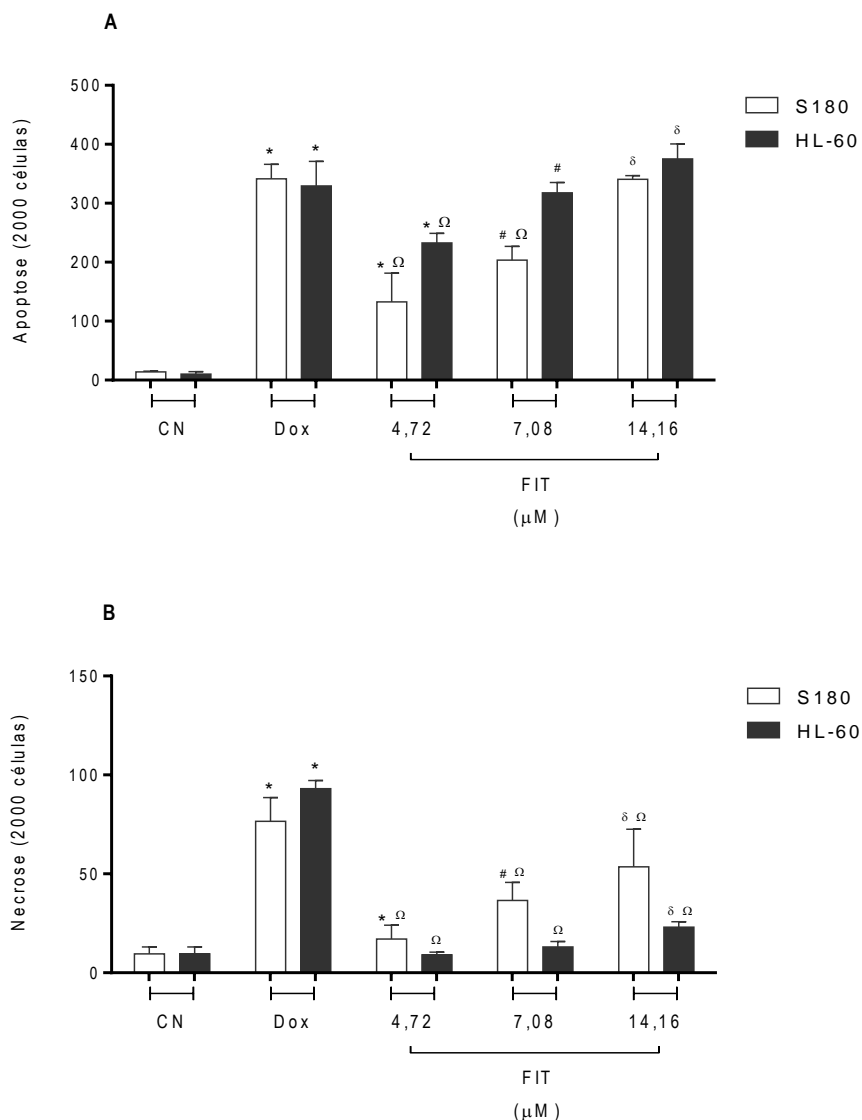




3.5 Indução de apoptose e necrose pelo FIT em cultura primária de S180 e linhagem HL-60 avaliada por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese

Como demonstrado pelo IDNC (Tabelas 1 e 2), o FIT, em todas as concentrações testadas, induziu significativo aumento no número de apoptose (Figura 7 A) e necrose (Figura 7 B), comparado com células sem tratamento (CN), indicando sua ação citotóxica em células tumorais de S180. Resultados similares foram observados em linhagem HL-60. Cabe ressaltar que foram observadas diferenças entre as concentrações de FIT e similaridade de efeitos com a Dox (Figura 7 A e B).

Figura 7. Apoptose e necrose induzidas pelo fitol em cultura primária de S180 e linhagem HL-60, após 72h de exposição. A: apoptose. B: necrose. Valores representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: doxorubicina 2 $\mu\text{g/mL}$. FIT: fitol. ANOVA, duas vias, seguido de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao grupo CN. # $p < 0,05$ comparado ao grupo CN e FIT 4,72. δ $p < 0,05$ comparado ao grupo CN e FIT nas concentrações de 4,72 e 7,08 μM . Ω $p < 0,05$ comparado à Dox.





4 DISCUSSÃO

Produtos naturais e seus derivados fitoquímicos historicamente têm sido uma fonte inestimável de agentes terapêuticos (DEY; SHAH; BRADBURY, 2016). Muitos terpenoides são citotóxicos para células tumorais e, assim, podem ser usados como quimioterápicos ou como quimiopreventivos (MO; ELSON, 2004; THOPPIL; BISHAYEE, 2011), como também como adjuvantes em terapias oncológicas (GHOSH, 2012). Como observado no estudo, o FIT induziu citotoxicidade em cultura primária de S180 e em linhagem leucêmica humana HL-60 por inibição de viabilidade celular, com resultados similares aos observados pelo tratamento com Dox, com CE_{50} de 3,23 μ M para S180 e 0,75 μ M para HL-60.

Atividades citotóxica e antitumoral para o FIT foram observadas em outras linhagens tumorais, tais como em adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma de próstata PC-3, entre outras (HT-29 – cólon, A-549 – pulmão, Hs294T – pele e MDA-MB-231 – mama), com citotoxicidade demonstrada em CE_{50} de $8,79 \pm 0,41 \mu$ M a $124,84 \pm 1,59 \mu$ M (PEJIN; KOJIC; BOGDANOVIC, 2014). Estudos apontam citotoxicidade do FIT pela indução de espécies reativas de oxigênio (SONG; CHO, 2015). Os diterpenoides, a exemplo do FIT, são compostos com grupo OH ativo em seu carbono (C1) (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; SHAN et al., 2014), podendo induzir a formação do radical \bullet OH e gerar danos oxidativos (SHAH et al., 2014; ISLAM et al., 2015). Cabe enfatizar que o FIT pode causar autodestruição de estruturas celulares e macromoléculas como o DNA (PETIWALA; JOHNSON, 2015; ISLAM et al., 2016).

Análises de toxicidade genética podem ser realizadas por meio do ensaio cometa *in vitro* e *ex vivo* pela avaliação de danos ao DNA e capacidade de reparo (CORTÉS-GUTIÉRREZ, 2011; AZQUETA et al., 2014; POURRUT et al., 2015); e, na sua versão alcalina, pode detectar quebras de fita simples e/ou duplas, sítios álcali-lábeis e danos oxidativos (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; FANG et al., 2015; DAVISON, 2016). Em análise de genotoxicidade com aplicação do ensaio cometa, o FIT nas concentrações testadas, induziu aumento no índice e frequência de danos ao DNA em cultura primária de S180. Além disso, em estudo de mecanismo para genotoxicidade em S180, o diterpenoide apresentou similaridade de danos oxidativos comparados ao peróxido de hidrogênio (Figura 4). Como citado anteriormente, o FIT pode gerar radical \bullet OH (SHAH et al., 2014), como também induz aumento dos níveis de TBARS, mas não age como oxidante direto. Ele reduz citocromo c, induz peroxidação lipídica e diminui as defesas antioxidantes enzimáticas, a exemplo da GSH (LEIPNITZ et al., 2010).

O FIT pode induzir aumento na expressão de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, dependente da atividade de luciferase em células de hepatocarcinoma (HepG2) de forma direta; e, indiretamente, por seu metabólito ácido fitânico (GOTO et al., 2005), que também pode inibir a histona deacetilase (Hdac2) e induzir morte celular, com efeitos citotóxicos associados à caspase-9, como observado em células neuronais (NAGAI, 2015). Além disso, pode gerar radicais livres durante a



β -oxidação (TAMATANI et al., 1999), ocasionando estresse oxidativo e, consequentemente, lesão no DNA (STADELMANN-INGRAND; PONTCHARRAUD; FAUCONNEAU, 2004). Por outro mecanismo, os inibidores de poli-(ADP-ribose) polimerase (PARP), como o FIT, danificam o DNA e podem inibir vias de reparo, tais como o reparo por excisão de bases. Portanto, são promissores para associação com drogas antineoplásicas (ROLEAU et al., 2010; VELIC et al., 2015).

Os danos genotóxicos podem desencadear instabilidade genômica não reparada, com potencial para causar mutações no DNA (ZHANG et al., 2014). Isso pode ser decorrente da capacidade de lesões nos cromossomos, rearranjos, não disjunção, amplificação de genes, necrose e apoptose, resultando na formação de micronúcleos (principalmente a partir de quebras de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, não segregados durante o fuso mitótico, quando a célula se divide) (BHATIA; KUMAR 2013). A instabilidade cromossômica contribui para as neoplasias humanas, por má segregação cromossômica, aneuploidia, assim como os danos ao DNA, mutações e translocações cromossômicas. Um estudo anterior apontou que essas alterações cromossômicas podem contribuir para a formação de micronúcleos, um marcador biológico do câncer (BAKHOUM; COMPTON, 2012).

O FIT induziu mutagenicidade pelo aumento de anormalidades nucleares do tipo micronúcleos, pontes e brotos nucleares em cultura primária de S180 e em HL-60, levando à citotoxicidade determinada pelo IDN. O aumento da frequência de micronúcleos está associado com deficiências nas respostas de danos ao DNA. Os micronúcleos representam fragmentos e/ou perdas de cromossomos inteiros (MALUF; ERDTMANN, 2001). Além disso, são marcadores para detectar agentes clastogênicos e aneugênicos em compostos genotóxicos e mutagênicos (KIRSCH; VOLDERS et al., 2011). As pontes nucleoplasmáticas são oriundas de reagrupamentos de cromossomos e fusão de telômeros (FENECH, 2000; STEWENIUS et al, 2005) e os brotos nucleares representam amplificação de DNA, em que a telomerase possui papel importante nessa alteração citogenética (FENECH, 2000; FENECH et al., 2011). Manifestações de amplificação gênica estão associados com fenótipo maligno e podem surgir durante o ciclo celular oriundos de material extracromossômico (SHIMIZU, 2009).

A extensão do dano observado no DNA também depende da liberação de enzimas degradativas, as quais são liberadas durante os processos de apoptose e necrose, tais como as proteínas pró-apoptóticas caspases-8/9/3 e Bcl2 (LIMA et al., 2014). Entretanto, disfunção mitocondrial pode liberar fatores pró-apoptóticos (ZHIVOTOVSKY; KROEMER, 2004; GOGVADZE; ORRENIUS, 2006). As células, em resposta a danos ao DNA, podem também ativar PARP1 como mecanismo de acessibilidade a enzimas de reparo de DNA e de fatores transcricionais (DANTZER et al., 2006), com importância para sobrevivência celular (DEVOS; SCHREIBER; DANTZER, 2012; ZIEGLER; OEI, 2001). Entretanto, estudos também apontam que o PARP1 está implicado em apoptose (YU et al., 2002) ou necrose (HA; SNYDER, 1999).



A indução de apoptose e inibição de proliferação celular, ambos por diferentes mecanismos, têm sido usadas para estudos de fitoquímicos com atividades antitumorais (BEEVI et al. 2010). O FIT induziu apoptose em cultura primária de S180 e em HL-60. Entretanto, a indução de necrose foi observada apenas para a maior concentração de FIT em HL-60. Existem relatos de que o diterpenoide tem atividade antitumoral em linhagens de hepatocarcinoma Huh7 e HepG2, associados a mecanismos de indução de apoptose dependente de caspases. Ele pode, ainda, aumentar o número de células em G1, como também cliva a poliadenosina difosfato ativada por caspases-9/3 e Bax, que atenuam, em mitocôndrias, a expressão dos genes Bcl2, Mcl-1 e c-Myc nas células Huh7 e HepG2 (HASSAN et al., 2014; KIM et al., 2015), como relatado também para a Dox (CARUSO et al., 2014).

Os produtos naturais, como os polifenóis, especialmente taninos e flavonoides, podem ter ação quimiopreventiva e propriedades antitumorais (ZHAO et al., 2015), como observado em terpenoides isolados de óleos de sândulo em células MCF-7 (p53 selvagem) e em células MDA-MB-231, por inibição de viabilidade celular e proliferação e indução de apoptose com efeitos menos citotóxicos em células não tumorais, por ativação de caspases-8/9 e forte clivagem da proteína PARP em ambas as células (SANTHA et al., 2013).

O FIT também induziu apoptose em células de adenocarcinoma gástrico AGS, como observado pelo aumento de células na fase mitótica sub G1, baixa regulação de Bcl-2, superexpressão de Bax, ativação de caspases-9/3, clivagem de PARP, despolarização de membranas mitocondriais, indução de autofagia e citotoxicidade pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e decréscimo da expressão do gene p62 (SONG; CHO, 2015). De forma dependente da concentração, o FIT inibiu em 55% a invasão de células tumorais MDA-MB-231, principalmente na concentração de 1 μ M. Também foi observado que o FIT induziu autofagia pelo aumento de organelas com enzimas ácidas (SONG et al., 2015).

Cabe enfatizar que a necrose também é modulada por PARP1 via indução de danos ao DNA. Alguns estudos sugerem que essa proteína medeia morte celular (MOUBARAK et al., 2007; BREDHOLT et al., 2015). Estes mecanismos são também relatados para a Dox, incluindo aumento da respiração mitocondrial, indução de danos ao DNA via ERO's, geração de óxido nítrico com inibição de PARP1, além de alterações do ciclo celular. Entretanto, os efeitos da Dox não inibem p53, sugerindo que o antineoplásico induz necrose dependente de PARP1 e independente do gene *TP53* (SHIN et al., 2015).



5 CONCLUSÃO

O FIT, em todas as concentrações, induziu citotoxicidade e efeito antitumoral em cultura primária de S180 e em linhagem leucêmica humana HL-60, de forma similar aos efeitos da Dox especialmente na maior concentração. O efeito antitumoral foi observado por diferentes mecanismos citogenéticos: (1) indução de citotoxicidade pela redução de viabilidade celular; (2) indução de genotoxicidade, possivelmente associado ao estresse oxidativo; (3) mecanismos clastogênicos e/ou aneugênicos pela indução de micronúcleos; e (4) mecanismos de anormalidades nucleares indicativas de citotoxicidade pela diminuição de IDN e IDNC e indução de apoptose e necrose. Esses resultados sugerem que o FIT pode ser utilizado em formulações farmacêuticas como alternativa para terapia oncológica.

REFERÊNCIAS

- ARNHOLD, T.; ELMAZAR, M.M.; NAU, H. Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-trans-retinoic acid. **Toxicological Sciences**, v. 66, n. 2, p. 274-82, 2002.
- AZQUETA, A.; SLYSKOVA, J.; LANGIE, S.A.; O'NEILL GAIVÃO, I.; COLLINS, A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 288, 2014.
- BAKHOUM, S.F.; COMPTON, D.A. Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1138-43, 2012.
- BEEVI, S.S.; MANGAMOORI, L.N.; SUBATHRA, M.; EDULA, J.R. Hexane extract of *Raphanus sativus* L. roots inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cancer cells by modulating genes related to apoptotic pathway. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n.3, p. 200-9, 2010.
- BERO, J.; BEAUFAY, C.; HANNAERT, V.; HÉRENT, M.F.; MICHELS, P.A.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antitrypanosomal compounds from the essential oil and extracts of *Keetia leucantha* leaves with inhibitor activity on *Trypanosoma brucei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3-4, p. 270-4, 2013.
- BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. **APMIS**, v. 121, n. 7, p. 569-81, 2013.
- BREDHOLT, G.; MANNELQVIST, M.; STEFANSSON, I.M.; BIRKELAND, E.; BØ, T.H.; ØYAN, A.M. et al. Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. **Oncotarget**, v. 6, n. 37, 2015.
- CARUSO, RA.; BRANCA, G.; FEDELE F.; IRATO, E.; FINOCCHIARO, G.; PARISI, A.; IENI, A. Mechanisms of coagulative necrosis in malignant epithelial tumors (Review). **Oncology Letters**, v. 8, n. 4, p. 1397-1402, 2014.
- CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 1911-21, 2014.
- CHIEN, M.H.; CHOW, J.M.; LEE, W.J.; CHEN, H.Y.; TAN, P.; WEN, Y.C.; LIN, Y.W. et al. Tricetin Induces Apoptosis of Human Leukemic HL-60 Cells through a Reactive Oxygen Species-Mediated c-



Jun N-Terminal Kinase Activation Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1-14, 2017.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E.I.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M.I.; FERNÁNDEZ, J.L.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GOSÁLBEZ, A.; GOSÁLVEZ, J. New application of the comet assay: chromosome--comet assay. **J Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 7, p. 655-60, 2011.

