



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

JOSÉ WILLIAMS GOMES DE OLIVEIRA FILHO

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE PRODUTOS NATURAIS ISOLADOS DE
FUNGOS ASSOCIADOS DE ALGAS MARINHAS PARA FORMULAÇÕES
ANTITUMORAIS**

TERESINA – PI

2018

JOSÉ WILLIAMS GOMES DE OLIVEIRA FILHO

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE PRODUTOS NATURAIS ISOLADOS DE
FUNGOS ASSOCIADOS DE ALGAS MARINHAS PARA FORMULAÇÕES
ANTITUMORAIS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, ponto focal: Universidade Federal do Piauí, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Área de Concentração e linha de Pesquisa:

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

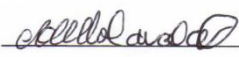


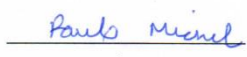

Ponto Focal: Piauí

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: JOSÉ WILLIAMS GOMES DE OLIVEIRA FILHO

TÍTULO DO PROJETO: “AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE PRODUTOS NATURAIS ISOLADOS DE FUNGOS ASSOCIADOS DE ALGAS MARINHAS PARA FORMULAÇÕES ANTITUMORAIS.”

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

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Benedito Borges da Silva - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira – UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Profa. Dra. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade - IFMA (Examinador)	<u>satisfatório</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 25 de outubro de 2018.

HORÁRIO: 14h00

LOCAL: Auditório do Departamento de Enfermagem - UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimateia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Prof^a. Dr^a. Nadir Nascimento Nogueira

PRÓ-REITORA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Carla Maria de Carvalho Leite

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA/RENORBIO – COORDENAÇÃO GERAL - UFRN**

Prof^a. Dr^a. Lucymara Fassarella Agnez Lima

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA/RENORBIO – PONTO FOCAL - UFPI**

Prof^a. Dr^a. Carla Eiras

A VIDA

A vida é uma oportunidade, aproveite-a...

A vida é beleza, admire-a...

A vida é felicidade, deguste-a...

A vida é um sonho, torne-o realidade...

A vida é um desafio, enfrente-o...

A vida é um dever, cumpra-o...

A vida é um jogo, jogue-o...

A vida é preciosa, cuide dela...

A vida é uma riqueza, conserve-a...

A vida é amor, goze-o...

A vida é um mistério, descubra-o...

A vida é promessa, cumpra-a...

A vida é tristeza, supere-a...

A vida é um hino, cante-o...

A vida é uma luta, aceite-a...

A vida é aventura, arrisque-a...

A vida é alegria, mereça-a...

A vida é vida, defenda-a...

(Madre Teresa de Calcutá)

DEDICATÓRIA

A Deus e a Nossa Senhora de Fátima. Um momento de oração é sempre importante, pois permite um nível de prudência e humildade que possibilita encontrar aquela “luz no fim do túnel”, luz que nos faz acreditar que tudo dará certo, permitindo renovar a esperança.

À Família mais bela de todas: a minha!

Aos meus pais **Maria Teresa e José Williams**. Mais um degrau vencido! Essa vitória também é de vocês. Obrigado por terem me ensinado a nunca desistir e por, talvez, mesmo sem saber da existência das ideias e teorias de Charles Darwin, conseguirem repassar para mim que na vida precisamos estar sempre prontos para brigar diante das mais variadas fontes de seleção imposta pela vida. Obrigado por ter recebido seus genes! Eles me ajudaram muito na estrada da vida. Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos, **Karla Cristina, Raimundo Neto e Luiz Torquato**, que sejamos sempre cúmplices na jornada da vida. Somente nós conhecemos a nossa estrada! Amo vocês!

À minha princesa e esposa **Naiana Oliveira**, forte, guerreira e inteligente, que, embora muitas vezes, não contente com minha ausência, por trocar sua maravilhosa companhia pela pesquisa, por trocar seus carinhos pelos experimentos de bancada necessários ao êxito deste trabalho, teve maturidade para compreender e apoiar-me nesta etapa tão importante para mim e toda a nossa família. Ao observá-la, vejo a melhor parte de mim... Amo você!

Às minhas pedras preciosas, **Beatriz Oliveira e João Artur Oliveira**, vocês sempre me inspiram a viver cada vez mais. Espero que o espírito da coragem, determinação e sabedoria sempre acompanhem vocês, pois conquistar algo não é nada fácil, exige empenho, determinação e pensamento positivo. Vocês me fazem cada dia melhor... Amo vocês!

DEDICATÓRIA ESPECIAL

À minha orientadora Profa. Dra. **Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante**, por acreditar nessa parceria, pela sua competência e total disponibilidade em me ajudar, especialmente, nos momentos em que sua experiência e dedicação foram decisivos para o sucesso desta nossa jornada. Obrigado minha mãe científica!

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI, na pessoa do Reitor Dr. **Paulo Henrique Gomes de Lima**, que sem medir esforços, possibilita a qualificação de seus professores e, desta forma, engrandece e melhora o ensino dessa Instituição.

Ao Colégio Sagrado Coração de Jesus – CSCJ, na pessoa da Diretora Irmã **Nídia Machado Ribeiro** e aos amigos Ma. **Terezinha Gomes da Silva** e Me. **Marcelo Alessandro Amorim Franco de Sá**, que, por acreditarem na minha capacidade, conceberam, dentro de suas possibilidades, condições para facilitar minha conduta nesta corajosa qualificação.

Ao amigo Dr. **Francisco Soares Santos Filho**, por encorajar-me e demonstrar claramente o verdadeiro sentido de uma pós-graduação.

À amiga Dra. **Francisca da Rocha Barros**, por disponibilizar parte de seu precioso tempo para competente revisão desta tese.

Às secretárias da Coordenação do Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO - Ponto focal Piauí: Deusilene e Eliane.

Às Coordenações RENORBIO Geral e Ponto Focal Piauí pelo empenho e permissões, dentro das possibilidades necessárias, para que eu pudesse concluir esta pesquisa.

À amiga Dra. **Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade**, por toda atenção, coragem e disponibilidade em ceder as substâncias testes. Uma pós-graduação é algo que exige paciência e persistência, aventurar-se sozinho é uma estratégia dolorosa. O segredo? **Uma parceria de verdade!** Obrigado minha parceira!

Aos amigos do **laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica – LAPGENIC**, **José Victor, Marcus Alencar, Antônio Braga, Ricardo de Carvalho, Ag-anne de Menezes, Ana da Mata, Júnior Gomes, Débora Cássia, Kátia Machado, Keylla Machado e Muhammad Torequl Islam**, um grupo com diversos projetos, sonhos e metas descritas, mas com ansiedades semelhantes! Conseguimos! Ainda sobre o grupo **LAPGENIC**, não poderia

deixar de agradecer, imensamente, às amigas de coração, **Antonielly Campinho dos Reis** e **Rosália Maria Tôrres de Lima**. Amigos são anjos que nos ajudam a voar quando não conseguimos abrir as asas sozinhos... sem a ajuda de vocês não seria possível concluir esta obra.

Aos professores Dr. **João Marcelo de Castro e Sousa**, Dr. **Paulo Michel Pinheiro Ferreira** e Dr. **José Roberto de Oliveira Ferreira** pelas importantes colaborações para esta tese.

Aos professores do Programa RENORBIO ponto focal – PI.

E aos meus alunos, maior **PATRIMÔNIO** de um professor!

Se eu pudesse...

Se eu pudesse deixar algum presente a você,
deixaria aceso o sentimento de amar
a vida dos seres humanos.
A consciência de aprender tudo
o que foi ensinado pelo tempo afora.
Lembraria os erros que foram cometidos
para que não mais se repetissem.
A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse,
o respeito àquilo que é indispensável:
Além do pão, o trabalho.
Além do trabalho, a ação.
E, quando tudo mais faltasse,
um segredo:
O de buscar no interior de si mesmo
a resposta e a força para
encontrar a saída."

(Mahatma Gandhi)

OLIVEIRA FILHO, J. W. G. **Avaliação toxicogenética de produtos naturais isolados de fungos associados de algas marinhas para formulações antitumorais**. Orientadora: Dr^a. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 2018. 209 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

RESUMO

Os fungos endófitos marinhos são ricos em metabólitos secundários e constituem uma importante fonte na procura por novos agentes terapêuticos. O estudo objetivou investigar o perfil toxicogenético do extrato acetonitrila e dos metabólitos dicitrinina-A e citrinina, obtidos do *P. citrinum* em *Artemia salina*, *Allium cepa* e *Saccharomyces cerevisiae*, como análises preliminares para a avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e antitumoral da citrinina em modelos murinos para Sarcoma 180 e para câncer de mama induzido por 7,12-dimetilbenzantraceno, com monitoramentos comportamentais, bioquímicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos (Ki-67). As substâncias isoladas foram identificadas através de técnicas espectrométricas e espectroscópicas. Náuplios de *A. salina* foram expostos por 24 e 48 horas e *A. cepa* por 72 horas às substâncias. A avaliação oxidante/antioxidante foi feita em pré, co- e pós-tratamento com H₂O₂ em *S. cerevisiae*. A citrinina nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2 µg/mL foi incubada durante 68 horas em células do líquido ascítico de Sarcoma180 e reincubadas durante 4h em estufa a 37°C e a 5% CO₂ após adição de suspensão de células, 20 µL de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (5 mg/mL). Em seguida 0,5 x 10⁶ células/mL da suspensão foram submetidas aos testes cometa alcalino e de micronúcleos. O câncer de mama em *Mus musculus*, fêmeas virgens, foi induzido pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (6 mg/Kg, v.o.). O veículo foi o azeite de oliva (10 mL/Kg), citrinina testada em 2 µg/Kg⁻¹, v.o. e a ciclofosfamida (25 mg/Kg⁻¹, i.p.), como controle positivo. A indução do câncer de mama ocorreu em onze semanas e a terapia com citrinina em 3 semanas. Em *A. salina*, o extrato acetonitrila, citrinina e a dicitrinina-A apresentaram toxicidade com CL₅₀ (24 horas) de 2,03 µg/mL, 1,71 µg/mL e 2,29 µg/mL, bem como CL₅₀ (48 horas) de 0,51 µg/mL, 0,54 µg/mL e 0,54 µg/mL, respectivamente. Em *A. cepa*, as substâncias foram citotóxicas pelo baixo índice mitótico e mutagênicos pelo aumento de micronúcleos e de alterações cromossômicas. O extrato e seus metabólitos, em *S. cerevisiae*, somente em baixas concentrações, foram antioxidantes frente ao H₂O₂ em linhagens proficientes e mutantes para a superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial. A CI₅₀ da citrinina, em células de S-180 foi de 3,77 µg/mL e nas concentrações 12,5 e 100 µg/mL, foi tão citotóxica quanto à doxorubicina (2 µg/mL). Em 0,5; 1,0 e 2 µg/mL, citrinina induziu genotoxicidade e mutagenicidade em células de S-180, especialmente em 2 µg/mL, por danos oxidativos similares ao peróxido de hidrogênio (10 mM), por mecanismos associados a danos citogenéticos, especialmente apoptoses. O câncer de mama foi caracterizado como carcinoma mamário invasivo pela imuno-histoquímica e análise histopatológica. A citrinina induziu efeitos genotóxicos em células da mama, medula, linfócitos e fígado, e efeitos mutagênicos pela formação de micronúcleos, pontes, brotos e células binucleadas em medula óssea e fígado. Não foram observadas alterações nos pesos dos órgãos, exceto nas mamas. Efeitos similares da genotoxicidade foram observados para citrinina e ciclofosfamida, mas reparo de danos em linfócitos foi observado apenas na terapia com citrinina, que apresentou ação antitumoral, por mecanismos citogenéticos, possivelmente, associado a estresse oxidativo. Os metabólitos secundários obtidos do extrato acetonitrila do *P. citrinum* são fontes promissoras para formulações farmacêuticas antitumorais.

Palavras-chave: Citrinina. Câncer de mama. Genotoxicidade. Mutagenicidade. Apoptose.

OLIVEIRA FILHO, J. W. G. **Toxicogenic evaluation of natural products isolated from fungi associated with marine algae for antitumor formulations.** Advisor: Dr^a. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. 2018. 209 p. Doctoral thesis. Post-Graduate Program in Biotechnology. Northeast Network of Biotechnology – RENORBIO. Federal University of Piauí, Teresina.