COSTA, J.P.; COSTA, D.A.; ALMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M.; SOUSA, D.P.; FORTES, A.C. et al. Applications of Phytol in Pharmaceutical Formulations Anxiolytic and Antidepressant Properties, BRPI1106397, 2011.

COSTA, J.P.; DE OLIVEIRA, G.A.; DE ALMEIDA, A.A.; ISLAM, M.T.; DE SOUSA, D.P.; DE FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, p. 34-42, 2014.

COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; DE SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R.M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**, v. 523, n. 2, p. 115-8, 2012.

DANTZER, F.; AMÉ, J.C.; SCHREIBER, V.; NAKAMURA, J.; MÉNISSIER-DE MURCIA, J.; DE MURCIA, G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. **Methods in Enzymology**, v. 409, p. 493-510, 2006.

DAVISON, G.W. Exercise and Oxidative Damage in Nucleoid DNA Quantified Using Single Cell Gel Electrophoresis: Present and Future Application. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 249, 2016.

DE VOS, M.; SCHREIBER, V.; DANTZER, F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 137-46, 2012.

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 SOTTO, A.; CARBONE, F. HRELIA, P.; MAFFEI, F.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; MAZZANTI, G. Anticlastogenic effect in human lymphocytes by the sodium salt of 3,4-secoisopimar-4(18),7,15-trien-3-oic acid. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 7, p. 1294-8, 2012.

ELMAZAR, M.M.; EL-ABHAR, H.S.; SCHAALAN, M.F.; FARAG, N.A. Phytol/Phytanic acid and insulin resistance: potential role of phytanic acid proven by docking simulation and modulation of biochemical alterations. **PLoS One**, v. 8, n. 1, 2013.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FANG, L.; NEUTZNER, A.; TURTSCHI, S.; FLAMMER, J.; MOZAFFARIEH, M. Comet Assay as an Indirect Measure of Systemic Oxidative Stress. **Journal of Visualized Experiments**, v. 99, 2015.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v. 600, n. 1-2, p. 58-66, 2006.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-9, 2000.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLS, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J. 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.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.



GHOSH, S.K. Phytol derived immunoadjuvants and their use in vaccine formulations. United States Patent 8088395, 2012.

GIAM, M.; RANCATI, G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. **Cell Division**, v. 10, n. 3, 2015.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, n. 1-2, p. 4-14, 2006.

GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KATO, S.; EGAWA, K.; EBISU, S.; MORIYAMA, T. et al. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPARalpha-expressing HepG2 hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 2, p. 440-5, 2005.

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.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HA, H.C.; SNYDER, S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 13978-82, 1999.

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

HOLMDAHL, R.; HULTQVIST, M.; OLOFSSON, P. Phytol as a cholesterol lowering agent. US 20110015278 A1, 2011.

HUSAIN, N.; VERMA, N. Current Concepts in Pathology of Soft Tissue Sarcoma. **Indian Journal of Surgical Oncology**, v. 2, n. 4, p. 302-308, 2011.

INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; KOBAYASHI, S. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1770-4, 2005.

ISLAM, M. T.; STRECK, L.; DE ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, S. W. C.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DA COSTA JUNIOR, J. S. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, v. 177, p. 93-101, 2017.

ISLAM, M.T.; DE ALENCAR, M.V.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A.A.; DE SOUSA, D.P. et al. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 60-73, 2015.

ISLAM, M.T.; SANTOS, J.V.O.; SOUSA, J.M.C.; PAZ, M.F.C.J.; CARVALHO, R.M.; LIMA, R.M.T. et al. A possible phytol-cytoprotective trait through reactive species-induced oxidative stress ebbing pathway. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-11, 2016.

KAGOURA, M.; MATSUI, C.; MOROHASHI, M. Carcinogenicity study of phytol (3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) in ICR mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 6, n. 1, p. 86, 1993.

KAWAGUCHI, S.; NAKAMURA, T.; YAMAMOTO, A.; HONDA, G.; SASAKI, Y.F. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

KIM, C.W.; LEE, H.J.; JUNG, J.H.; KIM, Y.H.; JUNG, D.B.; SOHN, E.J.; LEE, J.H. Activation of Caspase-9/3 and Inhibition of Epithelial Mesenchymal Transition are Critically Involved in Antitumor Effect of Phytol in Hepatocellular Carcinoma Cells. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, p. 1026-31, 2015.



- KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; VANDE LOOCK, K.; DECORDIER, I. The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 8, p. 873-99, 2011.
- KUŹMA, Ł.; WYSOKIŃSKA, H.; SIKORA, J.; OLSZEWSKA, P.; MIKICIUK-OLASIK, E.; SZYMAŃSKI, P. Taxodione and Extracts from *Salvia austriaca* Roots as Human Cholinesterase Inhibitors. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 2, p. 234-42, 2016.
- LEIPNITZ, G.; AMARAL, A.U.; ZANATTA, A.; SEMINOTTI, B.; FERNANDES, C.G.; KNEBEL, L.A. et al. Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats. **Life Science**, v. 87, n. 9-10, p. 275-80, 2010.
- LIM, S.Y.; MEYER, M.; KJONAAS, R.A.; GHOSH, S.K. Phytol-based novel adjuvants in vaccine formulation: 1. assessment of safety and efficacy during stimulation of humoral and cell-mediated immune responses. **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**, v. 4, n. 6. 2006.
- LIMA, A.P.; PEREIRA, F.C.; ALMEIDA, M.A.; MELLO, F.M.; PIRES, W.C.; PINTO, T.M. et al. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.
- LUZ, E.W.M.; VIEIRA, L.R.; SEMEDO, J.G.; BONA, S.R.; FORGIARINI, L.F.; PEREIRA, P. Neurobehavioral effects of L-carnitine and its ability to modulate genotoxicity and oxidative stress biomarkers in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 110, p. 40-5, 2013.
- MALUF, S.W.; ERDTMANN, B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 124, n. 1, p. 71-5, 2001.
- MO, H.; ELSON, C.E. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 229, n. 7, p. 567-85, 2004.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOUBARAK, R.S.; YUSTE, V.J.; ARTUS, C.; BOUHARROUR, A.; GREER, P.A.; MENISSIER-DE MURCIA, J.; SUSIN, S.A. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 13, p. 4844-62, 2007.
- NAGAI, K. Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation and mitochondrial dysfunction. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 48, p. 33-9, 2015.
- NAKAMURA, A.; MONZEN, S.; TAKASUGI, Y.; WOJCIK, A.; MARIYA, Y. Application of cell sorting for enhancing the performance of the cytokinesis-block micronucleus assay. **Journal of Radiation Research**, v. 57, n. 2, p. 121-6, 2016.
- NICOLELLA, H.D.; DE OLIVEIRA, P.F.; MUNARI, C.C.; COSTA, G.F.; MOREIRA, M.R.; VENEZIANI, R.C.; TAVARES, D.C. Differential effect of manool—a diterpene from *Salvia officinalis*, on genotoxicity induced by methyl methanesulfonate in V79 and HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 8-12, 2014.
- OGUNWANDE, I.A.; WALKER, T.M.; BANSAL, A.; SETZER, W.N.; ESSIEN, E.E. Essential oil constituents and biological activities of *Peristrophe bicalyculata* and *Borreria verticillata*. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1815-1818, 2010.



- OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T. T.; LIU, B.; et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012.
- PEJIN, B.; KOJIC, V.; BOGDANOVIC, G. An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. **Natural Product Research**, v. 28, n. 22, p. 2053-6, 2014.
- PETIWALA, S.M.; JOHNSON, J.J. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, p. 93-102, 2015.
- PONGPRAYOON, U.; BAECKSTRÖM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTRÖM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Medica**, v. 58, n. 1, p. 19-21, 1992.
- POST, S.M. Mouse models of sarcomas: critical tools in our understanding of the pathobiology. **Clinical Sarcoma Research**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2012.
- POURRUT, B.; PINELLI, E.; CELIZ MENDIOLA, V.; SILVESTRE, J.; DOUAY, F. Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. **Mutagenesis**, v. 30, p. 37–43, 2015.
- ROULEAU, M.; PATEL, A.; HENDZEL, M.J.; KAUFMANN, S.H.; POIRIER, G.G. PARP inhibition: PARP1 and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 4, p. 293-301, 2010.
- SAMADI, A.K.; BILSLAND, A.; GEORGAKILAS, A.G.; AMEDEI, A.; AMIN, A.; BISHAYEE, A. et al. A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. **Seminars in Cancer Biology**, Suppl. S151-S184, 2015.
- SAMUELSON, E.; KARLSSON, S.; PARTHEEN, K.; NILSSON, S.; SZPIRER, C.; BEHBOUDI, A. BAC CGH-array identified specific small-scale genomic imbalances in diploid DMBA-induced rat mammary tumors. **BMC Cancer**, v. 12, n. 352, 2012.
- SANTHA, S.; BOMMAREDDY, A.; RULE, B.; GUILLERMO, R.; KAUSHIK, R.S.; YOUNG, A.; DWIVEDI, C. Antineoplastic effects of α -santalol on estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer cells through cell cycle arrest at G2/M phase and induction of apoptosis. **PLoS One**, v. 8, n. 2, 2013.
- SANTOS, C.C.M.P.; SALVADORI, M.S.; MOTA, V.G.; COSTA, L.M.; ALMEIDA, A.A.C.; OLIVEIRA, G.A.L. et al. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. **Neuroscience Journal**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- SHAH, D.; MAHAJAN, N.; SAH, S.; NATH, S.K.; PAUDYAL, B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. **Journal of Biomedical Science**, v. 21, n. 23, p. 1-13, 2014.
- SHIMIZU, N. Extrachromosomal double minutes and chromosomal homogeneously staining regions as probes for chromosome research. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 124, n. 3-4, p. 312-26, 2009.
- SHIN, H.J.; KWON, H.K.; LEE, J.H.; GUI, X.; ACHEK, A.; KIM, J.H.; CHOI, S. Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. **Scientific Reports**, v. 5p. 1-17, 2015.
- SILVA, R.O.; SOUSA, F.B.; DAMASCENO, S.R.; CARVALHO, N.S.; SILVA, V.G.; OLIVEIRA, F.R. et al. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, p. 455-464, 2014.
- SONG, Y.; CHO, S. K. Phytol induces apoptosis and ROS-mediated protective autophagy in human gastric adenocarcinoma AGS cells. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 211, 2015.



- SONG, Y.W.; SHRESTHA, S.; GYAWALI, R.; LEE, D.; CHO, S.K. *Citrus unshiu* leaf extract containing phytol as a major compound induces autophagic cell death in human gastric adenocarcinoma AGS cells. **Applied Biological Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 257–265, 2015.
- SPEIT, G.; ROTHFUSS, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v. 920, p.79-90, 2012.
- STADELMANN-INGRAND, S.; PONTCHARRAUD, R.; FAUCONNEAU, B. Evidence for the reactivity of fatty aldehydes released from oxidized plasmalogens with phosphatidylethanolamine to form Schiff base adducts in rat brain homogenates. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 131, n. 1, p. 93-105, 2004.
- STEWÉNIUS, Y.; GORUNOVA, L.; JONSON, T.; LARSSON, N.; HÖGLUND, M.; MANDAH, N. et al. Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 15, p. 5541-6, 2005.
- STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, 2015.
- SWARTZ, M.A.; IIDA, N.; ROBERTS, E. W.; SANGALETTI, S.; WONG, M. H.; YULL, F. E.; et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. **Cancer Research**, v. 72, n. 10, p. 2473–2480, 2012.
- TAJUDIN, T.J.; MAT, N.; SITI-AISHAH, A.B.; YUSRAN, A.A.; ALWI, A.; ALI, A.M. Cytotoxicity, Antiproliferative Effects, and Apoptosis Induction of Methanolic Extract of *Cynometra cauliflora* Linn. Whole Fruit on Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- TAMATANI, T.; HATTORI, K.; NAKASHIRO, K.; HAYASHI, Y.; WU, S.; KLUMPP, D. et al. Neoplastic conversion of human urothelial cells in vitro by overexpression of H₂O₂-generating peroxisomal fatty acyl CoA oxidase. **International Journal of Oncology**, v. 15, n. 4, p. 743-9, 1999.
- 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. 541-57, 2011.
- TURKEZ, H.; TATAR, A.; HACIMUFTUOGLU, A.; OZDEMIR, E. Boric acid as a protector against paclitaxel genotoxicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 57, n. 1, p. 95-7, 2010.
- VELIC, D.; COUTURIER, A.M.; FERREIRA, M.T.; RODRIGUE, A.; POIRIER, G.G.; FLEURY, F.; MASSON, J.Y. DNA Damage Signalling and Repair Inhibitors: The Long-Sought-After Achilles' Heel of Cancer. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 3204-59, 2015.
- WU, K.J.; HUANG, J.M.; ZHONG, H.J.; DONG, Z.Z.; VELLAISAMY, K.; LU, J.J. et al. A natural product-like JAK2/STAT3 inhibitor induces apoptosis of malignant melanoma cells. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. 1-12, 2017.
- YEDJOU, C.G.; MILNER, J.N.; HOWARD, C.B.; TCHOUNWOU, P.B. Basic apoptotic mechanisms of lead toxicity in human leukemia (HL-60) cells. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 5, p. 2008-17, 2010.
- YU, S.W.; WANG, H.; POITRAS, M.F.; COOMBS, C.; BOWERS, W.J.; FEDEROFF, H.J. et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. **Science**, v. 297, n. 5579, p. 259-63, 2002.



ZHANG, Q.; MATZKE, M.; SCHEPMOES, A.A.; MOORE, R.J.; WEBB-ROBERTSON, B.J.; HU, Z. et al. High and low doses of ionizing radiation induce different secretome profiles in a human skin model. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014.

ZHAO, T.; SUN, Q.; MARQUES, M.; WITCHER, M. Anticancer Properties of Phyllanthus emblica (Indian Gooseberry). **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

ZHIVOTOVSKY, B.; KROEMER, G. Apoptosis and genomic instability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 752-62, 2004.

ZIEGLER, M.; OEI, S.L. A cellular survival switch: poly(ADP-ribosyl)ation stimulates DNA repair and silences transcription. **Bioessays**, v. 23, n. 6, p. 543-8, 2001.

Capítulo 4

Perfil toxicogenético do fitol como agente antitumoral em modelo de câncer de mama induzido pelo 7,12-dimetilbenzantraceno em camundongos



Ilustração de Lara Crow, adaptada do periódico *Nature Reviews Cancer* (2014)

“Investigando maneiras de solucionar o problema chamado câncer”



Perfil toxicogenético do fitol como antitumoral em modelo de câncer de mama induzido pelo 7,12-dimetilbenzantraceno em camundongos

Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Rosália Maria Torres de Lima, Antonielli Campinho dos Reis, José Williams de Oliveira Filho, Luiza Alves da Silva, Caroline Milanez Paixão, Bárbara Cavalcante Gomes, Joselha Cássia Silva do Nascimento, Josiane Martins, Gilberto Santos Cerqueira, Muhammad Torequl Islam, Luciano da Silva Lopes, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, João Marcelo de Castro e Sousa, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Artigo submetido ao periódico *Archives of Toxicology* (ANEXO F)

QUALIS A1 – Biotecnologia

Resumo

O diterpenoide fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol) apresenta diversas atividades farmacológicas, especialmente relacionadas à toxicidade, citotoxicidade e oxidação. Considerando a urgência de novas formulações farmacêuticas para a terapia do câncer de mama, este estudo objetivou avaliar o efeito antitumoral do fitol em modelo animal de câncer de mama induzido por 7,12-dimetilbenzantraceno, por meio de análises hematológica, bioquímica, histopatológica e imuno-histoquímica para Ki-67, bem como citogenéticas (danos ao DNA e reparo), em células neoplásicas (carcinoma mamário) e não neoplásicas (medula óssea, linfócitos de sangue periférico e fígado), com aplicação do ensaio cometa. Quinze camundongos fêmeas (n=5/grupo), não gestantes, foram submetidas à indução do câncer de mama, durante 7 semanas com o 7,12-dimetilbenzantraceno (6 mg/kg, v.o.), e terapias com fitol (14 mM/kg, v.o.) e ciclofosfamida (25 mg/kg, i.p.), por 2 semanas após detecção de tumores mamários; enquanto que cinco animais não expostos ao pró-carcinógeno, foram utilizados no grupo controle, tratado apenas com azeite de oliva (10 mL/kg, v.o.). A formação de tumores mamários foi comprovada pela histopatologia. Na dose testada, o fitol não apresentou toxicidade frente aos parâmetros hipocráticos e comportamentais, bem como não induziu alterações histopatológicas malignas em mama, nem expressiva marcação para Ki-67, sugerindo baixa proliferação celular, comparado ao pró-carcinógeno. Por outro lado, o fitol demonstrou alterações hematológicas e bioquímicas em enzimas hepáticas. O fitol teve efeitos modulatórios sobre o pró-carcinógeno e, também induziu genotoxicidade e apoptose em células normais, mas, de forma proeminente em tecido neoplásico de mama. Esses dados apontam que o fitol induz baixa toxicidade, genotoxicidade e apoptose em células não tumorais (sangue periférico, medula óssea e fígado), mas, de forma contrária, induz expressivos danos em células neoplásicas (mama), indicando potencial para formulações farmacêuticas antitumorais.

Palavras-chave: fitol, câncer de mama, ensaio cometa, apoptose.



1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é uma doença multifatorial, prevalente em pacientes idosas (ARRARAS et al., 2016), apresentando mais de 1,7 milhões de casos diagnosticados mundialmente (ABDEL-ZAHE; ELDEIB, 2016). A doença é a principal causa de morte entre as mulheres em todo o mundo, o que suscita mais estudos relativos à quimioprevenção e quimioterapia (DONEPUDI et al., 2014), com estratégias terapêuticas citotóxicas e preventivas, especialmente, com menor toxicidade sistêmica (PRATHEESHKUMAR et al., 2012).

Os modelos animais de carcinogênese química são importantes para pesquisa e desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos/quimiopreventivos (HOLLERN; ANDRECHEK, 2014; KEMP, 2015). O 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é um pró-carcinógeno, que requer ativação metabólica por enzimas citocromo P450 (CYP1A1 e CYP1B1), para formar o metabólito dihidrodiolepóxido, (RUSSO; RUSSO, 1996; LÍŠKA et al., 2011), capaz de induzir carcinogênese mamária (LIU et al., 2016), por mecanismos de formação de aduto ao DNA e rupturas da fita dupla de DNA, mesmo com atuação de enzimas de reparo (SAMUELSON et al., 2012; BHOWMIK et al., 2013).

As drogas utilizadas no tratamento de neoplasias, de maneira geral, apresentam atividade citotóxica. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos citotóxicos não agem especificamente sobre células neoplásicas, afetando também células normais, resultando em uma ampla gama de reações adversas (FREEDMAN; PATRIDGE, 2011; ADÃO et al., 2013). Assim, é importante a avaliação de riscos toxicogenéticos, em todas as etapas da terapia oncológica, para compreensão da biologia do câncer e recorrência, com impacto no diagnóstico e eficácia terapêutica (ABRAMCZYK; BROZEK-PLUSKA, 2016). Os biomarcadores citogenéticos têm despertado atenção da comunidade científica pelo fato de serem potenciais indicadores de efeitos biológicos de importância para oncologia. O ensaio cometa é um teste de avaliação de danos ao DNA em células individualizadas (GUNASEKARANAL; RAJ; CHAND, 2015). Em sua versão alcalina, o ensaio detecta quebras de fitas simples e/ou duplas, sítios apurínico e apirimidínicos, danos oxidativos e eficácia de reparo (DUSINSKA, COLLINS, 2008; CORTES-GUTIERREZ et al., 2012), sendo amplamente utilizado em pesquisas não clínicas para investigação de novos agentes antitumorais, por exemplo, de origem natural (TYAGI et al., 2011; PLACE et al., 2003).

Os produtos naturais, oriundos de plantas terrestres, são alternativas para formulações farmacêuticas, especialmente para as terapias oncológicas, por mecanismos associados à indução de apoptose (YAACOB et al., 2015). Os compostos bioativos, derivados de plantas, não só podem ser diretamente utilizados como agentes terapêuticos, mas também podem servir como protótipos no desenvolvimento de fármacos potenciais para o tratamento de várias doenças em seres humanos (MALLA; GAUCHAN; CHHETRI, 2015). Os terpenoides, diversificada classe de substâncias naturais, ou



metabólitos secundários de origem vegetal, foram investigados quanto aos efeitos antitumorais em diferentes tumores celulares, destacando o potencial destas substâncias como quimioterápicos ou quimiopreventivos (MO; ELSON, 2004; THOPPIL; BISHAYEE, 2011), assim como adjuvantes em terapias oncológicas (GHOSH, 2005). O fitol, FIT, (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol), é um diterpenoide derivado da estrutura da clorofila, abundantemente presente na natureza e com diversas atividades farmacológicas, tais como antioxidante, antimicrobiana (INOUE et al., 2005; SAIKIA et al., 2010; MORAES et al., 2014), antitumoral (GUO et al., 2014), imunoadjuvante, antidiabética e hipolipemiante (TAKAHASHI et al., 2002), ansiolítica (COSTA et al., 2014), antidepressiva (COSTA et al., 2011), antinociceptiva (SANTOS et al., 2013), antiespasmódica (PONGPRAYOON et al., 1992) e antiteratogênica (ARNHOLD; ELMAZAR; NAU, 2002).

A descoberta de bioativos naturais, com base em biomarcadores, assume importância para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas contra o câncer, como estratégias para o aprimoramento das terapias atuais. Cabe enfatizar, que boa parte dos fármacos utilizados, com capacidade de modificar o DNA, apresentam diversas desvantagens, como os efeitos colaterais sistêmicos. Assim, o monitoramento da formação e o nível de danos ao DNA, são importantes para estratificar e prever a eficácia da terapia oncológica (STORNETTA et al., 2017). O presente estudo avaliou os efeitos antitumorais do FIT em relação a frequência, índice e reparo de danos ao DNA, bem como a indução de apoptose em diferentes tecidos de camundongos fêmeas, com câncer de mama induzido pelo DMBA, por meio da aplicação do ensaio cometa, associado a análises de alterações comportamentais, bioquímicas, hematológicas, histopatológicas e imuno-histoquímica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e químicos

O FIT 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). O composto FIT foi solubilizado em 0,05% de Tween 80, dissolvido em 0,9% de Cloreto de Sódio. Nos experimentos, o FIT foi administrado oralmente em camundongos na dose de 14 mM/kg. Essa dose foi escolhida com base em estudo anterior sobre efeitos citotóxicos do fitol (ISLAM et al., 2017). O DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em azeite de oliva, e administrado oralmente na dose de 6 mg/kg/semana.



2.2 Animais

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, não gestantes e pesando entre 20 a 50 g, foram submetidas a 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 a ração tipo *pellets* (Purina®) e água. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: (1) azeite (azeite de oliva 10 mL/kg, v.o.); (2) DMBA (6 mg/kg, v.o.); (3) FIT (14 mM/kg, v.o.) e (4) ciclofosfamida (25 mg/kg, i.p.). 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 (#167/16, ANEXO E).

2.3 Indução do câncer de mama com o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA)

Os animais foram divididos em quatro grupos ($n = 5/\text{grupo}$). O grupo 1, foi tratado apenas com azeite de oliva (10 mL/kg, v.o.); os demais grupos foram tratados com DMBA (6 mg/kg, v.o.), por 7 semanas. Todos os animais utilizados foram pesados e a dose individual foi calculada baseada no peso (BARROS et al., 2013). A formação do tumor foi monitorada durante 7 semanas, por palpações físicas e mensuração do diâmetro com o uso de um paquímetro digital. Após a detecção do tumor mamário, 2 grupos ($n=5/\text{grupo}$), tiveram a administração com DMBA interrompida e receberam terapia com FIT (14 mM/kg, v.o.) e ciclofosfamida (25 mg/kg, i.p.), respectivamente, por 2 semanas. Após o tratamento dos animais, ambas as linhas mamárias foram ressecadas e submetidas à necropsia completa, para avaliação macro e microscópica de neoplasias primárias. O produto das ressecções mamárias e da necropsia foram encaminhados para exame macroscópico (com especial atenção à determinação das dimensões e alterações à superfície de corte das peças), fixação em formalina 10% tamponada e processamento histotécnico automático, para inclusão em parafina.

2.4 Avaliação histopatológica

Para a análise histopatológica, os fragmentos de tecido mamário foram fixados em formaldeído a 3,5% em tampão fosfato (pH 7,6), adicionado solução de sacarose a 1% e armazenados durante 12h a 4°C , até à sua utilização. A fixação foi processada durante 20h, seguida por desidratação das peças



em diluições crescentes de etanol/água (50, 70, 90 e 95%, v/v). O material seco foi imergido em xileno PA e lavados duas vezes em parafina, antes de finalmente serem emblocados (BEHMER; TOLOSA; NETO, 1976). Os blocos obtidos foram seccionados (4 μ M), em micrótomo e as secções distendidas em lâminas. Por conseguinte, as secções distendidas foram desparafinizadas em três banhos sucessivos de xileno PA e desidratadas em diluições decrescentes de etanol, conforme supracitado. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (ELGENGAIHI et al., 2016) e finalmente, após lavagem e secagem, as lâminas foram cobertas por laminulas com auxílio de bálsamo do Canadá.

2.5 Perfil imuno-histoquímico (Ki-67)

Secções de 3 μ m foram preparadas a partir dos blocos confeccionados, conforme supracitado. Após a desparafinação, a recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH 6,0), por 20 minutos a 95°C. A peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de H₂O₂, durante 10 minutos, para reduzir a ligação não específica. Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpo primário, Ki-67 (MIB-1, Dako), diluídos em diluente de anticorpo por 1h. Os locais de ligação ao anticorpo foram visualizados pela incubação com solução de diaminobenzidina-H₂O₂ (DAB, Dako). Uma secção de tecido normal (mama dos animais tratados com azeite) foi utilizada como controle. A imunorreacção foi analisada semiquantitativamente, 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 imunorreacção (LI et al., 2015).

2.6 Monitoramento toxicológico durante a indução do câncer de mama e terapia com FIT

2.6.1 Análise hipocrática

Durante as semanas de tratamento, os animais experimentais foram monitorados quanto às possíveis alterações da atividade geral, frênto 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.



2.6.2 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 15 cm 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.

2.6.3 Rota rod

Geralmente, 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.

2.6.4 Eutanásia e coleta dos órgãos

Após 7 semanas de tratamento, os animais foram sacrificados por sobredose de solução anestésica (pentobarbital sódico + xilazina [1:1], i.p.). O coração, pulmão, fígado, baço e rim foram imediatamente separados em caixa de gelo. 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%.

2.6.5 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, enquanto que 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*).

2.6.6 Ensaio cometa em diferentes tecidos

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Speit e Hartmann (2005). Aliquotas de 10 μ L de sangue periférico caudal dos camundongos foram coletadas durante a 1^o, 3^o e 7^o semana de tratamento com DMBA, e 1^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a e 7^a semana de tratamento com DMBA e terapia com FIT. Em seguida, foram misturados com uma fina camada de agarose low melting point 0,75% (90 μ L) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%. Além disso, aliquotas de 10 μ L do homogenato dos tecidos fígado, medula óssea e mama direita 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: $FD = 100 - \text{nº de células classe 0}$.

2.6.7 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). Todos os estudos foram realizados em triplicata, a partir de avaliações biológicas independentes.



3 RESULTADOS

3.1 Análise toxicológica durante a indução do câncer de mama e terapia com FIT

3.1.1 Monitoramento hipocrático e comportamental

Durantes as 7 semanas de tratamento, nos diferentes grupos, não foram evidenciadas alterações hipocráticas sugestivas de toxicidade. Os dados do monitoramento comportamental, durante a indução do câncer de mama, com DMBA, e terapia com FIT (14 mM/Kg), estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil comportamental e atividade locomotora de camundongos fêmeas, durante 7 semanas de tratamento com azeite e DMBA, e terapias com CPA e FIT.