ABSTRACT

Marine endophyte fungi are rich in therapeutic agents. Our study aimed to investigate the toxicogenetic profile of the acetonitrile extract and the metabolites dicitrinin-A and citrinin, obtained from *P. citrinum* in *Artemia salina*, *Allium cepa* and *Saccharomyces cerevisiae*, as preliminary analyses for the toxicogenic and antitumor evaluation of citrinin in murine models for Sarcoma 180 and for 7,12-dimethylbenzanthracene induced breast cancer with behavioral, biochemical, histopathological and immunohistochemical (Ki-67) monitoring. The acetonitrile extract and the isolates were characterized by liquid and gas chromatography. Nauplii of *A. salina* were exposed to the compounds for 24 and 48 hours, and *Al. cepa* for 72 hours. Oxidative/antioxidant evaluation was performed on pre, co- and post-treatment with H₂O₂ in *S. cerevisiae*. Citrinin at concentrations of 0.5; 1.0 and 2.0 µg/ml was incubated for 68 hours in Sarcoma 180 ascitic fluid cells and reincubated for 4h in a stove at 37 °C and 5% CO₂ after addition of cell suspension, 20 µl of [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium] (5 mg/mL). Then, 0.5 x 10⁶ cells/mL of the suspension were subjected to alkaline and micronucleus comet tests. Breast cancer in female *Mus musculus* was induced by 7,12-dimethylbenzanthracene (6 mg/kg, orally). The vehicle was olive oil (10 mL/kg) and citrinin tested at 2 µg/kg⁻¹, orally, and cyclophosphamide (25 mg/kg⁻¹, intraperitoneally) as a positive control. Breast cancer induction occurred within 11 weeks, and citrinin therapy in 3 weeks. In *A. salina*, the acetonitrile extract, citrinin and dicitrinin A displayed a toxicity with CL₅₀ (24 hours) of 2.03 µg/mL, 1.71 µg/mL and 2.29 µg/mL, as well as CL₅₀ (48 hours) of 0.51 µg/mL, 0.54 µg/mL and 0.54 µg/mL, respectively. In *A. cepa*, compounds were cytotoxic by low mitotic index and mutagenic by the increase of micronuclei and chromosomal alterations. The extract and its metabolites were antioxidants against H₂O₂ in proficient strains of *S. cerevisiae* only at low concentrations, and mutant for cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase. CI₅₀ of citrinin in S-180 cells was 3.77 µg/mL, and at concentrations 12.5 and 100 µg/mL it was as cytotoxic as doxorubicin (2 µg/mL). At 0.5, 1.0 and 2.0 µg/mL, it induced genotoxicity and mutagenicity in S-180 cells, especially at 2 µg/mL, due to oxidative damage similar to hydrogen peroxide (10 mM), by mechanisms associated with cytogenetic damage, especially apoptosis. Breast cancer was characterized by invasive mammary carcinoma by immunohistochemistry and histopathological analysis, and citrinin induced genotoxic effects in breast, marrow, lymphocyte and liver cells, and mutagenic by the formation of micronuclei, bridges, buds and binucleate cells in bone marrow bone and liver. We did not observe any changes in organ weights, except for the breasts. There were similar effects of genotoxicity for citrinin and cyclophosphamide, but repair of lymphocyte damage was observed only in therapy with citrinin, which showed antitumor action, by cytogenetic mechanisms, possibly associated with oxidative stress. The bioactive compounds obtained from the acetonitrile extract of *P. citrinum* are sources for pharmaceutical antitumor formulations.

Keywords: Citrinin. Breast cancer. Genotoxicity. Mutagenicity. Apoptosis.

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO	
Tabela 1. Exemplos de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos marinhos.	32
Tabela 2. Atividade biológica de metabólitos secundários produzidos por <i>P. citrinum</i> .	35
Tabela 3. Modelos, de carcinogênese mamária, induzidos quimicamente por DMBA em roedores.	51
CAPÍTULO 1	
Tabela 1. Atividades farmacológicas da citrinina.	95
CAPÍTULO 2	
Tabela 1. Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	119
Tabela 2. Citotoxicidade do EACNPc e isolados do <i>P. citrinum</i> : Citrinina e Dicitrinina-A, em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> após 48 horas de exposição.	125
Tabela 3. Efeitos mutagênicos do EACNPc e isolados de <i>P. citrinum</i> (CIT, DIC-A) em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , após 48 h.	126
Tabela 4. Pré-tratamento em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> com EACNPc, CIT e DIC-A.	129
Tabela 5. Efeitos antioxidantes do EACNPc e isolados do <i>P. citrinum</i> (CIT e DIC-A) em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> .	130
Tabela 6. Efeitos do EACNPc e isolados do <i>P. citrinum</i> (CIT e DIC-A) sobre danos induzidos por H ₂ O ₂ em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> .	131
CAPÍTULO 3	
Tabela 1. Avaliação da mutagenicidade sobre células de S-180 induzida por CIT.	152
Tabela 2. Índice de divisão nuclear (IDN), índice de danos nucleares indicativos de citotoxicidade (IDNC), frequência de apoptose e necrose celular em células de S-180, induzidos por CIT.	154
CAPÍTULO 4	
Tabela 1. Avaliação comportamental e atividade locomotora de camundongos fêmeas, virgens, durante 14 semanas de tratamento com azeite, DMBA e terapias químicas com CPA e CIT.	175
Tabela 2. Perfil metabólico durante terapia com CIT, em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas na 12 ^o , 13 ^o e 14 ^o semana de tratamento e veículo (azeite de oliva). Mama D (mama direita); Mama E (mama esquerda).	176
Tabela 3. Perfil hematológico após terapia com CIT, em camundongos com câncer de mama induzido pelo DMBA.	178
Tabela 4. Perfil bioquímico para enzimas renais e hepáticas após terapia com CIT, em camundongos fêmeas, com câncer de mama induzido pelo DMBA.	178
Tabela 5. Mecanismos citogenéticos indicativos de mutagenicidade da CIT (2µg/kg) em células não neoplásicas (medula óssea e células do fígado), após 11 semanas de indução do câncer de mama com DMBA (6 mg/kg) e 3 semanas de terapia com CIT.	186

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	
Figura 1. Esquema representativo da subdivisão da tese.	26
REFERENCIAL TEÓRICO	
Figura 1. Principais atividades biológicas e diversidade de metabólitos secundários de endófitos do gênero <i>Penicillium</i> .	34
Figura 2. Atividades biológicas e farmacológicas relatadas para os policetídeos.	36
Figura 3. Estrutura química da Citrinina.	37
Figura 4. Estrutura química da Dicitrinina-A.	39
Figura 5. Instalação do processo tumoral e etapas da metástase.	41
Figura 6. Processo de apoptose dependente de mitocôndria (via intrínseca).	42
Figura 7. Perfil geral do ensaio comete e teste de micronúcleos em modelo animal.	56
CAPÍTULO 1	
Figura 1. Fluxo da pesquisa nas bases de dados, inclusão e exclusão de artigos.	82
Figura 2. Biossíntese da citrinina em <i>Monascus ruber</i> .	83
Figura 3. Biossíntese da citrinina via tetraketide-acetil-CoA em <i>M. ruber</i>	84
Figura 4. Mecanismo geral cito-genotóxico mediado pela CIT, em sistemas de testes eucarióticos.	94
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Espectro de massa (EM-IES (+)) da Citrinina (A) e Dicitrinina-A (B).	121
Figura 2. Percentual de sobrevivência dos náuplios de <i>A. salina</i> em exposição ao EACNPc e isolados do <i>P. citrinum</i> : CIT e DIC-A. Tempo de 24 h (A) e 48 h (B)	123
Figura 3. Divisão celular e aberração cromossômica em células meristemáticas em <i>Allium cepa</i> .	128
CAPÍTULO 3	
Figura 1. Espectro de massa (EM-IES (+)) da Citrinina.	147
Figura 2. Ação da CIT na viabilidade celular, em células do líquido ascítico de Sarcoma 180 em camundongos, avaliada pelo ensaio MTT após 72 h.	148
Figura 3. Genotoxicidade em células do líquido ascítico de S180 de camundongos, após 72 h de exposição, por meio do Índice de Danos (ID) e Frequência de Danos (FD).	150
Figura 4. Genotoxicidade da CIT, por mecanismos associados a danos oxidativos, em células do líquido ascítico de S180 cotratada com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂). Em A índice de danos ao DNA e em B frequência de danos.	151
CAPÍTULO 4	
Figura 1. Espectro de massa (EM-IES (+)) da Citrinina.	174
Figura 2. Perfil do peso de órgãos de camundongos fêmeas, após 11 semanas de tratamento com DMBA e terapia com CIT (12 ^a , 13 ^a e 14 ^a semanas).	177
Figura 3. Perfil macroscópico das mamas dos animais, após indução do câncer com DMBA e em terapia com CIT.	179
Figura 4. Perfil imuno-histoquímico de proliferação celular (Ki-67), analisado em mama direita de camundongos, após 14 semanas de indução do câncer com DMBA e terapia com citrinina (2 µg/kg).	180
Figura 5. Perfil histopatológico da mama direita de camundongos fêmeas, após 11 semanas de tratamento com DMBA (A, B e C), e 3 semanas de terapia com citrinina (D, E e F).	181
Figura 6. Genotoxicidade da CIT em células neoplásicas (mama) e não neoplásicas (medula óssea, fígado e leucócitos de sangue periférico) de camundongos fêmeas, após 11 semanas de indução do câncer de mama com DMBA (6 mg/kg), seguidas de 3 semanas de terapia com o grupo citrinina (CIT, 2µg/kg) e com o grupo ciclofosfamida (CPA, 25 mg/kg).	183

Figura 7. Estudo de reparo de danos ao DNA, em linfócitos de sangue periférico de camundongos fêmeas, durante a indução do câncer de mama com DMBA (6 µg/kg ⁻¹) e terapia com CIT(2µg/kg ⁻¹). A: ID = índice de danos e B: FD = frequência de danos.	184
Figura 8. Apoptose em diferentes tecidos de camundongos fêmeas, após 11 semanas de indução do câncer de mama com DMBA, seguida de três semanas de terapia com o grupo citrinina (CIT) e com o grupo ciclofosfamida (CPA).	185
Figura 9. Fotomicrografias (microscopia óptica, aumento de 400 X. Coloração com Giensa a 10%) de alterações citogenéticas induzidas pela CIT (2µg/kg), em células não neoplásicas (medula óssea e células do fígado) após 11 semanas de indução do câncer de mama com DMBA (6 mg/kg) e 3 semanas de terapia com CIT. Em A (CIT), B (DMBA), ambas em medula óssea. Em C (CIT) e em D (DMBA), ambas em células do fígado. MN (micronúcleos), BT (brotos), PT (pontes), APT (apoptoses), BN (células binucleadas).	187
CONSIDERAÇÕES FINAIS	
Figura 1. Resumo do resultado geral da tese.	203

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ALT: alanina aminotransferase
- AST: aspartato aminotransferase
- CAT: Catalase
- CBMN: Micronúcleos com bloqueio de citocinese
- CCD: Cromatografia de camada delgada
- CI₅₀: Concentração inibitória média
- CIT: Citrinina
- CL₅₀: Concentração letal média
- CLAE-DAD: Cromatografia de alta eficiência
- CM: Câncer de mama
- CN: Controle negativo
- CP: Controle positivo
- CPA: Ciclofosfamida
- DIC – A: Dicitrinina A
- DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DOX: Doxorrubicina
- EACNPc: Extrato Acetonitrila do *Penicillium citrinum*
- EG: Linhagem duplo mutante de *Saccharomyces cerevisiae*, *SOD1Δ/CAT1Δ*
- EG103: Linhagem selvagem de *Saccharomyces cerevisiae*, *SODWT*
- EG110: Linhagem mutante e defectiva de *Saccharomyces cerevisiae*, *SOD2Δ*
- EG118: Linhagem mutante e defectiva de *Saccharomyces cerevisiae*, *SOD1Δ*
- EG133: Linhagem duplo mutante de *Saccharomyces cerevisiae*, *SOD1Δ/SOD2Δ*
- EG223: Linhagem mutante e defectiva de *Saccharomyces cerevisiae*, *CAT1Δ*
- EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
- FD: Frequência de danos
- GSH: Glutationa peroxidase
- HMBC: Correlação múltipla de ligação heteronuclear
- HMQC: Correlação múltipla-quântica heteronuclear
- IC 95%: Intervalo de confiança
- ID: índice de danos
- IDN: Índice de divisão nuclear

IDNC: Índice de danos nucleares indicativos de citotoxicidade
IL-1b: Interleucina 1
IL-6: Interleucina 6
iNOS: Óxido nítrico sintetase induzível
Ki-67: Marcador de proliferação celular
LDH: lactato desidrogenase
MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno
MN: Micronúcleos
MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
RMN: Ressonância magnética nuclear
S180: Sarcoma 180
SOD: Superóxido dismutase
TNF-a: Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

RESUMO	X
ABSTRACT.....	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XV
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. REFERENCIAL TEÓRICO	29
3.1 Fungos endofíticos marinhos	30
3.2 Biodiversidade de metabólitos de fungos endofíticos	31
3.2.1 Diversidade estrutural do fungo <i>Penicillium</i> como fonte de metabólitos secundários	33
3.2.2 Atividades Biológicas de metabólitos extraídos do fungo endófito <i>Penicillium citrinum</i>	34
3.3 Câncer	39
3.3.1 Câncer de mama.....	43
3.3.2 Sarcomas	45
3.4 Quimioterapia para o câncer de mama	46
3.4.1 Antraciclina - Doxorrubicina (DOX)	47
3.4.2 Agente alquilante – Ciclofosfamida (CPA).....	48
3.4.3 Agente inibidor de microtúbulos – Taxol	48
3.5 Modelos de estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.....	49
3.6 Biomarcadores citotóxicos e toxicogênicos	52
REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO 1: Uma revisão abrangente sobre as propriedades biológicas da Citrinina.....	78
Resumo.....	79
1. INTRODUÇÃO.....	80
2. MATERIAIS E MÉTODOS	81
2.1 Estratégias da pesquisa	81
2.1.1 Critérios de inclusão:	81
2.1.2 Critérios de exclusão:.....	81
3. RESULTADOS	82
3.1 Fonte, distribuição e metabolismo da CIT	82
3.2 Biossíntese e síntese laboratorial da CIT	84
3.3 Propriedades físico-químicas da CIT.....	85
3.4 Atividade antimicrobiana.....	86
3.5 Citotoxicidade e toxicologia	86
3.5.1 Mecanismo de toxicidade	88