Grupos e semanas de tratamento		Parâmetros comportamentais e atividade locomotora				
		Campo aberto			Rota rod	
		Cruzamento	Autolimpeza	Levantamento	TP (s)	NQ
Azeite 10 mL/kg	S 1	83,2 ± 20,6	5,00 ± 2,14	12,0 ± 6,16	180,0 ± 0,00	0,40 ± 0,02
	S 2	81,0 ± 16,8	14,4 ± 3,05	24,0 ± 7,48	174,4 ± 7,43	1,40 ± 0,89
	S 3	83,6 ± 33,4	11,4 ± 5,12	24,0 ± 19,5	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	S 4	57,2 ± 9,44	14,0 ± 2,91	16,8 ± 2,16	176,8 ± 7,15	0,00 ± 0,00
	S 5	55,0 ± 14,8	12,6 ± 6,10	12,8 ± 6,26	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	S 6	52,2 ± 21,4	9,80 ± 4,08	13,6 ± 8,05	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	S 7	37,0 ± 26,4	8,40 ± 11,3	9,60 ± 5,55	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DMBA 6 mg/kg	S 1	68,2 ± 23,0	9,60 ± 4,82	20,6 ± 5,94	167,0 ± 17,0	1,40 ± 0,67
	S 2	82,0 ± 30,0	15,8 ± 6,14	27,2 ± 4,60	176,0 ± 6,92	0,40 ± 0,28
	S 3	65,0 ± 14,6	11,2 ± 1,30	19,6 ± 3,43	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	S 4	76,8 ± 11,3	15,8 ± 7,59	19,4 ± 10,6	176,6 ± 7,60	0,60 ± 0,12
	S 5	76,4 ± 18,9	15,4 ± 13,9	20,4 ± 4,03	174,2 ± 8,13	0,80 ± 0,32
	S 6	62,2 ± 24,3	11,4 ± 4,72	26,6 ± 12,1*	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	S 7	60,8 ± 7,19	14,7 ± 10,3	19,8 ± 7,08	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CPA 25 mg/kg	S 1	48,0 ± 27,0*	10,6 ± 4,72	17,2 ± 10,2	153,0 ± 14,3	5,80 ± 3,11
	S 2	68,8 ± 24,7	22,2 ± 14,8	19,6 ± 9,50	137,2 ± 47,9	3,80 ± 4,43
	S 3	64,0 ± 14,9	14,0 ± 5,91	19,4 ± 4,09	167,0 ± 17,8	1,40 ± 1,67
	S 4	76,6 ± 25,0	12,6 ± 8,32	26,0 ± 5,09	165,0 ± 14,6	1,20 ± 1,32
	S 5	64,0 ± 23,8	15,0 ± 5,47	19,6 ± 3,78	162,4 ± 14,0	2,20 ± 1,92
	S 6	52,4 ± 25,0	12,0 ± 9,02	25,0 ± 8,33	178,6 ± 3,13	1,80 ± 1,30
	S 7	51,6 ± 18,8	19,4 ± 6,54	32,0 ± 6,32*	168,0 ± 9,48	0,20 ± 0,44
FIT 14 mM/kg	S 1	77,2 ± 17,7	15,2 ± 9,68	8,20 ± 4,15	169,2 ± 14,7	0,80 ± 0,28
	S 2	62,6 ± 30,3	13,4 ± 9,50	16,4 ± 5,07	173,8 ± 6,49	1,60 ± 1,34
	S 3	34,6 ± 15,7	17,2 ± 7,39	19,0 ± 6,10	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	S 4	43,2 ± 20,2	12,8 ± 6,41	13,2 ± 6,98	180,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	S 5	24,2 ± 5,26	17,6 ± 5,22	8,00 ± 2,82	174,4 ± 3,64	1,20 ± 0,20
	S 6	23,0 ± 8,88	21,6 ± 9,00	17,4 ± 7,92	176,4 ± 3,50	1,20 ± 0,28
	S 7	35,0 ± 25,5	11,0 ± 3,53	7,40 ± 4,23	172,4 ± 8,29	1,60 ± 0,51

Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). FIT = fitol. 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.

Como observado, a terapia com FIT não induziu alterações nos parâmetros comportamentais e alterações na atividade locomotora dos animais, comparado ao grupo controle (Azeite).



3.1.2 Perfil hematológico e bioquímico após indução do câncer de mama e terapia com FIT

Após 7 semanas de tratamento foram observadas alterações hematológicas induzidas pelo DMBA, para monócitos e plaquetas. O grupo FIT apresentou alterações em monócitos e neutrófilos, acompanhadas de alterações bioquímicas para enzimas hepáticas, comparadas ao Azeite (Tabela 2). O FIT foi administrado a partir da 6ª semana, quando houve detecção de tumores mamários, após um longo período de tratamento com DMBA, o que pode justificar as alterações bioquímicas observadas.

Tabela 2. Perfil hematológico e bioquímico de camundongos fêmeas, após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com FIT.

Grupos				
Perfil Hematológico	Azeite 10 mL/kg	DMBA 6 mg/kg	CPA 25 mg/kg	FIT 14 mM
Série vermelha				
HEM ($10^{12}/L$)	$9,80 \pm 1,00$	$9,36 \pm 0,14$	$9,97 \pm 0,54$	$8,23 \pm 0,77$
HGB (g/dL)	$14,7 \pm 1,16$	$16,1 \pm 1,47$	$15,5 \pm 1,16$	$15,5 \pm 1,34$
HTC (%)	$54,2 \pm 3,27$	$54,2 \pm 1,49$	$56,5 \pm 2,86$	$54,2 \pm 1,63$
VCM (fL)	$55,6 \pm 4,41$	$57,9 \pm 2,32$	$56,7 \pm 2,97$	$66,3 \pm 7,36$
HCM (pg)	$15,0 \pm 1,09$	$17,2 \pm 1,47$	$15,6 \pm 0,95$	$19,0 \pm 3,11$
CHCM (g/dL)	$27,1 \pm 0,84$	$29,8 \pm 2,60$	$27,4 \pm 0,91$	$28,5 \pm 1,66$
Série branca				
Leucócitos (p/mm^3)	$3650 \pm 1372,6$	$3327,5 \pm 672,3$	$3398,0 \pm 840,7$	$2970,0 \pm 888,7$
Neutrófilos ($10^9/L$)	$9,87 \pm 1,42$	$11,95 \pm 2,40$	$8,76 \pm 2,51$	$3,66 \pm 3,08^*$
Linfócitos ($10^9/L$)	$74,3 \pm 5,38$	$78,27 \pm 4,43$	$77,8 \pm 4,62$	$86,3 \pm 4,03$
Eosinófilos ($10^9/L$)	$0,2 \pm 0,05$	$1,5 \pm 1,02$	$0,14 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,04$
Monócitos ($10^9/L$)	$15,2 \pm 4,83$	$7,95 \pm 4,10^*$	$12,8 \pm 4,21$	$3,28 \pm 2,09^*$
Outros				
Plaquetas ($10^9/L$)	$1120,1 \pm 134,6$	$811,5 \pm 130,55^*$	$1034,0 \pm 100,7$	$1198,4 \pm 96,5$
Perfil Bioquímico	Azeite 10 mL/kg	DMBA 6 mg/kg	CPA 25 mg/kg	FIT 14 mM/kg
Ureia (mg/dL)	$33,5 \pm 9,32$	$48,7 \pm 8,30$	$36,0 \pm 8,71$	$41,8 \pm 7,98$
Creatinina (mg/dL)	$0,42 \pm 0,05$	$0,47 \pm 0,05$	$0,46 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,10$
ALT (IU/L)	$60,0 \pm 7,87$	$143,0 \pm 7,61^*$	$101,6 \pm 13,6^*$	$103,5 \pm 19,8^*$
AST (IU/L)	$111,8 \pm 24,1$	$232,5 \pm 16,0^*$	$156,6 \pm 6,65^*$	$147,7 \pm 22,2^*$

Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 5$). FIT = fitol. 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.

3.1.3 Perfil histopatológico e imuno-histoquímico (Ki-67) em mama de animais tratados com DMBA e terapia com FIT

Alterações histopatológicas e perfil imuno-histoquímico da mama direita dos animais tratados durante 7 semanas com DMBA e terapias com FIT e CPA, foram analisadas neste estudo. A escolha da mama direita foi norteadas pelas características macroscópicas, bem como por apresentar maior peso tecidual, comparada à mama esquerda. O perfil histopatológico da mama direita dos animais tratados com DMBA, apresentou característica de carcinoma, com presença de ductos não uniformes; atipia de células ductais; contorno nuclear irregular; basofilia e hiperplasia ductal atípica. Além disso, verificou-se



também que havia tecido conjuntivo misturado com a lesão, sugerindo carcinoma ductal invasivo; acompanhado de intensa proliferação celular, congestão vascular e hipercromatismo nuclear. Por outro lado, na mama direita dos animais que receberam terapia com FIT (14 mM/kg), não foram observadas características histopatológicas de carcinoma, com ausência de áreas de necrose, embora com presença de congestão vascular, hipercromatismo nuclear e hiperplasia ductal usual, mas sem características de malignidade (Figura 1).

Indicativos de proliferação celular também foram evidenciados durante a indução do câncer de mama com DMBA, pela expressiva marcação imuno-histoquímica para Ki-67. Entretanto, após a terapia com FIT, a marcação para proteína Ki-67, na mama direita dos animais foi mais moderada, indicando possíveis reduções de proliferação celular (Figura 2).



Figura 1. Perfil histopatológico da mama direita de camundongos fêmeas, após 7 semanas de tratamento com DMBA (A, B e C) e terapia com fitol (D, E e F). A: hiperplasia ductal atípica (seta preta); célula com citoplasma rico em glicogênio (seta branca). B: Tecido conjuntivo misturado com lesão, sugerindo carcinoma invasivo. C: basofilia. D: hiperplasia ductal usual. E: congestão vascular. F: hiperchromatismo nuclear. Coloração H&E (aumento de 200X).

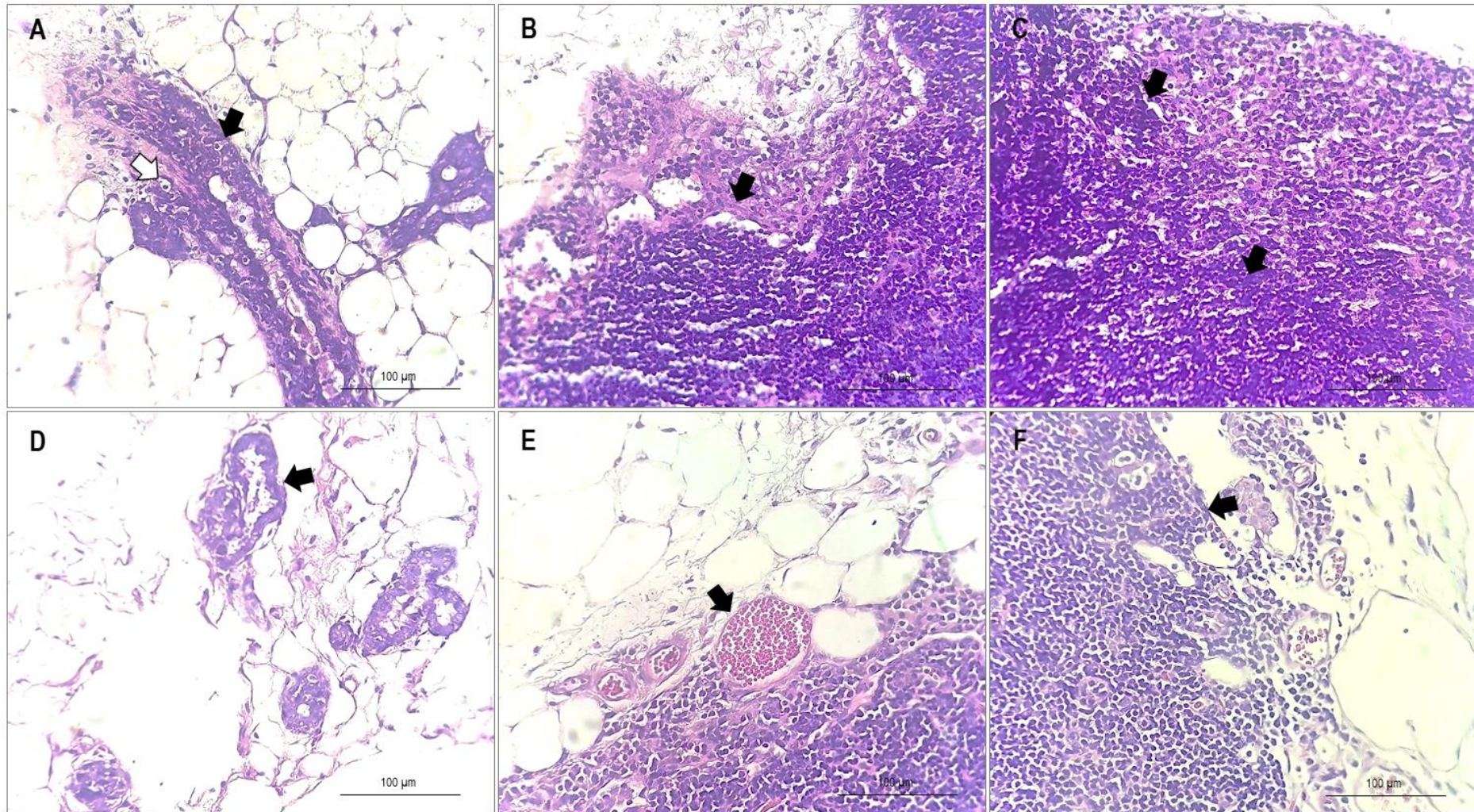
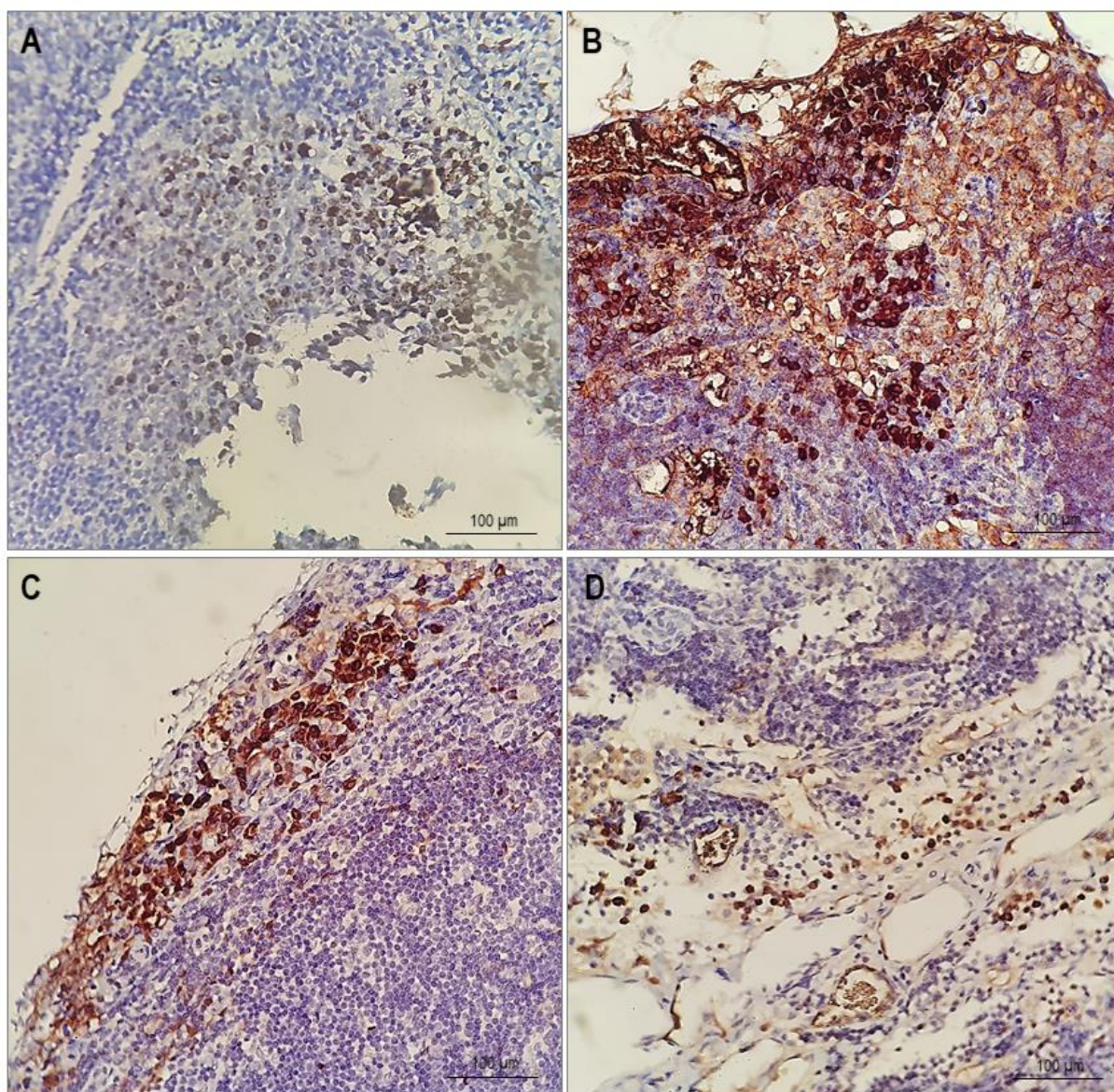




Figura 2. Perfil imuno-histoquímico de proliferação celular (Ki-67), analisado em mama direita de camundongos, após 7 semanas de indução do câncer com DMBA e terapia com fitol (14 mM/kg). **A:** controle (Azeite) – leve marcação (21%, +). **B:** DMBA – expressiva marcação (87%, +++). **C e D:** FIT – moderada (46%, ++) e leve (24%, +) marcação, respectivamente. Score mensurado pela contagem individual de 400 células com citoplasma acastanhado (aumento de 200X).

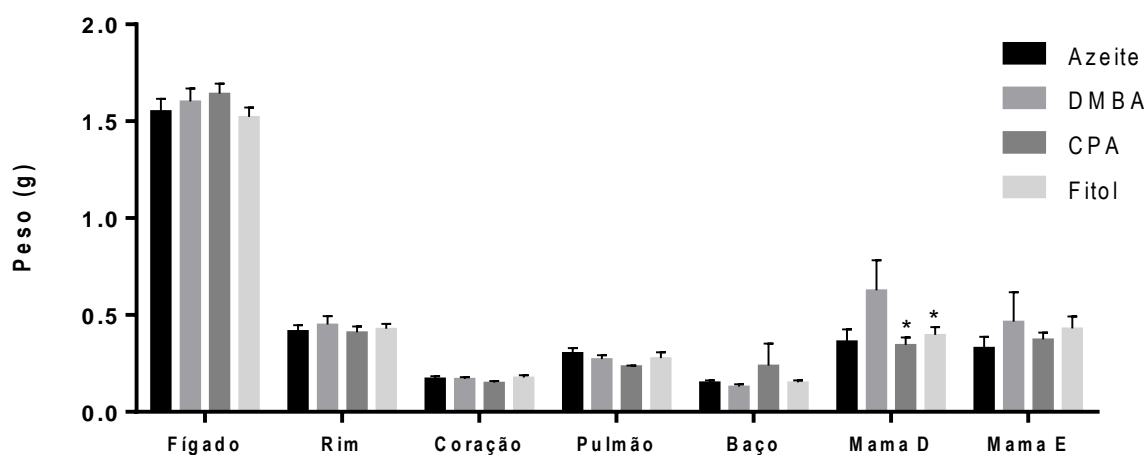


3.1.4 Peso de órgãos após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com FIT

Não foram observadas alterações no peso dos órgãos (fígado, baço, rins, coração e pulmão) dos animais tratados com DMBA, bem como durante terapia com FIT e CPA. Entretanto, para a mama direita dos animais, a que apresentava característica de carcinoma, foi observado aumento do peso após tratamento com DMBA, e significativa redução do peso após terapias com CPA e FIT, comparado ao DMBA, de forma similar ao azeite (Figura 3).



Figura 3. Perfil do peso de órgãos de camundongos fêmeas, após 7 semanas de tratamento com DMBA e terapia com fitol. Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5); FIT: fitol 14 mM/kg. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno 6 mg/kg. CPA: ciclofosfamida 25 mg/kg. * $p < 0,05$ comparado ao grupo DMBA (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

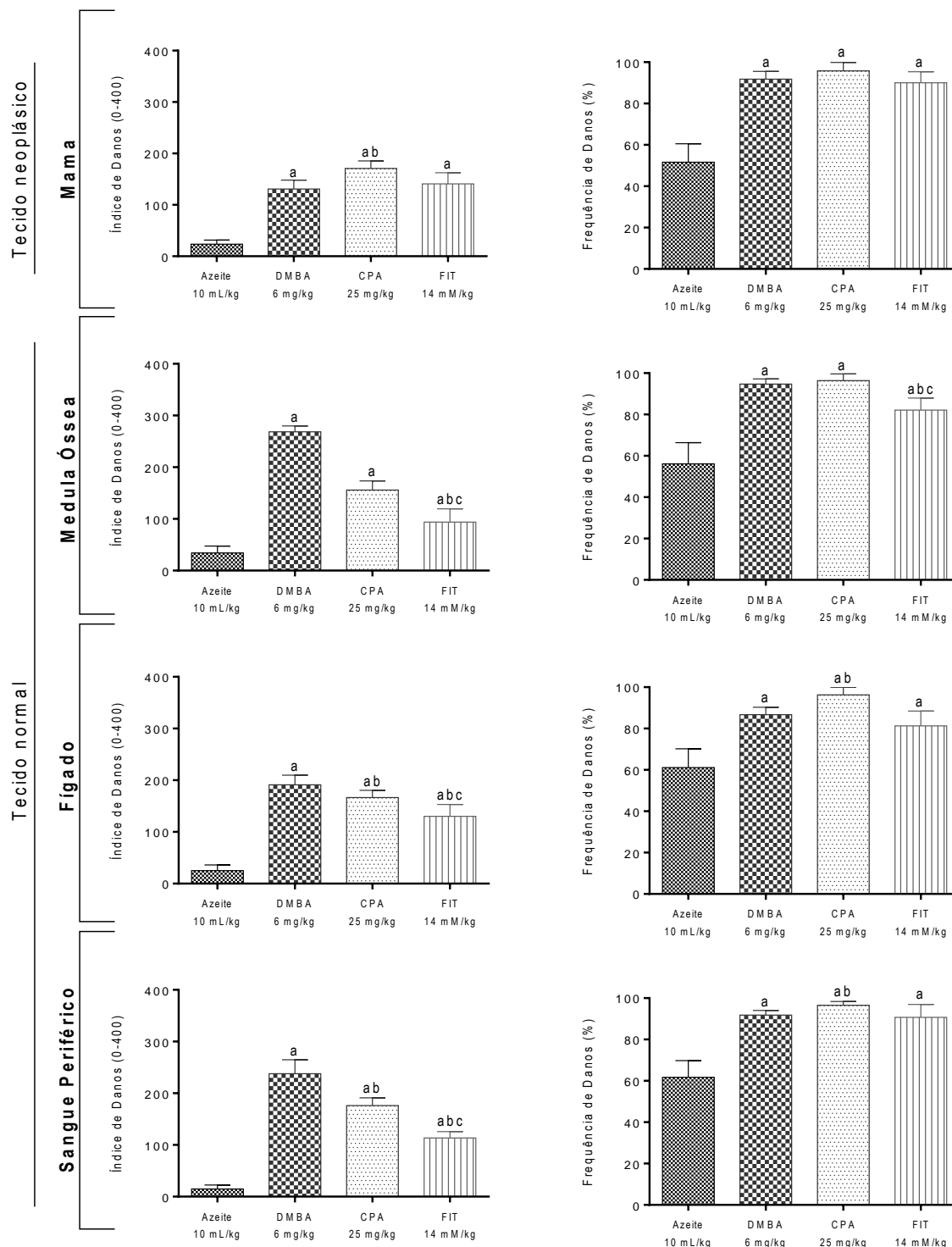


3.1.5 Genotoxicidade em células tumorais e não tumorais durante a indução do câncer de mama com DMBA e terapia com FIT

O DMBA induziu genotoxicidade, como um dos mecanismos de instabilidade genética, pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA, em relação ao grupo azeite. Por outros aspectos, o FIT, assim como a CPA, também induziu genotoxicidade em tecido neoplásico (mama). Entretanto, em tecidos não neoplásicos, tais como fígado, medula óssea e linfócitos de sangue periférico, o FIT induziu menos danos ao DNA, como observado pelo índice de danos comparados ao DMBA e a CPA (Figura 4).



Figura 4. Estudo de genotoxicidade em células neoplásicas (mama) e não neoplásicas (medula óssea, fígado e linfócitos de sangue periférico) de camundongos fêmeas, após 7 semanas de indução do câncer com DMBA (6 mg/kg) e terapia com fitol (14 mM/kg). Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5). FIT = fitol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. CPA = ciclofosfamida (25 mg/Kg). ANOVA (uma via), pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao Azeite. ^b p<0,05 comparado ao DMBA. ^c p<0,05 comparado à CPA.





3.1.6 Avaliação da capacidade de reparo de danos ao DNA em linfócito de sangue periférico após tratamento com DMBA e terapia com FIT

Os danos induzidos pelo DMBA, em linfócitos de sangue periférico, analisados pelo aumento do índice de danos, não foram reparados, como observado na 3^a e 7^a semanas. No entanto, efeitos sugestivos de reparo foram observados para o FIT na 6^a semana. Não foram observadas alterações significantes para a frequência de danos, induzida pelo DMBA, em relação à 1^a semana; o mesmo não foi observado para o FIT (Tabela 3).

Tabela 3. Estudo de reparo de danos ao DNA, em linfócitos de sangue periférico de camundongos fêmeas, durante a indução do câncer de mama com DMBA (avaliação da 1^a, 3^a e 7^a semanas de tratamento) e terapia com FIT (6^a e 7^a semanas).

DMBA	Semanas de tratamento					
	1 ^a	3 ^a			7 ^a	
ID	60,6 ± 8,8	221,2 ± 27,4 ^a			251,4 ± 8,0 ^a	
FD	86,4 ± 2,7	89,2 ± 3,8			92,4 ± 2,6	
FIT	1 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a
ID	50,8 ± 11,4	98,6 ± 20,9 ^a	89,2 ± 9,0 ^a	138,0 ± 35,6 ^{abc}	92,6 ± 15,2 ^{acd}	114,8 ± 16,6 ^{abcde}
FD	43,6 ± 6,0	83,4 ± 7,4 ^a	82,8 ± 4,0 ^a	87,0 ± 9,1 ^a	89,0 ± 3,6 ^a	92,4 ± 4,6 ^a

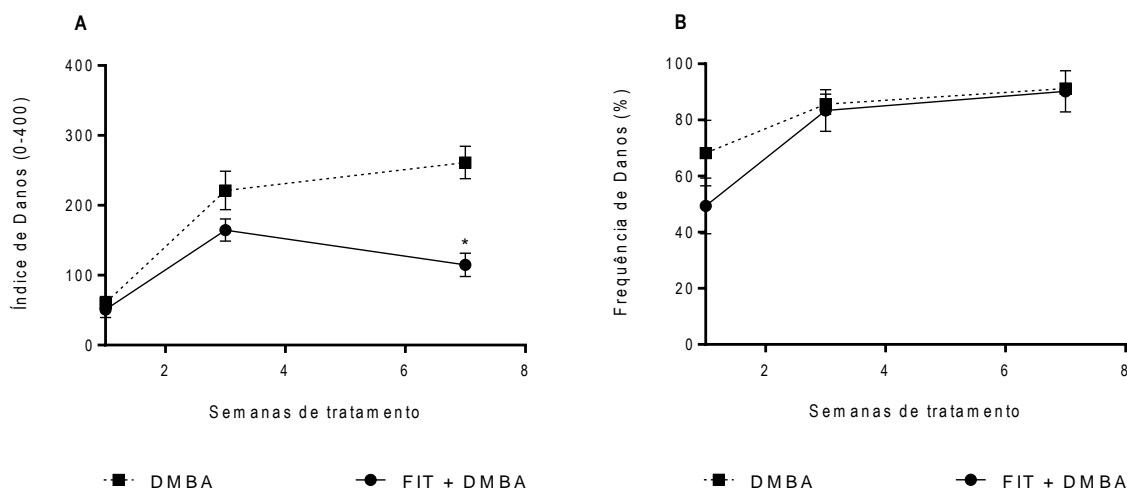
Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). FIT = fitol 14 mM/kg. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno 6 mg/kg. ID = índice de danos. FD = frequência de danos. ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado à 1^a semana. ^b p<0,05 comparado à 3^a semana. ^c p<0,05 comparado à 4^a semana. ^d p<0,05 comparado à 5^a semana. ^e p<0,05 comparado à 6^a semana.

3.1.7 Avaliação do possível efeito antigenotóxico do FIT em relação ao tratamento com DMBA

Em estudos genotóxicos do tratamento com DMBA (6 mg/kg), e terapia com FIT (14 mM/Kg), foi possível observar que o FIT pode modular os efeitos genotóxicos do DMBA, especialmente em relação aos índices de danos ao DNA de linfócitos de sangue periférico, indicando possíveis efeitos antigenotóxicos do bioativo em células não neoplásicas. Esses dados foram comparados com os danos genotóxicos induzidos pelo tratamento com DMBA após 7 semanas de tratamento (Figura 5).



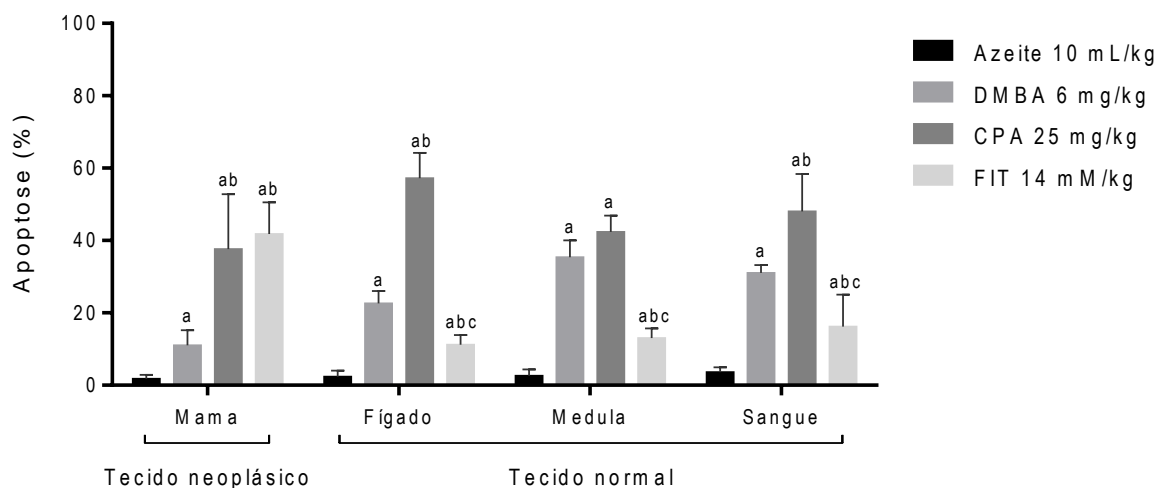
Figura 5. Perfil de modulação induzido pelo fitol, na genotoxicidade produzida pelo DMBA em linfócitos de sangue periférico. A: índice de danos. B: Frequência de danos. Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5). FIT = fitol 14 mM/kg. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno 6 mg/kg. ANOVA (duas vias), pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado apenas com DMBA na mesma semana.



3.1.8 Efeitos apoptóticos após indução de câncer de mama com DMBA e terapias com FIT e CPA

O FIT, assim como a CPA, induziu aumento nos percentuais de apoptose, pela dissolução nuclear, em células neoplásicas de mama, quando comparado com o DMBA e azeite. Entretanto, em células de tecidos não neoplásicos, tais como fígado, medula óssea e linfócitos de sangue periférico, o FIT induziu menor percentual de apoptose, comparado ao DMBA, como também em relação à CPA (Figura 6).

Figura 6. Avaliação do percentual de apoptose em diferentes tecidos de camundongos fêmeas, após 7 semanas de indução do câncer de mama com DMBA e terapia com fitol. Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5). FIT = fitol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. CPA = ciclofosfamida. ANOVA (duas vias), pós-teste de Tukey. $p < 0,05$ comparado ao Azeite^a, DMBA^b e CPA^c.