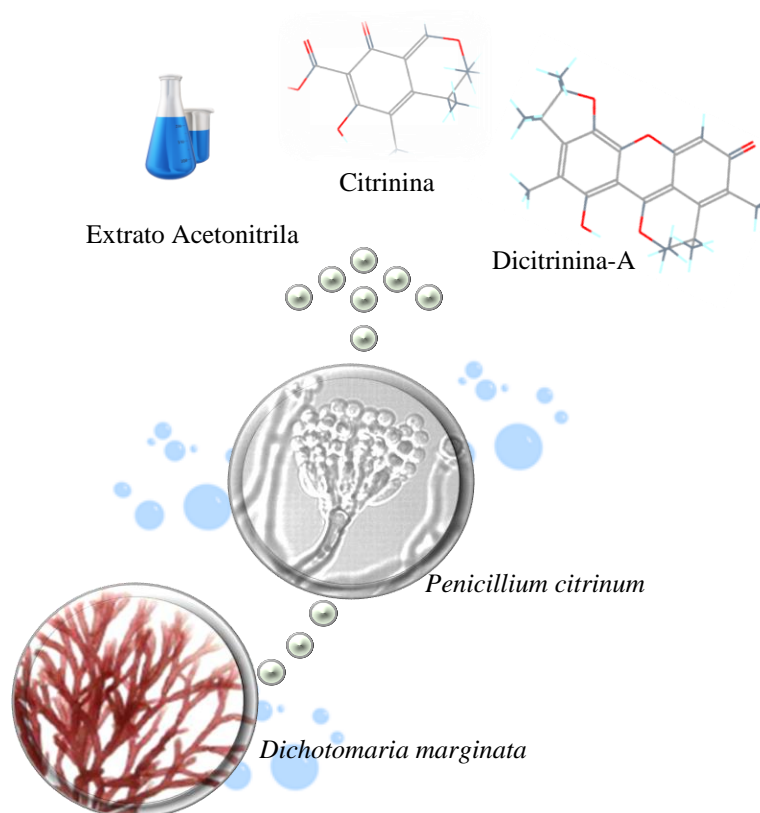
3.6 Efeitos da CIT no sistema cardíaco, reprodutor e outros órgãos.....	90
3.7 Carcinogenicidade, efeitos genotóxicos e mutagênicos.....	92
3.8 Potencial de segurança e efeitos protetores demonstrados pela CIT.....	100
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS.....	104
CAPÍTULO 2: Avaliação tóxica / citotóxica e citogenética do extrato acetoneitrila, Citrinina e Dicitrinina-A do <i>Penicillium citrinum</i>	113
Resumo.....	114
1. INTRODUÇÃO.....	115
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	116
2.1 Coleta da macroalga <i>Dichotomaria marginata</i>	116
2.2 Procedimentos experimentais.....	116
2.3 Isolamento e identificação do fungo endofítico.....	117
2.4 Obtenção do extrato acetoneitrila do <i>P. citrinum</i> (EACNPc) e isolamento dos metabólitos citrinina e dicitrinina-A.....	117
2.5 Bioensaio de letalidade do microcrustáceo marinho <i>Artemia salina</i>	118
2.6 Avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade em <i>Allium cepa</i>	118
2.7 Avaliação oxidativa / antioxidante em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
2.7 Análises estatísticas.....	120
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	120
3.1 Caracterização dos metabólitos CIT e DIC-A.....	120
3.2 Bioletalidade do extrato acetoneitrila (EACNPc) e os metabólitos CIT e DIC-A, isolados do <i>P. citrinum</i> em <i>Artemia salina</i>	121
3.2 Danos citotóxicos e mutagênicos do EACNPc, CIT e DIC-A do <i>P. citrinum</i> em meristemas de raízes de <i>Allium cepa</i>	123
3.3 Efeitos de isolados de <i>P. citrinum</i> na prevenção, atividades antioxidantes e reparo de DNA em danos induzidos por H ₂ O ₂ em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	129
4. CONCLUSÃO.....	132
REFERÊNCIAS.....	132
CAPÍTULO 3: Efeitos antitumorais da citrinina em modelo animal de Sarcoma 180 por mecanismos citogenéticos	139
Resumo.....	140
1. INTRODUÇÃO.....	141
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	142
2.1 Procedimentos experimentais gerais para isolamento da citrinina.....	142
2.2 Coleta da macroalga <i>Dichotomaria marginata</i>	143
2.3 Identificação do fungo endófito <i>Penicillium citrinum</i> e caracterização da citrinina.....	143
2.4 Cultura primária de Sarcoma 180.....	144
2.5 Viabilidade celular pelo método do MTT em cultura primária de Sarcoma 180.....	144
2.6 Estudo de mecanismo para a genotoxicidade pelo cotratamento com H ₂ O ₂	145
2.7 Teste cometa.....	145

2.8 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese - CBMN	145
2.9 Análise estatística	146
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	147
3.1 Caracterização da citrinina isolada do extrato acetoneira oriundo do <i>Penicillium citrinum</i>	147
3.2 Efeitos citotóxicos da citrinina (CIT) na cultura primária de S180 de camundongos	147
3.3 Efeitos genotóxicos da CIT em células do líquido ascítico de S180 em camundongos, através do ensaio cometa	149
3.4 Avaliação da indução de danos oxidativos como mecanismos para genotoxicidade da CIT em células de S180 em camundongos.....	150
3.5 Efeitos antitumorais da citrinina (CIT) por danos citogenéticos em células do líquido ascítico de S180 em camundongos avaliados pelo teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN).....	151
4. CONCLUSÕES	154
REFERÊNCIAS	154
CAPÍTULO 4: Efeitos antitumorais da citrinina isolada do <i>Penicillium citrinum</i> em modelo animal para câncer de mama: monitoramento toxicológico e citogenético.....	163
Resumo	164
1. INTRODUÇÃO.....	165
2. MATERIAIS E MÉTODOS	166
2.1 Reagentes químicos	166
2.2 Procedimentos experimentais gerais para isolamento da CIT	167
2.3 Coleta da macroalga <i>Dichotomaria marginata</i>	167
2.4 Isolamento e identificação do fungo endófito <i>Penicillium citrinum</i>	167
2.5 Crescimento do fungo, Extração e Isolamento da CIT	168
2.6 Animais	168
2.7 Modelo animal de câncer de mama induzido por DMBA.....	169
2.8 Monitoramento toxicológico	169
2.8.1 Análise metabólica e hipocrática	169
2.8.2 Campo aberto.....	170
2.8.3 Rota rod.....	170
2.8.4 Análise bioquímica e hematológica.....	171
2.8.5 Eutanásia e coleta dos órgãos	171
2.8.6 Avaliação histopatológica.....	171
2.8.7 Perfil imuno-histoquímico (Ki-67)	172
2.9 Avaliação de danos genotóxicos, reparo de DNA e perfil mutagênico.....	172
2.9.1 Avaliação genotóxica e reparo de DNA	172
2.9.2 Avaliação mutagênica.....	173
2.10 Análise estatística.....	173
3. RESULTADOS	173
3.1. Caracterização da citrinina (CIT) isolada do extrato acetoneira oriundo do <i>Penicillium citrinum</i>	173
3.2 Avaliação toxicológica, durante a indução do câncer de mama com DMBA e terapia com CIT, de carcinoma mamário	174

3.2.1 Monitoramento hipocrático, comportamental, metabólico e peso de órgãos	174
3.2.2 Perfil bioquímico e hematológico após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com CIT	177
3.2.3 Análise macroscópica, histopatológica e imuno-histoquímica (Ki-67) da mama de animais por indução com DMBA e terapia com CIT	179
3.3 Mecanismos citogenéticos induzidos pelo DMBA, CPA e pela CIT	182
3.3.1 Genotoxicidade e apoptose induzidas pelo DMBA, CPA e CIT, em tecidos tumorais e não tumorais de camundongos fêmeas, e capacidade de reparo de DNA em linfócitos de sangue periférico.....	182
3.3.2 Mutagenicidade da CIT em fígado e medula óssea de camundongos fêmeas com carcinoma mamário induzido pelo DMBA.....	185
4. DISCUSSÃO.....	187
5. CONCLUSÃO	192
REFERÊNCIAS	193
CONSIDERAÇÕES FINAIS	202
ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO <i>Food and Chemical Toxicology</i>.....	204
ANEXO B – ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>Mutation Research</i>	205
ANEXO C – ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>IUBMB life</i>.....	206
ANEXO D – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL UFPI... 	207
ANEXO E – ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>Journal Cellular Biochemistry</i>.....	208
ANEXO F – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL UFPI ...	209

1. INTRODUÇÃO

Ambiente marinho: Prosperidade para terapias antitumorais



OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade é uma fonte valiosa de dados biológicos importantes para descoberta de drogas; os metabólitos de fungos endófitos entram nesse cenário despertando o interesse do setor farmacêutico (BARREIRO; BOLZANI, 2009; ZIMMERMAN; VITOUSEK, 2012; XIAO et al., 2014; ZHENG et. al., 2016), como também fontes genéticas para a biotecnologia (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011; YAN et. al., 2015). Cerca de 80% dos fungos endofíticos estudados produzem metabólitos ativos, influenciados por condições ambientais, parâmetros de fermentação, tempo, temperatura, pH e nutrientes (BLUNT et. al., 2015; ZHENG et. al., 2016) e o ambiente marinho apresenta características peculiares de temperatura, salinidade, pH, baixo potencial hídrico, além de altas concentrações de sódio, o que proporciona e exige adaptações de microrganismos endofíticos e, conseqüentemente, influencia na produção de metabólitos secundários peculiares (RAGHUKUMAR, 2008).

O *Penicillium* é um gênero de fungos ascomicetos sendo um dos mais comuns que ocorrem em vários ambientes, como solo, ar e ambientes extremos (temperatura, salinidade, deficiência de água e pH) e está associado com plantas, algas e produtos alimentares específicos (YADAV et. al., 2018). O *Penicillium citrinum*, pertencente ao filo Ascomycota, é filamentososo e de crescimento rápido, encontrado preferencialmente em ambientes terrestres, no entanto têm sido encontrados em organismos eucariotos marinhos (ANDRADE, 2014). A espécie *P. citrinum* é produtora de vários metabólitos secundários, em especial Citrinina (CIT), (WAKANA et al., 2006), sendo a primeira micotoxina isolada desse fungo (IWAHASHI et al., 2007). A CIT é um metabólito pertencente ao grupo dos policetídeos e foi isolada pela primeira vez em 1931 por dois pesquisadores, Hetherington e Raistrick (THACKER; CARLTON; SANSING, 1997).

A CIT é capaz de desencadear nefropatia, hepatotoxicidade, além de formação de adenoma renal em vários modelos celulares e em animais (MÁTÉ et al., 2014), como também atividades antioxidantes (ARORA; CHANDRA, 2011), atividades citotóxicas (CHEN et al., 2011), atividades antibacterianas (LAI et al., 2013), anti-helmíntica (FAKHAR et al., 2013). Também foi relacionada como indutora de micronúcleo (MN) (CHAN; SHIAO, 2007) e apoptose alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial interferindo no sistema de transporte, além de alterar o fluxo de íons cálcio no córtex renal (CHANG et. al., 2009). No entanto, os resultados relativos a sua genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade são controversos (FLAJS; PERAICA, 2009; SHI; PAN, 2012). O seu co-metabólito Dicitrinina-A

(DIC-A), um dímero obtido a partir da fermentação de extratos contendo o fungo *P. citrinum*, geralmente quando CIT é componente majoritário, tem participado de protocolos de investigação para elucidar seus prováveis efeitos biológicos (YAO et al., 2011). Resultados mostraram atividades citotóxicas, antimicrobianas e pronunciada atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase para a DIC-A (LIU et al., 2016).

Ali et al. (2012) declararam que um passo importante para a descoberta de agentes antitumorais de maior eficiência está na premissa do estudo mais detalhado de produtos derivados de fontes naturais. É importante frisar que segundo os dados da *Global Burden of Disease Collaboration* (2017), 17,5 milhões de pessoas, em todo o mundo, foram diagnosticadas com câncer, só em 2015, sendo registrado 8,7 milhões de óbitos por causa dessa doença, no mesmo ano. Segundo o INCA (2016), estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, apontou a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer, sendo o câncer mamário um dos mais comuns. O câncer de mama é uma doença heterogênea, na qual tumores mamários, que apresentam as mesmas características histológicas, podem ter comportamentos clínicos distintos expressos pela sua biologia (BORGES et al., 2017). No Brasil, é o tipo mais comum de câncer e representa a principal causa de mortalidade entre as mulheres (INCA, 2018). Em termos mundiais, estima-se que a incidência do câncer pode aumentar em 50% em 2020, com 15 milhões de casos novos (CAVALINI et al., 2012). Só em 2016, foram esperados 57.960 casos novos de câncer de mama no Brasil, com risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2016). Nos últimos anos, a incidência de novos casos de câncer de mama em mulheres jovens, tem aumentado e acredita-se que essas taxas elevadas sejam relacionadas ao diagnóstico tardio (PAZ et al., 2018). Portanto, mesmo considerando os avanços terapêuticos para o câncer de mama, terapias alternativas são necessárias devido ao alto índice de mortalidade. Nesse contexto a espécie *Penicillium citrinum* tem sido retratada com um grande potencial para uso em várias aplicações biotecnológicas e farmacêuticas (LIU et al., 2017; YU et al., 2018) e, em especial, como agente antitumoral.