4 DISCUSSÃO

A avaliação de parâmetros toxicológicos pode fornecer conhecimentos de importância para a caracterização de alterações fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anatomo e histopatológicas compatíveis com os efeitos tóxicos de substâncias químicas naturais e/ou sintéticas sob investigação em diferentes modelos, inclusive estudos de carcinogênese (ANVISA, 2013). Muitos tumores em animais experimentais são induzidos por meio do DMBA, devido a capacidade que esse pró-carcinógeno tem em promover instabilidade genética, como mecanismo para a tumorigênese mamária (LIU et al., 2015). Comumente utilizado em modelos de estudos moleculares de importância para a terapia oncológica (DEAN et al., 1986), o DMBA pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA de células deficientes em BRCA1, gene responsável pelo controle do complexo de checagem do ciclo mitótico (KANG et al., 2013; GANESAN; NTEEB; KEATING, 2014). Além de mutações nesse gene, o DMBA induz alterações no gene *TP53*, como também eventos epigenéticos (HSUE et al., 2008). Um estudo demonstrou que o DMBA induziu toxicidade em vários órgãos de roedores, produziu espécies reativas de oxigênio, induziu a formação de aduto ao DNA e afetou a atividade das enzimas antioxidantes plasmáticas, bem como induziu hepatotoxicidade (ARORA et al., 2014), o que pode justificar alterações de enzimas hepáticas observadas nos grupos tratados com DMBA e FIT. O DMBA induz ainda, quebras de fitas do DNA, que necessitam de reparo, como observado em modelos animais (GANESAN; BHATTACHARYA; KEATING, 2013).

Estudos com roedores tratados com DMBA (1 mg/animal), durante 6 ou 9 semanas, demonstraram o desenvolvimento de tumores mamários na maioria dos animais (68%), confirmado pela análise histopatológica, apontando o modelo de carcinogênese química com DMBA, como de importância para o desenvolvimento de neoplasias, e que as doses de 1 a 3 mg ou superior, podem ser usadas em roedores com eficiência para o desenvolvimento do câncer de mama (OLIVEIRA et al., 2015; MEDINA, KITTRELL, 2005). O DMBA é um químico pró-carcinógeno (CURRIER et al., 2005), que requer ativação metabólica no fígado e na glândula mamária (TAMULSKI; MORREAL; DAO, 1973). Muitos mecanismos para a indução de tumores mamários estão associados com a ativação de receptores de fatores transcricionais AHR, membro da família Per-Arnt-Sim (PAS) (TROMBINO et al., 2000). A ativação de AHR, causa alterações mamárias, devido a ligação DMBA-DNA, podendo ainda induzir proliferação celular (WANG et al., 2011).

No presente trabalho, o DMBA induziu neoplasia mamária, confirmada por análise histopatológica, apresentando ainda, expressiva marcação imuno-histoquímica para a proteína Ki-67. A imunorreatividade para Ki-67 se relaciona com evidência de proliferação celular, visto que essa proteína nuclear, está expressa em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M). O índice do Ki-67 é um fator



prognóstico no CM primário (NISHIMURA et al., 2014), bem como um marcador prognóstico e preditivo amplamente investigado em regimes neoadjuvante e adjuvantes para o CM (DE AZAMBUJA et al., 2007; JONAT; ARNOLD, 2011). A mama dos animais que receberam terapia com FIT, demonstraram leve a moderada (24-46%) marcação para ki-67, estando associado à lesão de menor grau, comparado ao DMBA (87% de marcação).

No presente trabalho, a terapia com FIT não induziu alterações comportamentais e locomotoras nos animais com neoplasias mamárias. Além disso, o tratamento com DMBA, assim como as terapias com FIT e CPA induziram poucas alterações hematológicas e bioquímicas. Assim, especialmente para a terapia com FIT, é possível sugerir que o bioativo pode ter toxicidade leve e/ou moderada em roedores. Por outro lado, o FIT também apresentou toxicidade por sua interferência no peso dos órgãos, apenas em células com CM, no entanto, em fígado, rins, pulmão, coração e baço, não foram observadas reduções de peso. Aspecto similar ao observado no grupo que recebeu terapia com CPA.

Estudos em camundongos indicaram que o FIT demonstra toxicidade (CHOWDHURY; GHOSH, 2012), embora tolerada em roedores (SAIKIA et al., 2010; GHANEIAN et al., 2015; ISLAM et al., 2015), com DL_{50} de 10 g (RIFM, 1978), muito acima da dose de 14 mM/kg utilizada no presente estudo, determinada previamente para os estudos antitumorais (dados não demonstrados). Como observado no trabalho, o FIT pode induzir alterações em enzimas hepáticas. Existem relatos de que o FIT pode induzir hepatotoxicidade com lesões em fígado, ruptura do cordão hepático e pequenas áreas multifocais de necrose de hepatócitos, com infiltração precoce de células inflamatórias (MACKIE et al., 2009; MCGINTY; LETIZIA; API, 2010), induzindo o aumento de enzimas hepáticas (ALT e AST) (LANDROCK et al., 2017). Por outro lado, cabe ressaltar que no estudo antitumoral, o FIT foi administrado a partir da 6ª semana, após um longo período de tratamento com DMBA, o que em partes, pode justificar alterações nestes marcadores de função hepática.

O DMBA é um pró-carcinógeno com capacidade de induzir genotoxicidade em modelos animais, como observado no ensaio cometa. A instabilidade genômica leva ao acúmulo de mutações, passo inicial do processo da carcinogênese (BONASSI et al., 2011; BURRELL; SWANTON, 2014). 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, especialmente na indústria farmacêutica (LEE et al., 2014). 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). Como relatado anteriormente, o DMBA e o FIT induziram genotoxicidade; no entanto,



atividades sugestivas de reparo de DNA em sangue periférico de camundongos foram observadas apenas durante o início da terapia com FIT.

Cabe enfatizar que o aumento dos níveis de danos ao DNA e os mecanismos de reparo ineficientes, também são eventos moleculares para o desenvolvimento do câncer (GUNASEKARANAL; RAJ; CHAND, 2015). Em repostas aos danos ao DNA, as células podem ativar poli-[ADP-ribose]-polimerase 1 (PARP1), como mecanismo de acessibilidade a enzimas de reparo de DNA e de fatores transcricionais (DANTZER et al., 2006), com importância para o reparo de danos e sobrevivência celular (ZIEGLER; OEI, 2001; DEVOS et al., 2012). Entretanto, estudos também apontam que a PARP1 está implicada em apoptose (YU et al., 2006; COHAUSZ; ALTHAUS, 2009), ou necrose (HA; SNYDER, 1999). A PARP1 está envolvida em morte celular dependente de Ca^{2+} e da protease, podendo ativar a proteína Bax, na mitocôndria (MOUBARAK et al., 2007), como também pode ativar fatores pró-apoptóticos, como as proteínas quinase RIP1, que ativam JNK1 e induzem necrose, por bloqueio de permeabilidade da membrana mitocôndria (XU et al., 2006).

Um estudo anterior apontou que o FIT induz a expressão de receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPAR) em células de hepatocarcinoma (GOTO et al., 2005), produzindo efeitos citotóxicos por indução de apoptose, pelo aumento de células na fase sub G1, baixa regulação de Bcl-2, superregulação de Bax e ativação de caspases-9/3, clivagem de PARP e despolarização de membranas mitocondriais, bem como indução de autofagia, além de sua citotoxicidade por indução de espécies reativas de oxigênio, como também pelo aumento da expressão do gene P62 (SONG; CHO, 2015; KIM et al., 2015).

A carcinogenicidade de muitos agentes e de candidatos quimioterápicos é parcialmente dependente de sua capacidade de induzir danos ao DNA, incluindo adutos de DNA, erros de replicação, quebras e ligações cruzadas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008), que podem ser observados por meio do ensaio cometa (VANDGHANOONI; ESKANDANI, 2011). Nos estudos antitumorais, durante o tratamento com DMBA e terapia com FIT, foi observado efeitos genotóxicos para os dois produtos, pelo aumento do índice e frequência de danos. Entretanto, a terapia com FIT produziu atividades antigenotóxicas frente aos danos induzidos pelo DMBA. Propriedades antagônicas, como antioxidantes e citotóxicas, apontam que os diterpenos podem ser uma boa ferramenta para a terapia oncológica (LESGARDS et al., 2014).

A extensão do dano observado no DNA, também depende da liberação de enzimas degradativas, que são liberadas durante os processos de apoptose e necrose, tais como as proteínas pró-apoptóticas caspases-8, -9, -3 e Bcl2 (LIMA et al., 2014). O FIT, de forma similar à CPA, antineoplásico de uso frequente, induziu apoptose por mecanismos de fragmentação e/ou dissolução nuclear, como demonstrado no ensaio cometa. Entretanto, o FIT não foi um significativo indutor de apoptose em células não tumorais, como no tecido hepático, medula óssea e linfócitos de sangue periférico, contrariamente



ao observado para a CPA. Na sua estrutura, o FIT contém um grupo -OH, que pode gerar o radical $\bullet\text{OH}$ (BAKKALI et al., 2008; GYAWALI; IBRAHIM, 2014; ISLAM et al., 2015), e contribuir para a sua citotoxicidade (SACCHETTI et al., 2005), favorecendo a autodestruição de estruturas celulares, como proteínas, lípidos e DNA (ISLAM et al., 2016; ISLAM et al., 2017).

A oxidação está envolvida em vários cânceres e em proliferação peroxissomal, com envolvimento de PPAR's (GONZALEZ; SHAH, 2008). PPAR α , - γ e - β/δ são ativados por fatores transcricionais e são importantes alvos para novos quimioterápicos (RIGANO; SIRIGNANO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2017). O FIT pode induzir respostas via receptor PPAR α , aumento da expressão de catalase, necrose e vacuolização celular hepática, principalmente devido aos seus metabólitos ácido fitânico e ácido pristânico (MACKIE et al., 2009). O ácido fitânico, pode se ligar com o receptor PPAR α e contribuir para a expressão de genes que codificam enzimas que oxidam ácido fático em peroxissomos e mitocôndrias (CATTLEY; POPP, 2002), podendo levar ao aumento da expressão de catalases e indução de hipertrofia e necrose hepatocelular (MACKIE et al., 2009), devido ao acúmulo de lipídios em membranas de hepatócitos (KOMEN et al., 2007).

O FIT pode também inibir a progressão tumoral de glândulas mamárias em ratos (LISKA et al., 2012), bem como seu metabólito, o ácido fitânico (HELLGREN, 2014; WRIGHT et al., 2012), associados com a expressão da caspase-9 e inibição de histona deacetilase (Hdac2); portanto, com envolvimento de mecanismos apoptóticos (NAGAI, 2015). Além disso, em processos de β -oxidação, gera espécies reativas de oxigênio (TAMATANI et al., 1999; SCHONFELD; REISER, 2008), por disfunção nas mitocôndrias, acumulação de lipídios em membranas (KOMEN et al., 2007), oxidação peroxissomal (WRIGHT et al., 2014), e aumento de α -oxidação, levando ao estresse oxidativo (STADELMANN-INGRAND et al., 2004; SONG; CHO, 2015). Estudos também apontam que o FIT inibe a expressão de aromatase em tecidos ovarianos, por inibição da p38 MAPK, podendo ser importante para a prevenção e tratamento de cânceres dependentes de estrógeno, sendo considerado como um agente anticancerígeno (GUO et al., 2014).

5 CONCLUSÃO

Durante a indução do câncer de mama, em modelos de carcinogênese com o uso do DMBA, foi possível observar que esse pró-carcinógeno, assim como a terapia com FIT induziram:

- (1) Alterações hematológicas e hepáticas;
- (2) A indução do câncer de mama pelo DMBA foi confirmada pelas análises histopatológicas.

Os efeitos antitumorais da terapia com FIT foram evidenciados pela ausência de



malignidades nas análises histopatológicas, corroboradas pela redução de marcação para proliferação celular (Ki-67);

- (3) Alterações no peso dos órgãos, pelo DMBA; no entanto, esses efeitos para o FIT foram observados apenas na mama direita;
- (4) Indução de genotoxicidade pelo DMBA, por meio do aumento do índice e frequência de danos ao DNA de células neoplásicas (mama) e não neoplásicas (medula óssea, fígado e linfócitos de sangue periférico); enquanto que o FIT, induziu menos danos genotóxicos em células não neoplásicas;
- (5) Durante a indução de danos genotóxicos, não foram observados efeitos de reparo de DNA durante o tratamento com DMBA; no entanto, a terapia com FIT (6ª semana), demonstrou menos danos genotóxicos;
- (6) Em estudos de modulação de danos genotóxicos em linfócitos, a terapia com FIT demonstrou efeitos antígeno-tóxicos frente aos danos do DMBA;
- (7) O FIT induz apoptose, assim como a CPA, em células neoplásicas de mama; mas ao contrário da CPA, a frequência de apoptose em células normais (fígado, medula óssea e linfócitos de sangue periférico), induzida pelo FIT foi reduzida.

Diante dos mecanismos citogenéticos evidenciados no estudo, é possível sugerir que os dados em modelos animais de carcinogênese química, apontam que o fitol tem potencial para formulações farmacêuticas antitumorais.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-ZAHER, A. M.; ELDEIB, A. M. Breast cancer classification using deep belief networks. **Expert Systems with Applications**, 46, 139-144, 2016.
- 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, 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.
- ANDGHANOONI, S.; ESKANDANI, M. Comet assay: a method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system. **BiolImpacts: BI**, v. 1, n. 2, p. 87, 2011.
- ANVISA (Agência Nacional De Vigilância Sanitária). **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia, Brasília, DF, p. 1-48, 2013.



ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ARNHOLD, T.; ELMAZAR, M.M.A; NAU, H. Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-transretinoic acid. **Toxicology Science**, v. 66, n. 1, pp. 274-282, 2002.

ARORA, R.; BHUSHAN, S.; KUMAR, R.; MANNAN, R.; KAUR, P.; SINGH, A. P.; ARORA, S. Hepatic dysfunction induced by 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene and its obviation with erucin using enzymatic and histological changes as indicators. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112614, 2014.

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.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 2, p. 446-75, 2008.

BARROS, A. C. S.; 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 (α) anthracene. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 59, n. 5, p. 257-261, 2004.

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.

BHOWMIK, A.; DAS, N.; PAL, U.; MANDAL, M.; BHATTACHARYA, S.; SARKAR, M.; JAISANKAR, P.; MAITI, N. C.; GHOSH, M. K. 2, 2'-diphenyl-3, 3'-diindolylmethane: a potent compound induces apoptosis in breast cancer cells by inhibiting EGFR pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59798, 2013.

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.

BURRELL, R. A.; SWANTON, C. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 6, p. 1095-1111, 2014.

CATTLEY, R.C.; POPP, J.A. Liver In: **Handbook of Toxicologic Pathology** (HASCHEK, W.M.; ROUSSEAU, C.G.; WALLIG, M.A, eds). Academic Press, San Diego, 187-225, 2002.

CHOWDHURY, R.R.; GHOSH, S.K. Phytol-derived novel isoprenoid immunostimulants. **Frontiers in Immunology**, v. 22, n.1, pp. 1-11, 2012.

COHAUSZ, O.; ALTHAUS, F.R. Role of PARP-1 and PARP-2 in the expression of apoptosis-regulating genes in HeLa cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 379-391, 2009.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I.; HERNÁNDEZ-GARZA, F.; GARCÍA-PÉREZ, J. O.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. I.; AGUADO-BARRERA, M. E.; CERDA-FLORES, R. M. Evaluation 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.

COSTA, J. P.; OLIVEIRA, G. A. L.; ALMEIDA, A. A. C.; ISLAM, M. T.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, p. 34-42, 2014.

COSTA, J.P.; COSTA, D.A.; ALMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M.; SOUSA, D.P.; FORTES, A.C.; PATRÍCIO, C.C.M.; SOARES, M.F.L.R. Applications of Phytol in Pharmaceutical Formulations Anxiolytic and Antidepressant Properties, BRPI1106397, 2011.



CURRIER, N.; SOLOMON, S. E.; DEMICCO, E. G.; CHANG, D. L.; FARAGO, M.; YING, H.; DOMINGUEZ, I.; SONENSHEIN, G. E.; CARDIFF, R. D.; XIAO, Z. X.; SHERR, D. H.; SELDIN DC (2005). Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. **Toxicologic Pathology**, v. 33, n. 6, p. 726-737, 2005.

DANTZER, F.; AMÉ, J. C.; SCHREIBER, V.; NAKAMURA, J.; MÉNISSIER-DE MURCIA, J.; DE MURCIA, G. Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 Activation During DNA Damage and Repair. **Methods in Enzymology**, v. 409, p. 493-510, 2006.

DE AZAMBUJA, E.; CARDOSO, F.; DE CASTRO, G.; COLOZZA, M.; MANO, M.S.; DURBECQ, V.; SOTIRIOU, C.; LARSIMONT, D.; PICCART-GEHBART, M.J.; PAESMANS, M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 10, p. 1504-1513, 2007.

DE VOS, M.; SCHREIBER, V.; DANTZER, F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 137-146, 2012.

DEAN, J. H.; WARD, E. C.; MURRAY, M. J.; LAUER, L. D.; HOUSE, R. V.; STILLMAN, W.; HAMILTON, T. A.; ADAMS, D. O. Immunosuppression following 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene exposure in B6C3F1 mice—II. Altered cell-mediated immunity and tumor resistance. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 189-198, 1986.

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.

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.

FREEDMAN, R. A.; PARTRIDGE, A. H. Adjuvant therapies for very young women with early stage breast cancer. **Breast**, v. 20, n. 3, p. 146-149, 2011.

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.

GANESAN, S.; NTEEBA, J.; KEATING, A. F. Enhanced susceptibility of ovaries from obese mice to 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced DNA damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 281, n. 2, p. 203-210, 2014.

GHANEIAN, M.T.; EHRAMPOUSH, M.H.; JEBALI, A.; HEKMATI MOGHADDAM, S.H.; MAHMOUDI, M. Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. **Environmental Health Engineering and Management Journal**, v. 2, n.1, p. 13-16, 2015.

GHOSH, S.K. Phytol Derived Immunoadjuvants and Their Use in Vaccine Formulations, U.S. patent 20060292163, 2005.

GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KATO, S.; EGAWA, K.; EBISU, S.; MORIYAMA, T.; KAWADA, T. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPAR α -expressing HepG2 hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 2, p. 440-445, 2005.



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.

GUO, J.; YUAN, Y.; LU, D.; DU, B.; XIONG, L.; SHI, J.; WANG, F. Two natural products, trans-phytol and (22E)-ergosta-6, 9, 22-triene-3 β , 5 α , 8 α -triol, inhibit the biosynthesis of estrogen in human ovarian granulosa cells by aromatase (CYP19). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 279, n. 1, p. 23-32, 2014.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HA, H.C.; SNYDER, S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 13978-82, 1999.

HELLGREN, L.I. Phytanic acidean overlooked bioactive fatty acid in dairy fat? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1190, p. 42-49, 2014.

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.

HSUE, S. S.; WANG, W. C.; CHEN, Y. K.; LIN, L. M. Expression of inhibitors of apoptosis family protein in 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinogenesis is associated with mutant p53 accumulation and epigenetic changes. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 89, n. 5, p. 309-320, 2008.

INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; et al. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1770-1774, 2005.

ISLAM, M. T., DE ALENCAR, M. V. O. B.; MACHADO, K.C., MACHADO, K.C.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 60-73, 2015.

ISLAM, M. T., STRECK, L.; ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, S. W. C.; MACHADO, K.C.; MACHADO, K.C.; DA COSTA JUNIOR, J. S. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, v. 177, p. 93-101, 2017.

ISLAM, M. T.; ALI, E. S.; CARVALHO, R. M.; PAZ, M. A. F.; BRAGA, A.L.; LIMA, R.A.M.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C. Phytanic acid, a daily consumed chlorophyll-yielded phytol bio-metabolite: A comprehensive review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 48, p. 1025-1033, 2016.

JONAT, W.; ARNOLD, N. Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? **Annals of Oncology**, v. 22, n. 3, p. 500-502, 2011.

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. 277-88, 2013.

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. pdb. top069906, 2015.

KIM, C. W.; LEE, H. J.; JUNG, J. H.; KIM, Y. H.; JUNG, D. B.; SOHN, E. J.; KIM, S. H. Activation of Caspase-9/3 and Inhibition of Epithelial Mesenchymal Transition are Critically Involved in Antitumor



Effect of Phytol in Hepatocellular Carcinoma Cells. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, p. 1026-1031, 2015.

KOMEN, J. C.; DISTELMAIER, F.; KOOPMAN, W. J. H.; WANDERS, R. J. A.; SMEITINK, J.; WILLEMS, P. H. M. G. Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 24, p. 3271-3281, 2007.

LANDROCK, D.; MILLIGAN, S.; MARTIN, G.G.; MCINTOSH, A.L.; LANDROCK, K.K.; SCHROEDER, F.; KIER, A.B. Effect of Fabp1/Scp-2/Scp-x Ablation on Whole Body and Hepatic Phenotype of Phytol-Fed Male Mice. **Lipids**, v. 52, n. 5, p. 385-397, 2017.

LEE, W. J.; KIM, S. C.; LEE, S. J.; LEE, J.; PARK, J. H.; YU, K. S.; KWON, S. W. Investigating the different mechanisms of genotoxic and non-genotoxic carcinogens by a gene set analysis. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e86700, 2014.

LESGARDS, J. F.; BALDOVINI, N.; VIDAL, N.; PIETRI, S. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 10, p. 1423-1446, 2014.

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.

LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; ALMEIDA, M. A.; MELLO, F. M.; PIRES, W. C.; PINTO, T. M.; DELELLA, F. K.; FELISBINO, S. L.; MORENO, V.; BATISTA, A. A.; DE PAULA SILVEIRA-LACERDA, E. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium (II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e105865, 2014.

LISKA, J.; MACEJOVA, D.; ONDKOVA, S.; BRTKO, J. Morphology of 1-methyl-1-nitrosourea induced rat mammary tumours after treatment with precursor of phytanic acid or its combination with vitamin D analogue. **Endocrine Regulations**, v. 46, n. 1, p. 21-26, 2012.

LÍŠKA, J.; ONDKOVÁ, S.; MACEJOVÁ, D.; BRTKO, J. Histological evaluation of rat mammary tumours after treatment with retinoic acid analogues — phytol, ttnpb and vitamin d3 analogue seocalcitol. **Biologia**, v. 66, n.2, p. 365-369, 2011.

LIU, Y.; YIN, T.; FENG, Y.; CONA, M. M.; HUANG, G.; LIU, J.; BORMANS, G. 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.

LIU, Z.; KUNDU-ROY, T.; MATSUURA, I.; WANG, G.; LIN, Y.; LOU, Y. R.; BARNARD, N. J.; WANG X. F.; HUANG, M. T.; SUH, N.; LIU, F. Carcinogen 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary tumorigenesis is accelerated in Smad3 heterozygous mice compared to Smad3 wild type mice. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 64878, 2016.

MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; SOUSA, É. B.; COSTA, I. H. F.; MACHADO, K. C.; de SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Spectroscopic studies on the in vitro antioxidant capacity of isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 225, p. 47-53, 2015.

MACKIE, J.T.; ATSHAVES, B.P.; PAYNE, H.R.; MCINTOSH, A.L.; SCHROEDER, F.; KIER, A.B. Phytol-induced hepatotoxicity in mice. **Toxicologic Pathology**, v. 37, p. 201-208, 2009.

MALLA, B.; GAUCHAN, D.P.; CHHETRI, R.B. An ethnobotanical study of medicinal plants used by ethnic people in Parbat district of western Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 165, p. 103-117, 2015.



MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S. API, A.M. Review fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 59-63, 2010

MEDINA, D.; KITTELL, F.S. p53 function is required for hormone-mediated protection of mouse mammary tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 63, n. 19, p. 6140-6143, 2003.

MO, H.; ELSON, C.E. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n. 7, p. 567-85, 2004.

MORAES, J.; DE OLIVEIRA, R. N.; COSTA, J. P.; JUNIOR, A. L.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; PINTO, P. L. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease Schistosomiasis mansoni. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2617, 2014.

MOUBARAK, R.S.; YUSTE, V.J.; ARTUS, C.; BOUHARROUR, A.; GREER, P.A.; MENISSIER-DE MURCIA, J.; SUSIN, S.A. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 13, p. 4844-62, 2007.

NAGAI, K. Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation and mitochondrial dysfunction. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 48, p. 33-39, 2015.

NISHIMURA, R.; OSAKO, T.; NISHIYAMA, Y.; TASHIMA, R.; NAKANO, M.; FUJISUE, M.; ARIMA, N. 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.

OECD, **Test Guideline TG-489**. 2014. Disponível em: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264224179-en > Acesso em 20 setembro de 2017.

OLIVEIRA, K. D.; AVANZO, G. U.; TEDARDI, M. V.; RANGEL, M. M. M.; AVANZO, J. L.; FUKUMASU, H.; RAO, K. V. K.; SINHORINI, I. L.; DAGLI, M. L. Z. Chemical carcinogenesis by DMBA (7, 12-dimethylbenzanthracene) in female BALB/c mice: new facts. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 125-133, 2015.

PLACE, A. E.; SUH, N.; WILLIAMS, C. R.; RISINGSONG, R.; HONDA, T.; HONDA, Y.; GRIBBLE, G. W.; LEESNITZER, L. M.; STIMMEL, J. B.; WILLSON, T. M.; ROSEN, E.; SPORN, M. B. The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazolide, inhibits inflammatory response and tumor growth in vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 2798-2806, 2003.

PONGPRAYOON, U.; BAECKSTRÖM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTRÖM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-PHY isolated from Ipomoea pes-caprae. **Planta Medica**, v. 58, p. 19-21, 1992.

PRATHEESHKUMAR, P.; SREEKALA, C.; ZHANG, Z.; BUDHRAJA, A.; DING, S.; SON, Y. O.; WANG, X.; HITRON, A.; HYUN-JUNG, K.; WANG, L.; LEE, J. C.; SHI, X. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1159-1184, 2012.

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc). **Acute Toxicity Studies on Phytol**, Unpublished Report from BASF, 20 July, Report Number 4455, RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA, 1978.

RIGANO, D.; SIRIGNANO, C.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. The potential of natural products for targeting PPAR α . **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2017.



- RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Experimentally induced mammary tumors in rats. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 379, n. 1, p. 7-20, 1996.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.
- SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA, D.; OJHA, S.; KUMAR, J.K.; CHANOTIYA, C.S.; et al. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 508-512, 2010.
- SAMUELSON, E.; KARLSSON, S.; PARTHEEN, K.; NILSSON, S.; SZPIRER, C.; BEHBOUDI, A. BAC CGH-array identified specific small-scale genomic imbalances in diploid DMBA-induced rat mammary tumors. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 352, 2012.
- SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; PENARROJA-FLORES, R.; TOLEDO-GARCÍA, J.; BRAVO, J. L.; BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutation Research**, v. 640, n. 1, p. 8-15, 2008.
- SANTOS, C. C. D. M. P.; SALVADORI, M. S.; MOTA, V. G.; COSTA, L. M.; ALMEIDA, A. A. C.; OLIVEIRA, G. A. L.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. **Neuroscience Journal**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- SCHONFELD, P.; REISER, G. Comment concerning the article: 'Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action' by Komen et al.: branched chain phytanic acid inhibits the activity of the mitochondrial respiratory chain. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 2266-2269, 2008.
- SONG, Y.W.; CHO, S.K. Phytol Induces Apoptosis and ROS-Mediated Protective Autophagy in Human Gastric Adenocarcinoma AGS Cells. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 4, p. 1-7, 2015.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Molecular Toxicology Protocols**, p. 85-95, 2005.
- STADELMANN-INGRAND, S.; PONTCHARRAUD, R.; FAUCONNEAU, B. Evidence for the reactivity of fatty aldehydes released from oxidized plasmalogens with phosphatidylethanolamine to form Schiff base adducts in rat brain homogenates. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 131, n. 1, p. 93-105, 2004.
- 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.
- TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; GOTO, T.; YAMAMOTO, T.; TAIMATSU, A.; MATSUI, N.; FUSHIKI, T. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. **FEBS letters**, v. 514, n. 2-3, p. 315-322, 2002.
- TAMATANI, T.; HATTORI, K.; NAKASHIRO, K.; HAYASHI, Y.; WU, S.; KLUMPP, D.; REDDY, J.; OYASU, R. Neoplastic Conversion of Human Urothelial Cells In Vitro By Overexpression Of H2O2-Generating Peroxisomal Fatty Acyl Coa Oxidase. **International Journal of Oncology**, v. 15, p. 743-749, 1999.
- 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, n. 12, p. 3117-3122, 1973.



THOPPIL, R.J.; BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. **World Journal of Hepatology**, v. 3, n. 9, p. 228, 2011.

TOMAZ, V. S.; CORDEIRO, R. C.; COSTA, A. M. N.; DE LUCENA, D. F.; JÚNIOR, H. N.; DE SOUSA, F. C. F.; MACÊDO, D. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 268, p. 236-246, 2014.

TROMBINO, A. F.; NEAR, R. I.; MATULKA, R. A.; YANG, S.; HAFFER, L. J.; TOSELLI, P. A.; KIM, D. W.; ROGERS, A. E.; SONENSHEIN, G. E.; SHERR, D. H. Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) and AhR-regulated CYP1. **Breast cancer research and treatment**, v. 63, n. 2, p. 117-131, 2000.

TYAGI, A.; GU, M.; TAKAHATA, T.; FREDERICK, B.; AGARWAL, C.; SIRIWARDANA, S.; SCLAFANI, R. A. Resveratrol selectively induces DNA damage, independent of Smad4 expression, in its efficacy against human head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 16, p. 5402-5411, 2011.

VAN SLOOTEN, H.J.; CLAHSSEN, P.C.; VAN DIERENDONCK, J.H.; DUVAL, C.; PALLUD, C.; MANDARD, A.M.; DELOBELLE-DEROIDE, A.; VAN DE VELDE, C.J.; VAN DE VIJVER, M.J. Expression of Bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 74, n. 1, p. 78-85, 1996.

WANG, L.; HU, T.; SHEN, J.; ZHANG, L.; CHAN, R.L.; LU, L.; LI, M.; CHO, C.H.; WU, W.K. Dihydrotanshinone I induced apoptosis and autophagy through caspase dependent pathway in colon cancer. **Phytomedicine**, v. 22, n. 12, pp. 1079-1087, 2015.

WANG, T.; GAVIN, H. M.; ARLT, V. M.; LAWRENCE, B. P.; FENTON, S. E.; MEDINA, D.; VORDERSTRASSE, B. A. 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.

WRIGHT, M. E.; ALBANES, D.; MOSER, A. B.; WEINSTEIN, S. J.; SNYDER, K.; MÄNNISTÖ, S.; GANN, P. H. Serum phytanic and pristanic acid levels and prostate cancer risk in Finnish smokers. **Cancer Medicine**, v. 3, n. 6, p. 1562-1569, 2014.

WRIGHT, M.; BOWEN, P.; VIRTAMO, J.; ALBANES, D.; GANN, P. Estimated phytanic acid intake and prostate cancer risk: a prospective cohort study. **International Journal of Cancer**, v. 131, p. 1396-1406, 2012.