Modelos de câncer de mama, induzidos quimicamente, são utilizados para mimetizar a carcinogênese da mama humana, mesmo sabendo das limitações quanto a extrapolação de resultados para humanos. Nessa perspectiva, todos os modelos em ratos e camundongos apresentam vantagens e limitações peculiares (LIU et al., 2015; ALVARADO et al., 2017). Um carcinógeno químico muito utilizado para a indução do câncer de mama em fêmeas de ratos e camundongos é o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA). Este potente carcinógeno, indutor de danos ao DNA, é muito utilizado nas investigações, não clínicas, de compostos com prováveis

propriedades antitumorais (KARNAM et al., 2017; ALVARADO et al., 2017). Nesse aspecto, a avaliação toxicogenética de produtos naturais e/ou farmacêuticos pode ser realizada em diversos sistemas teste, incluindo os estudos de mutação de genes em bactérias e testes *in vivo* e *in vitro* para avaliação citogenética em células eucariotas (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009).

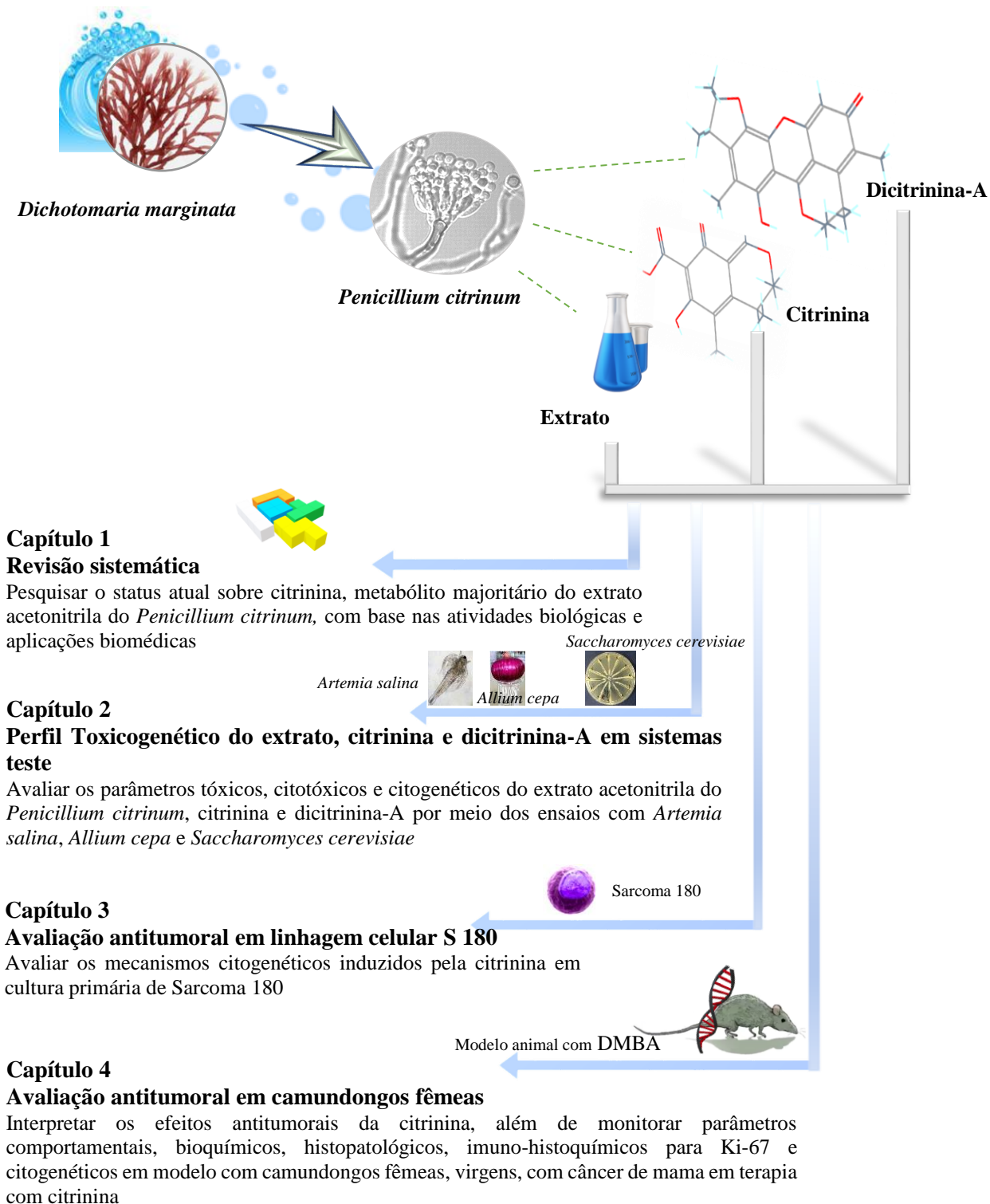
Dentre os testes citogenéticos, o teste *Allium cepa* apresenta diversos biomarcadores para a análise de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, demonstrando resultados similares aos testes com animais (ISLAM et al., 2017). Nos estudos de estresse oxidativo e demais eventos toxicogenéticos o ensaio utilizando *Saccharomyces cerevisiae* possui características que a tornam modelo de célula eucariota, no estudo dos mais diferentes compostos apresentando vários genes funcionais e semelhantes aos dos seres humanos (GANCEDO, 1998; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2004), com um sistema endógeno de ativação metabólica por um complexo enzimático (citocromo P450) e detoxificação (TOUSSAINT et al., 2006). Outros testes, a exemplo dos testes cometa e de micronúcleos são recomendados para a detecção de danos ao material genético (NIKOLOVA; MARINI; KAINA, 2017).

Considerando o grande potencial biotecnológico de produtos naturais, isolados de fungos endofíticos, associados à diversidade de testes toxicogenéticos, com aplicação de biomarcadores citotóxicos, citogenéticos, além de modelos murinos indutores de câncer de mama e de sarcoma, este estudo objetivou realizar a bioprospecção toxicogenética e antitumoral do extrato acetonitrila do fungo endofítico *Penicillium citrinum* (EACNPc), extraído da alga *Dichotomaria marginata*, bem como de dois dos seus metabólitos secundários (Citrinina e Dicitrinina-A), com aplicação de biomarcadores citogenéticos em ensaios não clínicos *in vitro* e *in vivo*, além do monitoramento comportamental, bioquímicos, hematológicos, histopatológicos, imunoistoquímico e citogenéticos em camundongos fêmeas, virgens, com carcinoma ductal de mama.

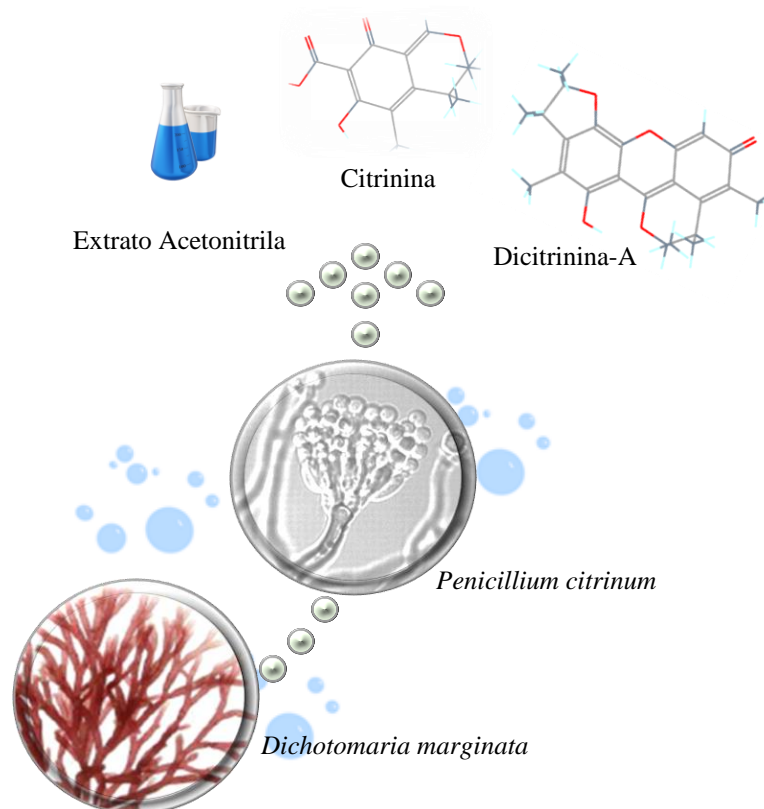
Estruturalmente, esta tese está dividida em quatro capítulos (**Figura 1**). O primeiro capítulo trata de uma revisão sistemática envolvendo discussões sobre as principais atividades biológicas e farmacológicas relacionadas ao metabólito citrinina, metabólito majoritário do EACNPc, resultando em artigo publicado no *Jornal Food and Chemical Toxicology* (A2 em Biotecnologia, com fator de impacto 3,977). O segundo capítulo aborda as avaliações tóxica, citotóxica e citogenética do EACNPc, citrinina e dicitrinina-A, obtidos do fungo *P. Citrinum*, resultando em artigo submetido ao *Jornal Mutation Research - Genetic Toxicology and*

Environmental Mutagenesis (B1 em Biotecnologia, com fator de impacto 2.404). O terceiro capítulo expõe a atividade antitumoral da citrinina por mecanismos citogenéticos induzidos em modelo de Sarcoma 180, o que gerou artigo submetido ao Jornal *IUBMB Life* (B1 em Biotecnologia, com fator de impacto 3.236). E, por fim, o quarto capítulo que trata dos efeitos antitumorais da citrinina, com monitoramentos toxicológico e citogenético em camundongos fêmeas, virgens, com câncer de mama induzidos por DMBA, culminando com o artigo submetido ao Jornal *Cellular Biochemistry* (A2 em biotecnologia, com fator de impacto 2.959).

Figura 1. Esquema representativo, em capítulos, da tese.



2. OBJETIVOS



OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

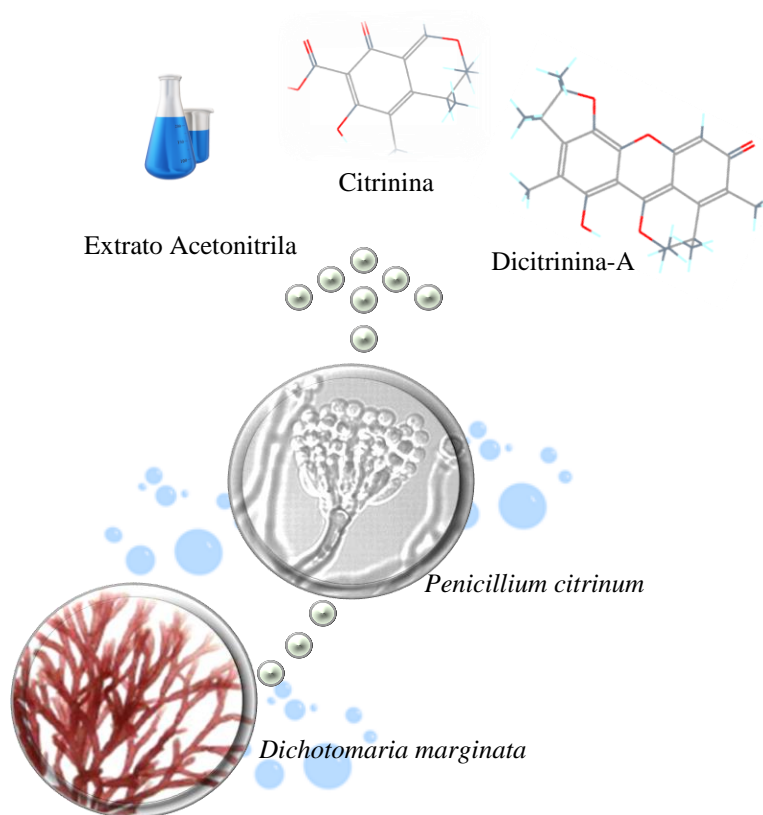
Realizar bioprospecção toxicogenética do extrato de acetonitrila do fungo endofítico *Penicillium citrinum* (EACNPc), isolado da alga *Dichotomaria marginata*, bem como dos seus metabólitos secundários (Citrinina e Dicitrinina-A), com aplicação de biomarcadores citogenéticos em ensaios não clínicos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão sistemática envolvendo as principais atividades biológicas, relacionadas ao metabólito citrinina, metabólito majoritário do Extrato Acetonitrila do fungo *Penicillium citrinum* (EACNPc), considerando estudos *in vivo* e *in vitro*, além de identificar os mecanismos de indução de apoptose e/ou necrose;
- Avaliar os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e oxidantes/antioxidantes do extrato acetonitrila (EACNPc), citrinina e Dicitrinina-A do fungo *Penicillium citrinum*, através dos ensaios com *Artemia salina*, *Allium cepa* e *Saccharomyces cerevisiae*;
- Analisar os efeitos antitumorais da citrinina em cultura primária de Sarcoma 180, por mecanismos citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade e apoptose, com aplicação do ensaio cometa e teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN);
- Avaliar os efeitos antitumorais da citrinina em carcinoma mamário, induzido pelo 7,12-dimetiltraceno em fêmeas virgens, com monitoramento toxicogenético por meio do ensaio cometa e de micronúcleos, além da investigação dos níveis de reparo, apoptose e monitoramento dos parâmetros comportamentais, bioquímicos, histopatológicos e imuno-histoquímico, durante a indução do câncer de mama e terapia com citrinina em camundongos fêmeas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

Ambiente marinho: Fonte inesgotável de produtos naturais.



OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Fungos endofíticos marinhos

Os oceanos cobrem quase 70% da superfície terrestre e possuem uma enorme diversidade ecológica, química e biológica (JIMENO et al., 2004; KIJOA; SWANGWONG, 2004; ROMANO et al., 2017). Os microrganismos marinhos têm sido uma fonte de substâncias com enorme potencial a candidatos de drogas, gerando metabólitos secundários onde muitos destes compostos tornaram-se, comprovadamente, importantes agentes antibacterianos, antifúngicos, anti-helmínticos, antiprotozoários, antitumorais e antialérgicos, onde fungos são relatados como produtores de tais compostos devido a seus mecanismos de defesa e metabólitos derivados (BHATNAGAR; KIM, 2012).

Romano et al. (2017) ressalta que as duras condições químicas e físicas do mar também favoreceram a produção de uma grande variedade de novas moléculas em organismos marinhos que são únicos em termos de diversidade e características estruturais e funcionais em relação a compostos isolados de plantas terrestres. Reen et al. (2015) acrescentam que essa diversidade apresenta um reservatório de novas substâncias bioativas com um ótimo potencial farmacêutico.

O interesse científico pela pesquisa de metabólitos oriundos do ambiente marinho foi manifestado pela primeira vez em 1960, na cidade de Nova Iorque, a partir da Conferência Internacional sobre Bioquímica e Farmacologia de Substâncias de Origem Marinha. Nesse encontro científico, químicos, biólogos e farmacólogos, concentraram esforços no sentido de se estabelecer um estudo mais racional sobre as substâncias (metabólitos secundários) presentes em organismos de origem marinha. Com os avanços das técnicas de isolamento e elucidação estrutural, tornou-se possível a identificação de inúmeras moléculas, algumas delas dotadas de importantes atividades químicas e biológicas (IOANNOU et al., 2010; ANDRADE, 2014).

Desta forma, organismos marinhos são fontes potencialmente férteis na produção de metabólitos secundários com alta atividade biológica apresentando pistas úteis para a obtenção de novos agentes farmacológicos (GAMAL, 2010). Em particular, os fungos têm preferida escolha para tal propósito, pois sua natureza filamentosa permite invadir certos organismos para exploração, além de seu potencial poder secretor de enzimas extracelulares extremamente eficientes (KAR et al., 2014).

3.2 Biodiversidade de metabólitos de fungos endofíticos

Os nichos ecológicos encontrados no ambiente marinho também são capazes de induzir os microrganismos endófitos a sintetizar novos metabólitos que funcionam como fonte de investigação às possíveis aplicações para a formulação de medicamentos inovadores (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012; HULIKERE M; JOSHI, 2017). No entanto, alguns pesquisadores afirmam que organismos endófitos herdam a capacidade de sintetizar metabólitos secundários do organismo que está hospedando, porém, o endófito é capaz de fabricar seus metabólitos e estes, muitas vezes, acabam sendo utilizados pelo organismo que hospeda (STROBEL; DAISY, 2003; HULIKERE M et al., 2017). A exploração de microrganismos para aplicação e/ou uso comercial constitui um fértil e promissor campo de pesquisa, pois apresentam fácil cultivo (SANNA et al., 2014; KAR et al., 2014). Fungos endofíticos marinhos são organismos básicos e preferidos para a obtenção de metabólitos secundários, apresentam a capacidade de fornecer flavonoides, alcaloides, peptídeos, polifenóis e policetídeos (HULIKERE M; JOSHI, 2017).

Em geral, as espécies relatadas como endófitas de diferentes organismos são pertencentes aos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota, sendo o filo Ascomycota representante de importantes gêneros comumente mais isolados, como *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp (ZHENG et al., 2016). Em consequência da transferência de genes, fungos endófitos e hospedeiro apresentam caminhos parecidos para a biossíntese de metabólitos secundários (SOLIMAN et al., 2013), além das adaptações especiais desses organismos às condições impostas pelo meio como salinidade, pH e temperatura (RAGHUKUMAR, 2008), influenciando, assim, na diversidade de metabólitos. Considerando a biodiversidade de espécies endofíticas, há uma diversidade de substâncias bioativas que são potencialmente úteis para indústria farmacêutica, das quais incluímos criptomina, gentiopicrina, alcaloides espiroquinazolina, taxol, vimblastina, vincristina, dentre muitos outros (BARROS; RODRIGUES-FILHO, 2005; RAGHUKUMAR, 2008; YIN et al., 2009; KUMAR et al., 2013; SOLIMAN et al., 2013; ZHENG et al., 2016).

Vários estudos relataram a obtenção de metabólitos secundários oriundos de fungos endófitos de organismos marinhos (algas, plantas e animais) com interesse farmacológico (**Tabela 1**).

Tabela 1. Exemplos de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos marinhos.

Organismos marinhos	Fungo isolado	Metabólito secundário	Atividade Biológica	Referências
Alga vermelha	<i>Actinotrichia fragilis</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	Alcaloide	Antitumoral Tsuda et al. (2004)
	<i>Polysiphonia violacea</i>	<i>Apiospora montagnei</i>	Diterpeno	Antitumoral (linhagem HepG2) Klemke et al. (2004)
	<i>Lomentaria catenata</i>	<i>Microsporium</i> sp	Physcion	Indutor de apoptose e ERO (linhagem HeLa) Deshmukh; Prakash; Ranjan (2017)
			Neoechinulin A	Indutor de apoptose (linhagem HeLa) Deshmukh; Prakash; Ranjan (2017)
Verde	<i>Codium fragile</i>	<i>Fusarium</i> sp	Tetrapeptídeo cíclico	Antitumoral Ebel (2010)
Marrom	<i>Laminaria sachalinensis</i>	<i>Aspergillus carneus</i>	Alcaloides	Antibacteriana Citotoxicidade (Linhagem celular T-47D) Zhuravleva et al. (2012)
Angiosperma monocotiledônea	<i>Halodule wrightii</i>	<i>Scytalidium</i> sp	Hexapeptídeo	Inibidor do vírus Herpes simples Rowley et al. (2003)
Peixe (tubo digestório)	<i>Scalus ovrifrons</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	Alcaloide	Antibacteriana Sasaki et al. (2005)

Citando outro exemplo, um novo policetídeo isolado do fungo endófito *Fusarium* sp, associado a alga marinha *Sargassum wightii*, mostrou atividade citotóxica contra cepa de *Plasmodium falciparum* (KAUSHIK et al., 2014). Além disso, vários estudos têm revelado a descoberta de novos metabólitos secundários de fungos endófitos e sua principal bioatividade (ZIMMERMAN; VITOUSEK, 2012; ASAI et al., 2013; XIAO et al., 2014). Entre os anos de 2000 a 2005, aproximadamente 100 novos metabólitos de fungos endófitos marinhos foram descritos, no entanto, entre os anos de 2006 e 2010, um total de 690 metabólitos secundários foram descritos como produtos isolados de fungos endófitos marinhos (BLUNT et al., 2015; HASAN et al., 2015).

3.2.1 Diversidade estrutural do fungo *Penicillium* como fonte de metabólitos secundários

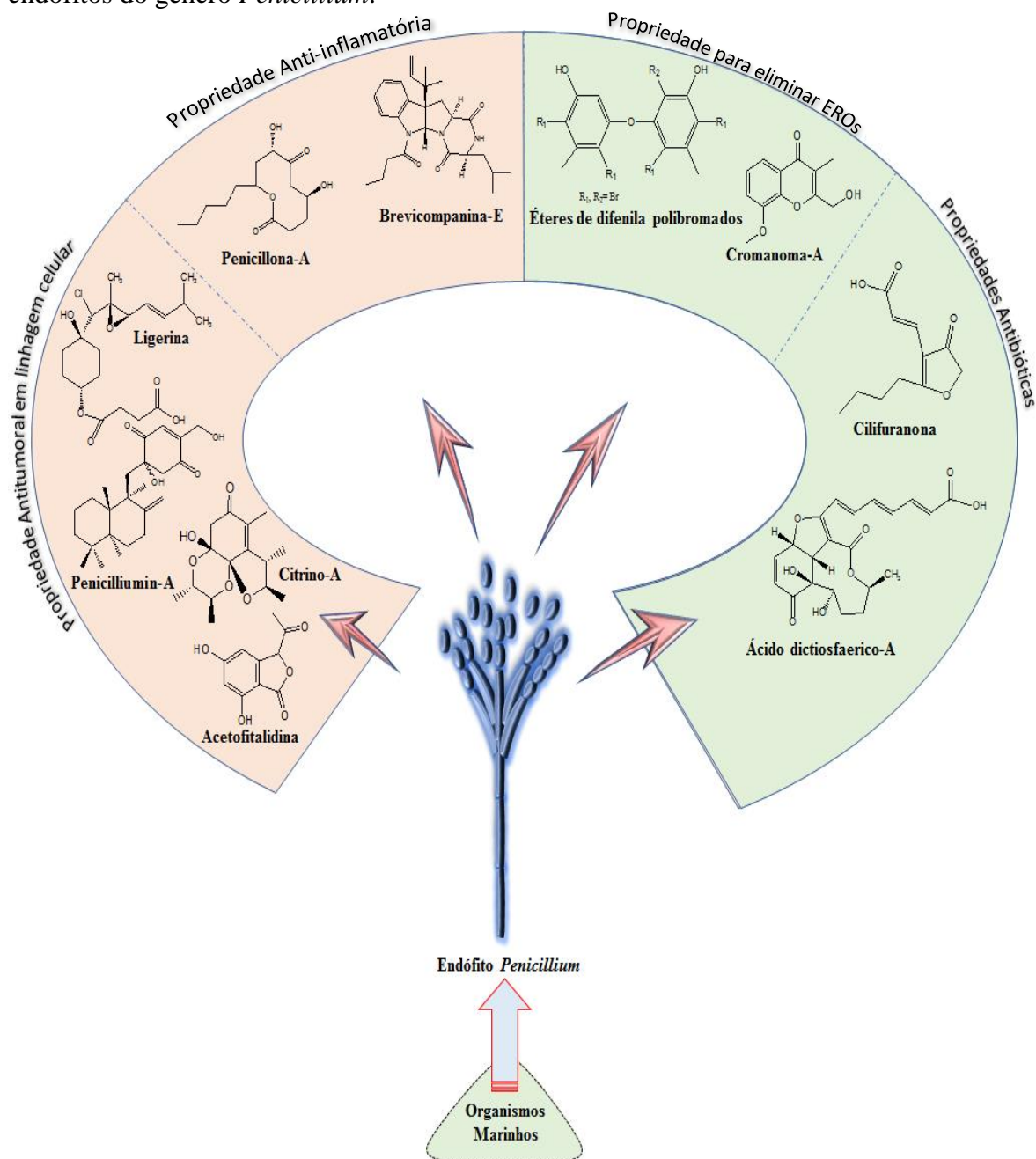
O estilo de vida dos fungos endófitos influencia fundamentalmente na diversidade dos processos metabólitos, e fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* fazem parte de um dos grupos mais importantes e extensivamente estudados, devido à variedade metabólica e adaptabilidade (RABHA; JHA, 2018). O gênero *Penicillium* se tornou popular por conter exemplares que foram responsáveis por contaminar o famoso experimento de Alexander Fleming, permitindo a descoberta do antibiótico penicilina (FLEMING, 1929). Uma das principais funções na natureza, dos organismos pertencentes a esse gênero, está relacionada à decomposição da matéria orgânica. Além disso, apresentam alto desempenho na produção de uma vasta e diversificada quantidade de metabólitos secundários (FRISVAD; SAMSON, 2004).

O *Penicillium* é um gênero de fungos ascomicetos e tem um papel importante em vários processos naturais. A presença ampla e onipresente da espécie *Penicillium* foi pesquisada em diversos estudos. De acordo com uma análise abrangente da literatura, *Penicillium* é um dos fungos mais comuns que ocorrem em vários ambientes, além de estar associado com plantas e produtos alimentares específicos.

Atualmente o gênero apresenta mais de 350 espécies e, em recente artigo de revisão, o *Penicillium* é relatado como o segundo gênero mais comum de fungos marinhos (JONES et al., 2015). *Penicillium* ssp. pertencem ao filo Ascomycota e se reproduzem fabricando esporos em esporângios especiais denominados de ascos. Estão presentes no solo, ar, água, alimentos, além de apresentarem o poder de crescimento em ambientes que ostentam condições bastante variáveis quanto à temperatura, salinidade, deficiência de água e pH (YADAV et al., 2018), bem como hospedar organismos mais complexos desenvolvendo uma inteira relação simbiótica, caracterizando os organismos denominados de endófitos.

As espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* são detentoras de várias rotas metabólicas, gerenciadas por genes específicos, que permitem aproveitar os nutrientes disponíveis, permitindo a biossíntese de potentes biomoléculas, como as micotoxinas, sendo muitas utilizadas como antibióticos e antifúngicos, além de outros metabólitos secundários aplicados como imunossupressores e antitumorais (VISAGIE et al., 2014). Enfim, devido à sua enorme diversidade e existência em ambientes extremos, desempenham um importante potencial no campo da medicina e biotecnologia (**Figura 1**).

Figura 1. Principais atividades biológicas e diversidade de metabólitos secundários de endófitos do gênero *Penicillium*.



Fonte: OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

3.2.2 Atividades Biológicas de metabólitos extraídos do fungo endófito *Penicillium citrinum*

A espécie *P. citrinum* corresponde a um fungo filamentososo de extensa expansão territorial, e bem conhecido pelo potencial de produção de metabólitos secundários (BENNETT; KLICH, 2013). Estudos demonstram que a espécie *P. citrinum* produz uma

excêntrica diversidade de metabólitos secundários (**Tabela 2**), além de ser amplamente estudada desde a descoberta do metabólito natural Citrinina (EL-NEKETI et al., 2013; HU et al., 2017). Com o avançar das tecnologias desenvolvidas na Biologia Molecular, uma série de dados genéticos, de organismos endofíticos, revelou potencial genético para a produção e obtenção de diversos metabólitos secundários (LU et al., 2008; HU et al., 2017), em especial *P. citrinum* (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2011).

Tabela 2. Atividade biológica de metabólitos secundários produzidos por *P. citrinum*.

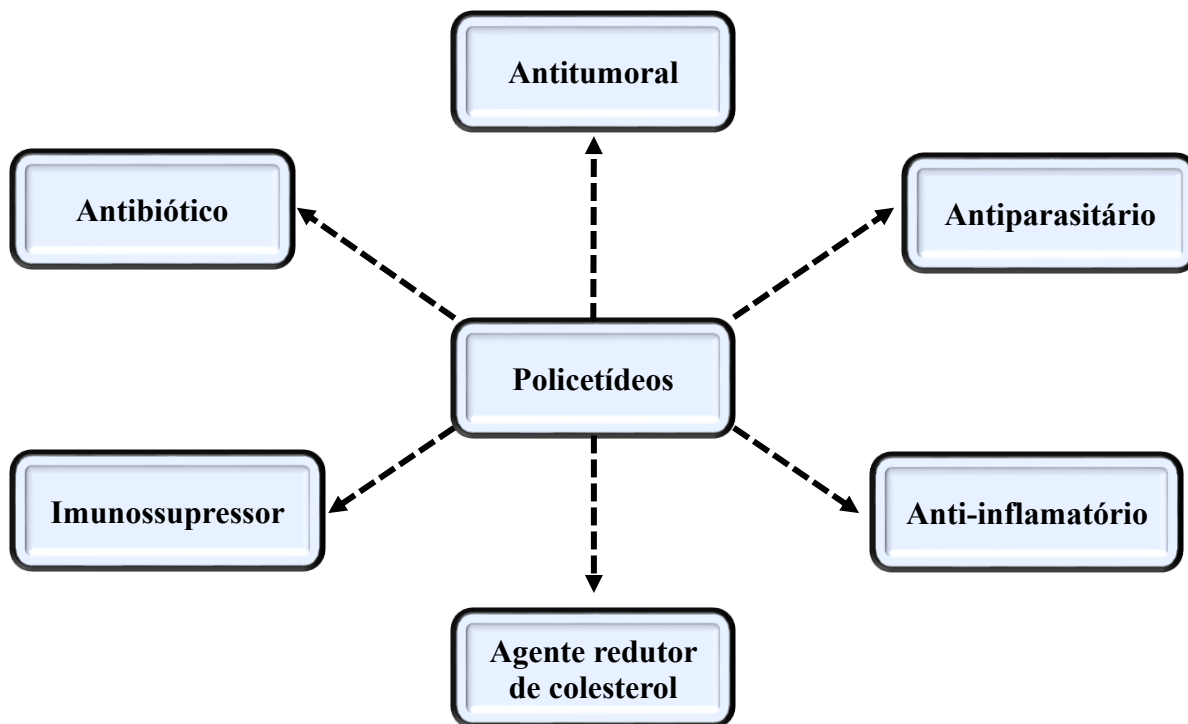
Metabólito secundário	Bioatividade	Referências
Catestatina A-B	Inibidor de protease e regulador da hipertensão	Woo; Ono; Tsuji (2014)
Estatina A	Inibidor da hipercolesterolemia	Albacha et al. (2015)
Citrinina	Indutor de apoptose e ERO	Föllmann; Behm; Degen (2014)
Isocyclocitrinol A 22-Acetilisoclocitrinol A	Atividade antibacteriana	Amagata et al. (2003)
Citrinadina A	Citotoxicidade em linhagem celular murina L1210 e linhagem humana KB	Tsuda et al. (2004)
Perinadine A	Atividade antibacteriana	Lai et al. (2013)
JBIR – 124	Atividade antioxidante	Kawahara; Takagi; Shin-ya (2012)
Citrinalina A-B	Atividade antimicrobiana	Pimenta et al. (2012)
Penicitrinona E	Citotoxicidade em linhagem celular HepG2	Hu et al. (2017)
Dihydrosporogen AO-1	Atividade antitumoral em linhagem celular de carcinoma de Ehrlich	Yurchenko et al. (2013)
Dicitrinona B	Indutor de apoptose	Chen et al. (2014)

3.2.2.1) Policetídeos

Os policetídeos de origem fúngica constituem uma das principais classes de metabólitos secundários, além de expressiva diversidade estrutural entre os produtos naturais obtidos de

organismos endófitos (PASTRE et al., 2007; HERTWECK, 2009). Muitos policetídeos são toxinas potencialmente prejudiciais à alimentação ou a outros organismos, no entanto, com o avançar dos estudos, tornaram-se iminentemente importantes nas pesquisas terapêuticas (HERTWECK, 2009). Conseqüentemente, a procura por policetídeos isolados de fungos endofíticos tem sido apontada como excelente estratégia para novos estudos de substâncias bioativas (PASTRE et al., 2007). Os policetídeos fúngicos apresentam diversas atividades biológicas (**Figura 2**) e são biologicamente sintetizados por um grupo de enzimas (policetídeo sintases – PS ou PKS, *Polyketide Synthase*) (LIU et al., 2017).

Figura 2. Atividades biológicas e farmacológicas relacionadas para os policetídeos.



Fonte: OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

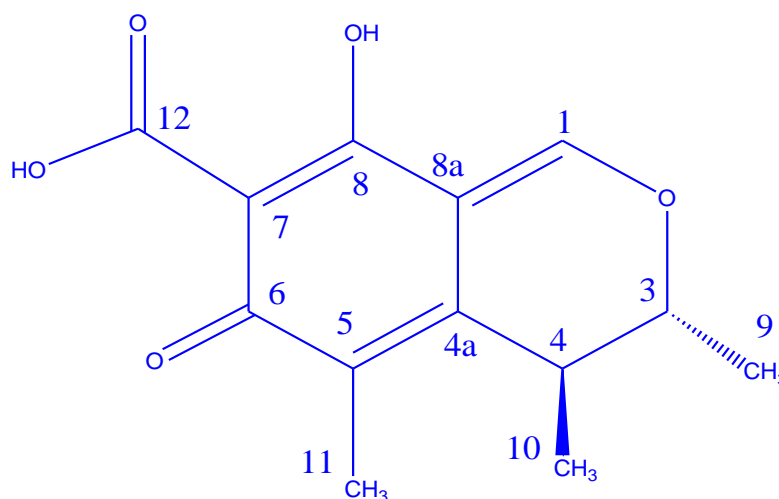
3.2.2.2) Citrinina

A CIT é um policetídeo extraído do fungo *P. citrinum*, pela primeira vez, em 1931, na forma de um pó amarelo claro (HETHERINGTON; RAISTRICK, 1931). Este metabólito é uma micotoxina (**Figura 3**) conhecida de uma série de produtos (arroz, milho, trigo, centeio, cevada e tomate em decomposição) e tem demonstrado, em altas concentrações, desenvolver propriedades nefrotóxicas (CLARCK et al., 2006). Vários estudos bioquímicos relatam, outros efeitos tóxicos da CIT. Em fígado de ratos, Endo e Kuroda (1976) demonstraram que CIT

induziu efeito inibitório sobre a biossíntese de colesterol e triglicerídeos. A inibição da enzima glutamato desidrogenase hepática bovina, *in vitro*, também foi relatada, demonstrando que CIT induziu efeitos hepáticos e metabólicos, a partir da redução do glicogênio hepático e aumento da glicose sérica (RAMADOSS; MUKHERJEE, 1977; GUPTA; BANDYOPADHYAY; SAHMAD, 1979).

A CIT é uma toxina sólida amarelo-limão em pH 4,6. Muda de cor para vermelho claro quando em pH 9,9. É praticamente insolúvel em água fria, pouco solúvel em água quente, mas solúvel em hidróxido de sódio aquoso, metanol, carbonato de cálcio, acetonitrila, etanol e em solventes polares (XU et al., 2006; NEJATI et al., 2014).

Figura 3. Estrutura química da Citrinina.



Fonte: ANDRADE, T. J. A. S., 2014.

Entretanto ainda não está muito claro se CIT é mutagênica ou carcinogênica, devido a vários resultados insuficientes e contraditórios das pesquisas (BERNDT; HAYES, 1982; ARAI; HIBINO, 1983; BOHM et al., 2012). Além disso, um estudo de toxicidade que administrou dose de CIT (20 µg/kg/dia de ração) em ratos por 90 dias, não mostrou efeitos adversos (BOHM et al., 2012).

Especificamente, a CIT tem demonstrado exibir propriedades antimicrobianas e citotóxicas, em diversas concentrações (MAZUMDER et al., 2002). Em células primárias de rim bovino fetal (PPBK) e células de rim bovino (MDBK), CIT demonstrou efeito citotóxico (alongamento, achatamento, inchaço e arredondamentos das células) (YONEYAMA; SHARMA; KLEINSCHUSTER, 1986). CIT também induziu alterações, inchaço e morte celular em mitocôndrias de células do rim de feto de hamster (BHK-21) (CHAGAS et al., 1994).

Em osteoblastos humanos ela induziu apoptose, através do aumento de EROs e ativação de caminhos dependentes de proteína quinase 2, ativados pela proteína p21 e caspase (HUANG et al., 2009). Em linhagem celular HepG2, CIT também induziu EROs, ativação de caspase-9 e -3 (CHEN; CHAN, 2009). Além disso, a indução de MN mediada por CIT e vários outros danos provocados ao DNA foram observadas em células HepG2 (KNASMÜLLER et al., 2009). CIT é capaz de provocar efeitos clastogênicos em sistemas testes *in vivo* e *in vitro* (LIU et al., 2003; LIU et al., 2017). Um bom candidato a agente antitumoral deve desempenhar a capacidade de induzir feitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em células neoplásicas gerando efeitos bloqueadores do processo neoplásico.

Além do mais, CIT é conhecida como contaminante de uma série de produtos de origem agrícola e geradoras de vários efeitos tóxicos a nível celular (BETINA, 1989). No entanto alguns estudos foram realizados retratando a desintoxicação da CIT através da sua degradação, e concluíram que a decomposição da CIT ocorre a temperaturas acima de 175 °C (em condições secas) e em temperaturas mais baixas (>100 °C), na presença de água (KITABATAKE; TRIVEDI; DOI, 1991; TRIVEDI; DOI; KITABATAKE, 1993). Na maioria dos casos a degradação da CIT coincidiu com uma diminuição de sua citotoxicidade, porém um estudo observou que a decomposição da CIT (em condições aquosas) levou ao aumento de sua citotoxicidade, tendo sido atribuído à formação de um outro derivado, Citrinina H1 (TRIVEDI et al., 1993).