XU, Y.; HUANG, S.; LIU, Z. G.; HAN, J. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8788-8795, 2006.

YAACOB, N. S.; YANKUZO, H. M.; DEVARAJ, S.; WONG, J. K. M.; LAI, C. S. Anti-tumor action, clinical biochemistry profile and phytochemical constituents of a pharmacologically active fraction of *S. crispus* in NMU-induced rat mammary tumour model. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126426, 2015.

YU, S. W.; ANDRABI, S. A.; WANG, H.; KIM, N. S.; POIRIER, G. G.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Apoptosis-inducing factor mediates poly (ADP-ribose)(PAR) polymer-induced cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 48, p. 18314-18319, 2006.

ZEIGER, E.; GOLLAPUDI, B.; AARDEMA, M. J.; AUERBACH, S.; BOVERHOF, D.; CUSTER, 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. 277-285, 2015.



ZIEGLER, M.; OEI, S.L. A cellular survival switch: poly (ADP-ribosyl) action stimulates DNA repair and silences transcription. **Bioessays**, v. 23, n. 6, p. 543-548, 2001.



8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou uma associação do fitol com toxicidade e citotoxicidade, por meio de revisão sistemática e meta-análise em diferentes estudos com abordagens *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Destacaram-se nos estudos *in vitro* e *ex vivo* a indução de apoptose, por diferentes mecanismos, especialmente ativação de PPAR e geração de espécies reativas de oxigênio. Para os estudos *in vivo*, a ativação de PPAR também foi apontada; no entanto, 24% dos estudos não demonstraram evidências claras dos possíveis mecanismos de toxicidade e citotoxicidade envolvidos.

Os testes toxicogênicos do fitol em ratos demonstraram que a administração aguda não produziu morte. Entretanto, alterações toxicológicas (aumento do consumo de água e micção), de patologia clínica (eritropenia, eosinofilia, neutrofilia e linfopenia) e neurofarmacológica (aumento de autolimpeza e redução da atividade locomotora, especialmente nas maiores doses subcrônicas) foram observadas dependendo do tratamento e das doses testadas. Além disso, não foram evidenciadas alterações histopatológicas hepáticas. Por outro lado, o fitol induziu genotoxicidade em células de medula óssea, fígado, rim e sangue periférico (sem atividade de reparo), mas não houve indícios de mutagenicidade em medula óssea.

Os testes antitumorais do fitol em cultura primária de Sarcoma 180 e linhagem HL-60 apontaram citotoxicidade do fitol pela diminuição de viabilidade celular e dos índices de divisão celular, incluindo apoptose e necrose. A genotoxicidade do fitol foi pontuada pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA nos modelos testados. Além disso, o fitol induziu mutagenicidade por mecanismos aneugênicos e/ou clastogênicos, como também outras anormalidades nucleares, tais como pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares. Também foi evidenciada indução de apoptose nos modelos utilizados. No entanto, a indução de necrose foi observada apenas na maior concentração do fitol para HL-60.

Por fim, durante o estudo toxicogênico e antitumoral do fitol em modelo de carcinogênese com o uso do DMBA, foi possível observar que esse pró-carcinógeno, assim como a terapia com fitol induziram alterações hematológicas e em enzimas hepáticas. Os efeitos antitumorais da terapia com fitol foram evidenciados pela ausência de malignidades nas análises histopatológicas, corroboradas pela leve a moderada marcação para proliferação celular (Ki-67). Além disso, o fitol induziu genotoxicidade pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA de células neoplásicas (mama) e, em menor proporção, em células não neoplásicas (medula óssea, fígado e linfócitos de sangue periférico). Por outro lado, a terapia com fitol demonstrou efeitos antigenotóxicos frente às semanas de tratamento com DMBA. O fitol também induziu apoptose, assim como a CPA, em células neoplásicas de mama, mas, ao contrário da CPA, induziu mínimos efeitos em células hepáticas, medula óssea e linfócitos de sangue periférico.



Assim, a bioprospeção farmacológica do fitol aponta mecanismos citogenéticos compatíveis com atividade antitumoral, podendo sugerir que esse diterpenoide tem potencial biotecnológico para figurar como candidato a fármaco antitumoral.



ANEXO A – CARTA DE ACEITE DE ARTIGO EM PERIÓDICO INDEXADO

17 Aug, 2017

Manuscript no. ACAMC-16-11-9

Dear Dr. MT Islam

It is pleasure to accept the manuscript "Association of Phytol with Toxic and Cytotoxic Activities in an Antitumoral Perspective: A Meta-Analysis and Systemic Review" submitted for the special issue: '**Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Spl. thematic issue: Network-based drug discovery, anti-cancer molecular targets and therapeutic use of phytochemicals)**'.

Complete authors' list: **Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Muhammad Torequl Islam*, M. Eunus S. Ali, José Victor de Oliveira Santos, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, João Marcelo de Castro e Sousa, Sandra Maria Mendes de Moura Dantas, Siddhartha K. Mishra†, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante**

Dear Sir,

I would request you to kindly fill the attached copyright form and send it to me at the earliest.

Thanks for your cooperation and taking interest in this special issue.

Warm Regards
Raj Kumar Koiri
Raj Kumar Koiri, PhD
Guest Editor

Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry

Spl. thematic issue: Network-based drug discovery, anti-cancer molecular targets and therapeutic use of phytochemicals.

<http://benthamscience.com/journals/anti-cancer-agents-in-medicinal-chemistry/special-issues/#top>



ANEXO B – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Manuscript Details

Manuscript number	MUTGEN_2017_214
Title	Toxicogenic profile of phytol in Wistar female rats
Article type	Research paper

Abstract

Phytol is an immunoadjuvant, antimutagenic, anxiolytic, antimicrobial, antiprotozoal, anti-inflammatory, antioxidant, anti-atherogenic, antidiabetic, hypoglycemic, antispasmodic, anticonvulsant, antinociceptor and antidepressant diterpenoid. However, its toxicological profile is unknown. This study aimed at the toxicogenic investigation of phytol. Forty five female non-pregnant Wistar albino rats were subjected to acute and subchronic treatment of phytol at doses of 300 and 2000 mg/kg and 30, 60 and 90 mg/kg for 14 and 28 days, respectively. Hippocratic, neuropharmacological, genotoxic and mutagenic effects were investigated. The results showed that phytol did not cause death any animal at 2000 suggesting the LD50 of phytol above 2000 mg/kg. Several toxicological alterations were observed in clinical and neuropharmacological parameters, depending on the treatments and doses. No hepatic histopathological changes were observed. Phytol induced genotoxicity in all treatments in peripheral blood, bone marrow, liver and kidney cells. There was no evidence of damage repair activity in peripheral blood cells. In the bone marrow, both acute and subchronic phytol treatments increased micronucleus frequency, suggesting a mutagenic effect. Phytol-induced oxidative stress may be responsible for the cause of neuropharmacological alterations and genetic instability.

Keywords	phytol; acute toxicity; chronic; comet assay; micronucleus test.
Corresponding Author	Md. Torequul Islam
Corresponding Author's Institution	Federal University of Piauí
Order of Authors	marcus alencar, Md. Torequul Islam, Antonielly dos Reis, José Santos, Márcia Paz, Adriana Nunes, Felipe da Silva, Keylla machado, Sandra Dantas, Luciano Lopes, João Marcelo Sousa, Paulo Ferreira, Ana Amélia Melo-Cavalcante

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.doc [Cover Letter]

Highlights.doc [Highlights]

MS2-Final.doc [Manuscript File]

CI discloser.doc [Conflict of Interest]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.



ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone: (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 13 de Março de 2015.

Ilmo.

Prof. Dr. RIVELILSON MENDES DE FREITAS.
Departamento: Bioquímica e Farmacologia/CCS/UFPI.

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (13 de Março de 2015), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **004/15**, o projeto de pesquisa intitulado **"Bioprospecção do efeito modulador enzimático e avaliação da toxicidade em ratos tratados com Fitol"**, sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Abril/2015 à Dezembro/2018, e serão usados Ratos Isogênicos (45 machos e 65 fêmeas). Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof.^a Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO D – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Journal of Cellular Biochemistry



Journal of Cellular Biochemistry

Cytogenetic alterations indicative of phytol suggesting antitumor activities in Sarcoma 180 and HL-60 cell lines

Journal:	<i>Journal of Cellular Biochemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Alencar, Marcus ; Universidade Federal do Piaui Paz , Márcia ; Universidade Federal do Piaui Mata, Ana ; Universidade Federal do Piaui Reis, Antonielly ; Universidade Federal do Piaui de Lima, Rosália ; Universidade Federal do Piaui Santos, José ; Universidade Federal do Piaui Braça, Antonio ; Universidade Federal do Piaui Ferreira, José ; Universidade Federal do Piaui Islam , Muhammad ; Universidade Federal do Piaui, Pharmaceutical Science; Southern University Bangladesh, Sousa, João ; Universidade Federal do Piaui Ferreira, Paulo ; Universidade Federal do Piaui Melo-Cavalcante, Ana Amélia ; Universidade Federal do Piaui
Keywords:	genotoxicity, apoptosis, necrosis

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons, Inc.



ANEXO E – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-6734 e-mail: ceemp@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Toxicogenética dos produtos naturais Fitol, Gingerol e Citrinina frente às suas possíveis ações antitumorais", protocolo nº 167/16, sob a responsabilidade da Profa. Dra. ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE – Núcleo de Tecnologia Farmacêutica-NTF/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 Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 17/06/2016.

Vigência do Projeto	Julho/2016 à Janeiro/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogêneo/ swiss
Nº de Animais	60
Peso/ Idade	25-30g/2 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central no CCA/UFPI

Teresina, 17 de Junho de 2016.


Prof^a. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora



ANEXO F – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Archives of Toxicology

Phytol toxicogenic profile by the DMBA-induced cancer model in Swiss mice –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	Phytol toxicogenic profile by the DMBA-induced cancer model in Swiss mice
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Mohammed Torequul Islam, PhD (Ongoing) Universidade Federal do Piauí BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Piauí
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Ms
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Ms Rosália Maria Torres de Lima, Ms Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Ms Antonielly Campinho dos Reis, Hon;s Antonio Luiz Gomes Júnior, Ms Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Ms José Williams G. de Oliveria Filho, Ms Mohammed Torequul Islam, PhD (Ongoing) Joaquim Soares da Costa Junior, PhD Gilberto Santos Cerqueira, PhD Luciano da Silva Lopes, PhD Paulo Michel Pinheiro Ferreira, PhD João Marcelo de Castro e Sousa, PhD Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Phytol (Pyt) has several pharmacological activities related to toxicity, cytotoxicity and oxidation. Considering the urgency of new pharmaceutical formulations for breast cancer therapy, this study aimed at the evaluation of antitumor activity of phytol in 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) induced animal model. Cytogenetics, DNA repair and antigenotoxic activities were evaluated in neoplastic (breast) and non-neoplastic rodent cells (bone marrow, lymphocytes, liver) by comet assay. Additionally, hematological, biochemical, histopathological and immunohistochemical analyzes were also done in experimental animals. Thirty non-pregnant female mice (n = 5) were underwent 7 weeks treatment with 6 mg/kg pro-carcinogen and Pyt (14 mM/kg) and cyclophosphamide (25 mg/kg). Cancer induction was confirmed by histopathology and immunohistochemistry for Ki-67. The results suggest that Pyt exhibited low toxicity in comparison to the other groups in respect of hematological, biochemical, histopathological and organ size parameters. Pyt showed modulatory effects on the pro-carcinogen. However, Pyt induced genotoxicity and apoptosis in breast cancer

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Arles Systems Corporation

REVIEW

Diterpenes as lead molecules against neglected tropical diseases

Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar,¹ João Marcelo de Castro e Sousa,^{2,3} Hercília Maria Lins Rolim,^{3,4} Maria das Graças Freire de Medeiros,^{3,4} Gilberto Santos Cerqueira,^{3,5} Fernanda Regina de Castro Almeida,^{1,6} Antônio Maria das Graças Lopes Cito,^{3,7} Paulo Michel Pinheiro Ferreira,^{1,3,8} José Arimatéia Dantas Lopes,⁷ Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,3} and Md. Torequl Islam^{1,9*}

¹Postgraduate Program in Biotechnology (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

²Department of Biological Sciences, Federal University of Piauí, Picos, (Piauí), 64.607-670, Brazil

³Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

⁴Department of Pharmacy, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

⁵Postgraduate Program in Biotechnology, Biotechnology and Biodiversity Center for Research (BIOTEC), Federal University of Piauí (LAFPEX), Parnaíba, Piauí 64.218-470, Brazil

⁶Department of Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

⁷Department of Chemistry, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

⁸Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

⁹Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, Mehedibag, Chittagong 4000, Bangladesh

Nowadays, neglected tropical diseases (NTDs) are reported to be present everywhere. Poor and developing areas in the world have received great attention to NTDs. Drug resistance, safety profile, and various challenges stimulate the search for alternative medications. Plant-based drugs are viewed with great interest, as they are believed to be devoid of side effects. Diterpenes, a family of essential oils, have showed attractive biological effects. A systematic review of the literature was carried out to summarize available evidences of diterpenes against NTDs. For this, databases were searched using specific search terms. Among the 2338 collected reports, a total of 181 articles were included in this review. Of them, 148 dealt with investigations using single organisms, and 33 used multiple organisms. No mechanisms of action were reported in the case of 164 reports. A total of 93.92% were related to nonclinical studies, and 44.2% and 16.6% dealt with preclinical and clinical studies, respectively. The review displays that many diterpenes are effective upon Chagas disease, chikungunya, echinococcosis, dengue, leishmaniasis, leprosy, lymphatic filariasis, malaria, schistosomiasis, and tuberculosis. Indeed, diterpenes are amazing drug candidates against NTDs. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: diterpenes; neglected tropical diseases; therapeutic potential.

INTRODUCTION

Neglected tropical diseases (NTDs) are generally termed as a diverse group of communicable diseases that occur in tropical and subtropical conditions in about 150 countries, affect more than one billion people and cost billions of dollars each year (WHO, 2016). Poverty, illiteracy, negligent mentality, inadequate sanitation, climate conditions, high-vector density habitat, and proximity to infected domestic animals are the collective causes of NTDs. Dietary causes of NTDs are also of concern, such as swine meat bearing more than 100 viruses, parasites, and bacteria. It has been reported that pork causes more than 30 diseases in humans. Among them, H1N1 caused by 'swine flu' and cysticercosis by *Taenia solium* are well known (Dr. Axe, 2016). Interventions are generally guided as per local epidemiology, diagnosis, preventive measures, and control (Geary,

2016). However, awareness of such diseases and leading a healthy lifestyle are not enough. Therefore, appropriate and effective medications are to be considered, despite their side effects, as these diseases affect vital organs. Otherwise, some of the pathogens may enter systemic circulation and attack multiple organs. In a word, NTDs may connect both topically and systemic pathogenesis.

Notably, all antimicrobial and antiparasitic drugs act through growth retardation and/or direct effects. This is always a question of drug targeting or specificity in action. Therefore, an ideal NTD drug should have availability, affordability, more parasitocidal than static potential, ability to scavenge the organism without harming of host cells, and rapidity in action. However, it is an optimistic dream to find out a biochemical or chemical agent acting as a drug devoid of toxic effects. In this context, more precautions are recommended for the pregnant women, children, and/or patients suffering from single or multiple organ complications. While treating NTDs, unwanted physiological effects, such as nausea, vomiting, and problems in the digestive tract, also commonly occur as side effects. Some anti-NTD

* Correspondence to: Md. Torequl Islam, Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, Mehedibag (Chittagong)-4000, Bangladesh.
 E-mail: shionufpi.br@gmail.com