3.2.2.3) Dicitrinina-A

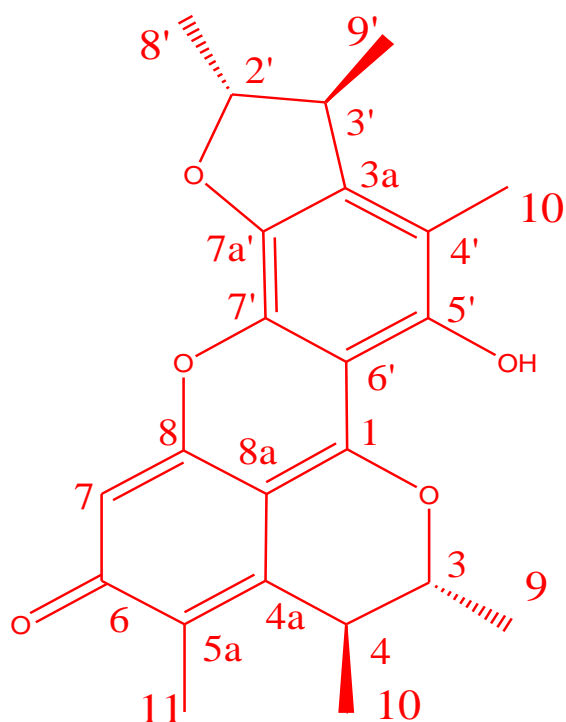
A Dicitrinina-A (DIC – A) é um policetídeo, coproduto da citrinina (citrinina dimérica) (**Figura 4**) e quando isolada pela primeira vez, DIC-A apresentou-se como um sólido vermelho escuro (CLARK et al., 2006). Atualmente poucos trabalhos esclarecem as atividades biológicas relacionadas à DIC-A. Wakana e colaboradores (2006) também classificou DIC-A como penicitrinona A. DIC-A induziu atividade inibitória em relação à proteína tironina fosfatase 2 (Shp2), com CI_{50} de $58,4 \pm 4,0 \mu\text{M}$ (NONG et al., 2013). Shp2 é uma proteína associada ao câncer de mama e outros tipos de neoplasias, como leucemia, câncer de pulmão, fígado e estômago. Além disso a proteína Shp2 está envolvida em vários processos relacionados ao câncer, incluindo metástase, apoptose, danos ao DNA, proliferação celular, ciclo celular e resistência a drogas (ZHANG; ZHANG; NIU, 2015).

Em um ensaio de atividade antifúngica DIC – A demonstrou fraca ação antifúngica em colônias de *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, e nenhuma atividade

antifúngica em colônias de *Candida albicans* e *A. niger* (WAKANA et al., 2006). Porém, DIC-A foi capaz de induzir moderada citotoxicidade em linhagem celular de câncer do colo de útero (HeLa) e atividade antioxidante contra radicais DPPH (CI₅₀ 10,6) (LU et al., 2008).

Embora a CIT tenha sido descoberta há várias décadas, seus dímeros e derivados são mais recentemente, relatados e capazes de exibir diferentes níveis de propriedades toxicológicas (WANG et al., 2013; HU et al., 2017). Vários derivados da CIT produziram expressivas atividades citotóxicas contra células de câncer de pulmão humano (A549) e linhagem celular de fígado humano (HepG2) (HU et al., 2017).

Figura 4. Estrutura química da Dicitrinina-A.



Fonte: ANDRADE, T. J. A. S., 2014.

3.3 Câncer

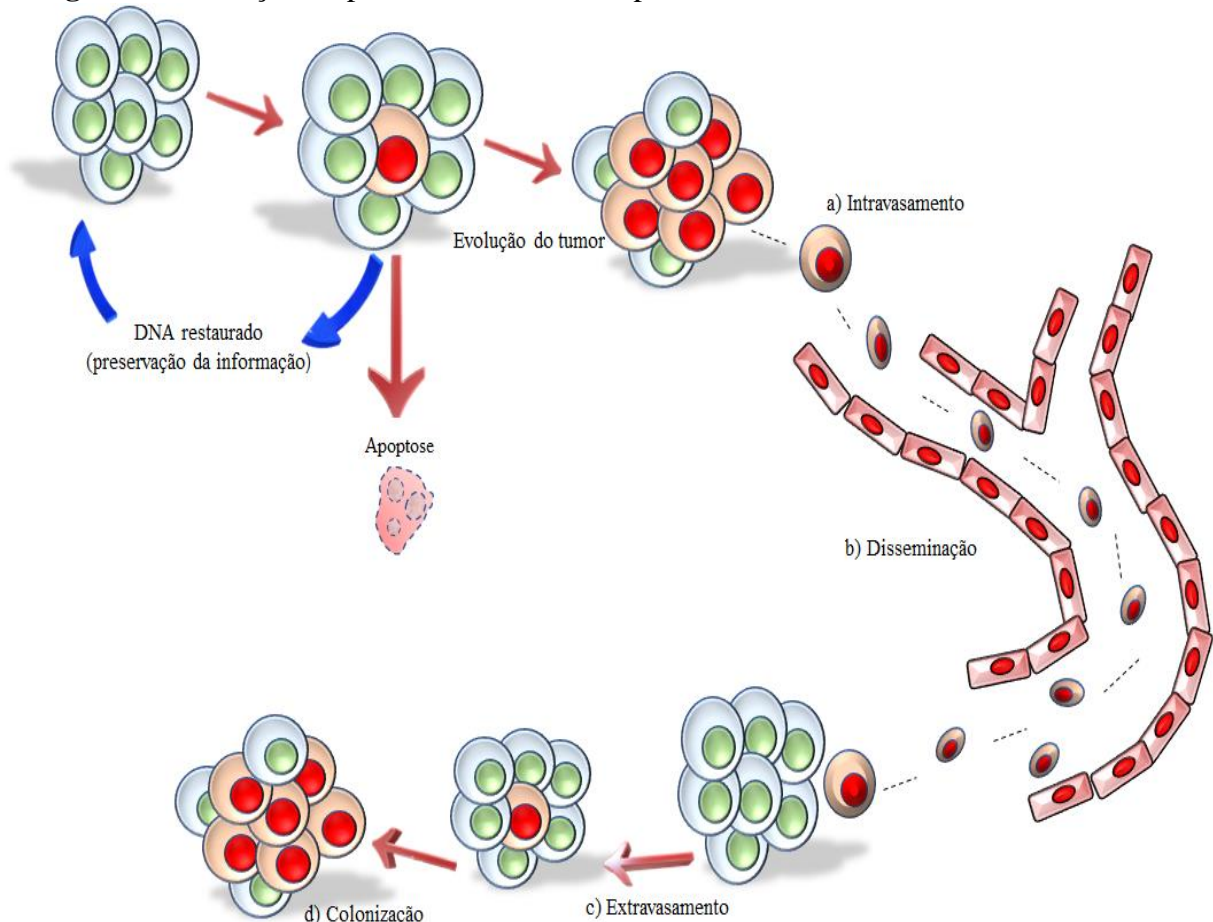
O câncer é uma doença multifatorial, o que requer uma ampla e detalhada abordagem para enfrentar a sua complexa biologia (SALEHI et al., 2018). Além disso, essa doença é vista como um complexo processo resultante do acúmulo de mutações na progênie de uma célula normal, levando ao crescimento seletivo das células mutadas e à proliferação descontrolada (BLACKADAR, 2016). Por outro lado, o câncer se tornou uma doença que mais causa medo

na sociedade, e aos poucos construiu um perfil de dor e mortalidade. A palavra câncer tem origem latina (*cancer*) e significa “caranguejo”, relacionando às patas do crustáceo que fincam na lama do manguezal dificultando sua captura ou remoção ao modo infiltrante e proliferativo das células em crescimento desordenado em variados tecidos ou órgãos (ALMEIDA et al., 2005).

O fenótipo neoplásico é caracterizado pelo acúmulo de mutações e alterações epigenéticas que contribuem para alterar modelos transcricionais e funções proteicas (COLOMBO; RAHAL, 2010). Essas alterações contribuem para a obtenção do tumor maligno. Investigações oncológicas caracterizam os eventos celulares e moleculares responsáveis pela indução da transformação maligna por meio das modificações em genes responsáveis por monitorar a integridade do genoma (SU et al., 2015). Esses eventos incluem a proliferação descontrolada, inibição da apoptose (morte celular programada), perda da supressão tumoral, além do potencial invasivo e metastático (SU et al., 2015; BAIG et al., 2016).

A metástase é um passo fundamental na progressão do câncer, indicando um estágio mais avançado e um pior prognóstico. Vários processos celulares, como a degradação da matriz extracelular, transição epitélio-mesenquimal, angiogênese tumoral, disfunção da maquinaria programada de morte celular, além do desenvolvimento de um microambiente inflamatório tumoral, têm demonstrado ser essenciais para a metástase do câncer (ACLOQUE et al., 2009; TALMADGE; FIDLER, 2010). Diante desse complexo contexto, a metástase do câncer pode ser dividida em cinco etapas cruciais: 1) Invasão: caracterizada pelo aumento da motilidade celular motivada por alterações na interação célula-célula ou célula-matriz extracelular, devido ao rompimento da membrana basal; 2) Intravasamento: nessa fase, células tumorais escapam do sítio primário migrando para o sistema circulatório, através das paredes dos vasos sanguíneos e linfáticos; 3) Disseminação: células malignas se deslocam para atingir um leito capilar, observando-se a ocorrência de uma aderência celular; 4) Extravasamento: células cancerosas adentram seus órgãos de destino; 5) Colonização: etapa final, na qual as células metastáticas proliferam formando micrometástases ou macrometástases (HORAK et al., 2007; CHAFFER; WEINBERG, 2011) (**Figura 5**).

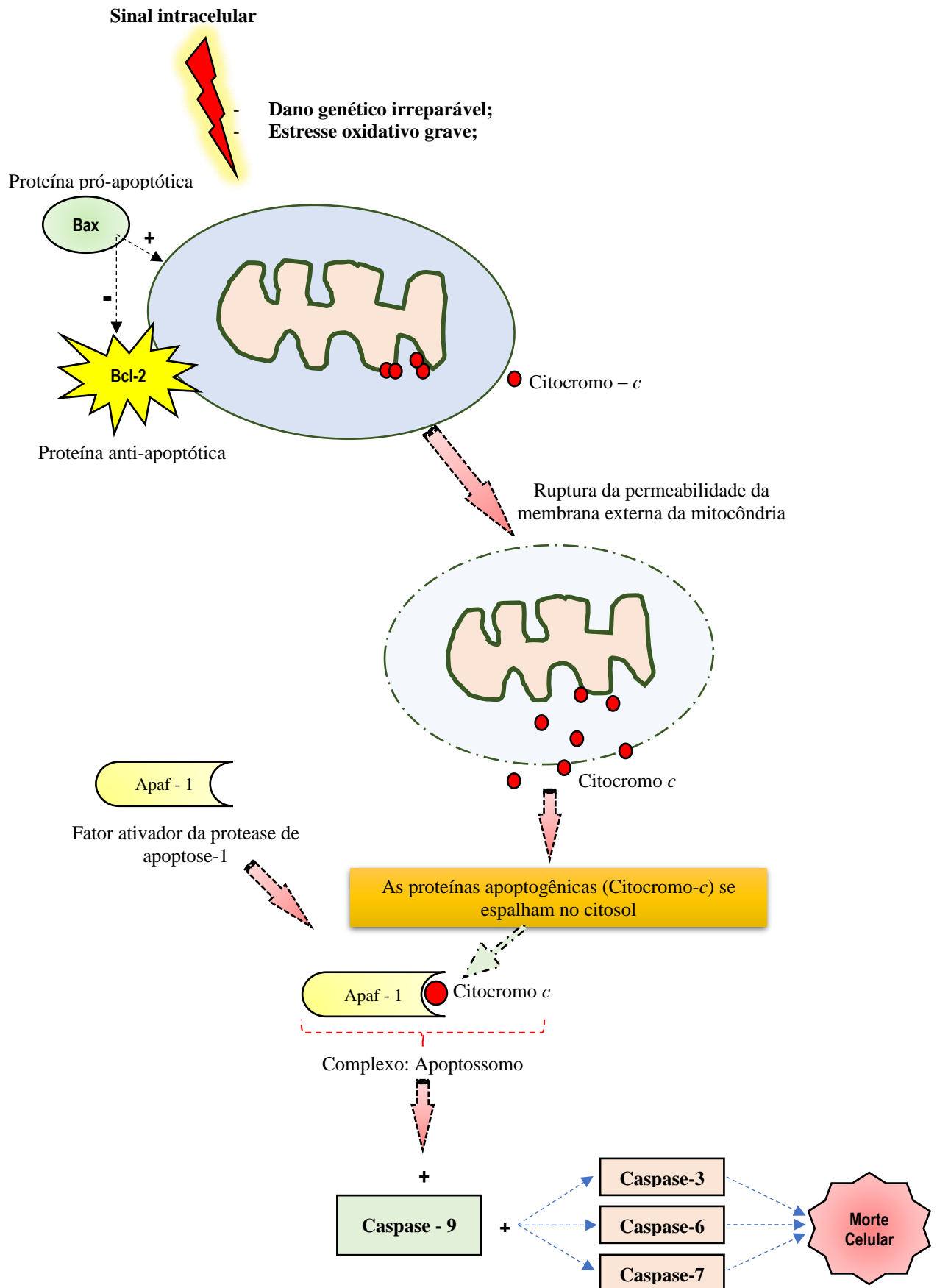
Figura 5. Instalação do processo tumoral e etapas da metástase



Fonte: OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

Um dos mecanismos de controle da proliferação celular é a morte programada, apoptose. Esse importante mecanismo resulta na remoção ordenada e eficiente de células danificadas pelos danos provocados ao DNA (PISTRITTO et al., 2016). No entanto, falhas nos mecanismos apoptóticos correspondem a uma das principais contribuições para o desenvolvimento de tumores (WONG, 2011; SLATTERY et al., 2018). Os mecanismos apoptóticos são complexos e envolvem vários caminhos de sinalização. Esse evento de morte celular programada pode ser desencadeado por meio de vias intrínsecas (**Figura 6**), ou extrínsecas, mediada por proteases denominadas caspases (ELMORE, 2007). Essas vias convergem para ativar as caspases apoptóticas, resultando em alterações celulares morfológicas e bioquímicas, como desmonte do envelope nuclear, colapso do citoesqueleto e fragmentação do DNA, efetivando a morte celular (WONG, 2011; GALLUZI et al., 2016). A indução de apoptose como respostas de danos ao DNA, em lesões pré-cancerosas, pode remover células potencialmente nocivas, bloqueando assim a proliferação do tumor (PLATI; BUCUR; KHOSRAVI-FAR, 2008).

Figura 6. Processo de apoptose dependente de mitocôndria (via intrínseca).



Fonte: OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

3.3.1 Câncer de mama

O câncer de mama (CM) é uma doença de etiologia desconhecida. No entanto, os principais fatores de risco são alterações genéticas (COSTA-SILVA et al., 2017). É causado pelo desenvolvimento de células malignas na mama, que se originam das glândulas mamárias ou ductos de mama (epitélio ductal). As causas do CM apresentam fatores variáveis e ainda não se dispõe medidas específicas para uma prevenção primária aplicável à população em geral (GOZZO, 2008). Dentre os variados fatores de riscos, temos os externos, que incluem mulheres de melhor nível socioeconômico e elevada escolaridade associada, em geral, à idade da primeira gestação mais tardia, além de prole reduzida, tabagismo, alcoolismo, obesidade, sedentarismo e nuliparidade; e internos, tais como, menarca precoce e menopausa tardia, reposição hormonal, idade e mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (AMENDOLA; VIEIRA, 2005; GOZZO, 2008; ALI et al., 2017).

O histórico familiar do CM permite categorizar que 5 a 10% de todos os casos relacionam-se a heranças genéticas provocadas por mutações. Segundo Amendola; Vieira (2005), uma breve análise da história familiar pode revelar a existência da doença com:

- a) Parentes afetados em três gerações sucessivas;
- b) Dois ou mais parentes de primeiro grau com diagnóstico da doença no período da pré-menopausa;
- c) Casos de câncer de mama bilateral;
- d) Casos de câncer de mama em homens.

A ocorrência, de pelo menos, um desses fatores em uma mesma esfera familiar propõe a existência de um fator genético e hereditário predispondo à doença. A herdabilidade responsável por promover suscetibilidade ao câncer de mama relaciona-se diretamente ao número de mutações promovendo a heterozigose em genes como *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *TP53* ou *PTEN* ou outros genes supressores de tumor com alta suscetibilidade à penetrância (GONZALEZ-ANGULO et al., 2011). No entanto, metade das síndromes de predisposição ao CM associam-se a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, sendo que mulheres com mutações deletérias nestes genes, têm um risco, significativamente, maior de desenvolver CM (MEHRGOU; AKOUCHEKIAN, 2016). Ao longo da vida, o risco varia de 65 a 81% para portadores de mutação em *BRCA1*; e 45 a 85%, para portadores de *BRCA2* (KAMIŃSKA et al., 2015).

Com aproximadamente 1,7 milhões de novos casos diagnosticados em 2012, o CM 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 segunda principal causa de mortalidade relacionada ao câncer em mulheres (MAJIDINIA; YOUSEFI, 2017a). Além disso, é uma doença que apresenta biologia, histopatologia e resposta ao tratamento sistêmico variáveis (LAM; JIMENEZ; BOVEN, 2014).

Semelhante a vários outros tipos de câncer, o CM foi classificado para facilitar o tratamento por meio de esquemas terapêuticos específicos. A 4ª edição do livro intitulado **Classificação de Tumores da Mama da Organização Mundial de Saúde** propõe o reconhecimento de nove tipos especiais de câncer de mama, além de suas variantes e 11 tipos raros de tumores mamários, além do carcinoma ductal invasivo sem outra especificação (GOBBI, 2012). As mudanças sugeridas na 4ª edição incluem alterações na terminologia adotada, definindo o conhecimento atual das novas lesões, além de novas definições para o diagnóstico histopatológico da neoplasia (SINN; KREIPE, 2013).

Recentemente, esforços para uma investigação mais ampla, na pesquisa genética e clínica, classificaram o CM em vários subtipos, baseados no status dos hormônios e do fator de crescimento, níveis de biomarcadores, bem como a hiperexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (MAJIDINIA; YOUSEFI, 2017b).

Apesar dos grandes avanços na identificação precoce e discernimento cada vez maiores da biologia do CM, aproximadamente 30% dos pacientes com a doença, em estágio inicial, apresentam recidiva da neoplasia mamária (MAJIDINIA; YOUSEFI, 2017a). Além disso, cerca de 50% a 70% dos pacientes com câncer de mama terão uma recaída dentro de um ano, e tal recaída é geralmente associada com células de adenocarcinoma que adquiriram um fenótipo quimiorresistente (KLEMM; JOYCE, 2015). Todavia, a resistência terapêutica, a recorrência e a falta de tratamento nas metástases são os principais desafios que precisam ser abordados. 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).

3.3.2 Sarcomas

Sarcomas são neoplasias malignas que especificamente aparecem em tecidos de origem mesenquimal. São raros e altamente extenuantes, pois são regularmente associados a morbidade e mortalidade significantes (POST, 2012). Esses tumores são biologicamente bastante heterogêneos, tendo origem a partir de múltiplos tecidos, como por exemplo, tecido ósseo (osteossarcoma), muscular (miosarcoma) e adiposo (lipossarcoma), além de diferentes linhagens celulares (DAVICIONI et al., 2009). No entanto, alterações moleculares identificadas e relacionadas a subtipos histológicos, específicos de sarcomas, indicaram que as classificações anteriores, baseadas no tecido de origem do tumor, são menos importantes quando comparadas com critérios moleculares e patológicos (JEMAL et al., 2003; ALBERTSMEIER et al., 2018).

Anualmente, sarcomas de tecido mole são responsáveis por quase 3.900 mortes nos Estados Unidos, principalmente devido à recidiva ou metástase (SZKANDER et al., 2014). Desta forma, é importante entender os mecanismos biológicos que contribuem para a progressão do tumor, além de contribuir com a identificação e tratamento do tumor.

Considerando os aspectos genéticos, os sarcomas são historicamente classificados em duas categorias. A primeira inclui os tumores com cariótipos diploides e alterações genéticas simples, associados às translocações (representando praticamente 1/3 de todos os sarcomas); sendo que o segundo inclui sarcomas com cariótipos complexos, caracterizados pela instabilidade genômica resultando em várias aberrações (HELMAN; MELTZER, 2003; TAYLOR et al., 2011; STEINSTRAESSER et al., 2012).

Os mecanismos moleculares que conduzem à sarcomagênese em humanos estão organizados em três grandes esferas: A primeira trata da não regulação do processo transcricional, promovida por translocações que induzem fusões gênicas, codificando proteínas transcricionais aberrantes; a segunda envolve vias de sinalização e mutações em genes específicos; a terceira e última trata das anormalidades do número de cópias do DNA, sem esquecer das bases epigenéticas (MITELMAN; JOHANSSON; MERTENS, 2007; MERTENS et al., 2009). Embora bem descritos, ações de genes individuais e seus papéis fisiológicos eventualmente estiveram ligados, diretamente, ao fenótipo de sarcoma, exceto por translocações dos genes relacionados ao fator de transcrição miogênica caixa pareada 3 (PAX3) e PAX7 (CHIBON et al., 2010).

Apesar dos muitos avanços na identificação de anormalidades genéticas no sarcoma e na elucidação de sua função, a quimioterapia continua sendo uma importante alternativa, muito

embora a cirurgia tem funcionado como abordagem essencial para o tratamento da maioria dos sarcomas (MÜLLER et al., 2007; STEEN; STEPHENSON, 2008). A insensibilidade de muitos sarcomas às terapias sistêmicas propostas está motivando a exploração de novos agentes volvidos para novos alvos (TAYLOR et al., 2011).

3.4 Quimioterapia para o câncer de mama

Dependendo do tipo de CM, diferentes drogas podem ser usadas, incluindo quimioterapia, hormonioterapia e terapia alvo molecular (RUBOVSKY; HORVÁTH, 2017). A combinação de vários fármacos com diferentes mecanismos de ação é uma estratégia efetiva, além de oferecer benefícios, como retardar as mutações celulares, e desta forma a evolução do tumor, além dos efeitos sinérgicos potencializando efeitos biológicos para redução da neoplasia (SILVA; CARLOTTO; ROTTA, 2018). Diversos protocolos são utilizados na quimioterapia do câncer de mama, dentre eles temos: FAC (Fluorouracil + Doxorrubicina + Ciclofosfamida) nas doses de 500/50/500 (mg/m²) a cada 21 dias por 6 ciclos; e AC (Doxorrubicina + Ciclofosfamida) nas doses de 60/600 (mg/m²), a cada 21 dias por 4 ciclos, seguido ou não de paclitaxel (Taxol) 80 mg/m² semanal por 12 ciclos (protocolo AC-T) (DeSANTIS et al., 2011; LYMAN et al., 2013).

Durante as últimas décadas os oncologistas desenvolveram métodos com boas respostas para o tratamento do tumor mamário envolvendo a combinação de cirurgia com quimioterapia. Nesse sentido o protocolo AC tem aplicação terapêutica no tratamento neoadjuvante, tratamento que ocorre antes da cirurgia para a redução do tumor, e desta forma facilitando a mastectomia, sendo considerado como padrão terapêutico em pacientes com câncer avançado (VRIENS et al., 2013; VON MINCKWITZ et al., 2013). Já o protocolo AC-T, comumente usado em recidiva, e desta forma mais agressiva, consiste na associação de 60 mg/m² de doxorrubicina e de 600 mg/m² de ciclofosfamida, 80 mg/m² de taxol, semanalmente, durante 12 semanas. Portanto, a combinação dos agentes quimioterápicos induz danos mutagênicos e clastogênicos ao DNA, incluindo adutos de DNA, erros de replicação, quebras e ligações cruzadas contribuindo para a redução do tumor (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; GUERREIRO et al., 2013). Portanto mesmo considerando os avanços terapêuticos para o câncer de mama, terapias alternativas são necessárias devido ao alto índice de mortalidade, pois a resistência terapêutica, a recorrência e a falta de tratamento nas metástases são os principais

desafios que precisam ser abordados, além da falta de especificidade e seletividade no tratamento do tumor resultando em efeitos prejudiciais ao paciente por inteiro.

De modo geral, os quimioterápicos apresentam distintos mecanismos de ação e são classificados em: a) agentes análogos da pirimidina (citarabina, 5-fluorouracil, gencitabina); b) antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina e idarrubicina); c) agentes alquilantes (ciclofosfamida, clorambucila, melfalana e mecloretamina); d) nitrosureias; e) triazenos; f) derivados da platina; bem como os agentes inibidores dos microtúbulos, como os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel); os antibióticos, e os inibidores das topoisomerases (SILVA, 2006; CHEUNG-ONG, GIAEVER ; NISLOW, 2013).

3.4.1 Antraciclina - Doxorubicina (DOX)

A DOX é indicada no tratamento de câncer de mama na pós-menopausa (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; MARSH; LIU, 2009) e em situações onde há resistência à terapia endócrina (KIM et al., 2014). A DOX é desencadeadora de toxicidade pela geração de ERO's, utilizando dois mecanismos distintos: ciclagem redox, através do qual produz quinona e radicais de oxigênio; e um tipo de reação de *Haber-Weiss* (reação que sofre catálise pelo complexo de Fe-DOX, através do qual são gerados radicais •OH (KASAPOVIĆ et al., 2010).

Por outro lado, estudos relatam que a DOX também impede a topoisomerase II de se religar às fitas de DNA, o que resulta em quebras duplas nesta molécula (MINOTTI et al., 2004; MARSH; LIU, 2009). Desta forma a ação da DOX sobre a topoisomerase II pode induzir eventos genotóxicos letais (KIM et al., 2017). Cabe relatar também que a DOX é mutagênica, pois induz a formação de micronúcleos por efeitos clastogênicos (GUERREIRO et al., 2013).

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

3.4.2 Agente alquilante – Ciclofosfamida (CPA)

Os agentes alquilantes são definidos como compostos eletrofílicos, que reagem com o DNA, substituindo um átomo de hidrogênio por um grupo alquila (HERZON, 2017). A CPA é derivada da mostarda nitrogenada (arma química muito utilizada durante as duas guerras mundiais). A CPA é capaz de induzir diferentes danos ao DNA tais como aberrações cromossômicas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008). Tem predileção pelo ciclo celular, induzindo ligação cruzada, gerando fragmentação das hélices de DNA e interferindo em sua síntese e função, devido a sua ação de atuar na indução de quebras de fitas simples no DNA (HENGSTLER et al., 1997). Também pode formar adutos de DNA e gerar ERO's (HAENEN et al., 1988).

A CPA não é metabolizada no interior das células cancerosas, mas sim por oxidases de função hepática mista (citocromo P450 2B1) e os seus metabólitos são entregues nas células neoplásicas através da corrente sanguínea (GRAHAM et al., 1991). De modo geral CPA pode induzir nefrotoxicidade e bradicardia, efeitos atribuídos à falta de seletividade deste quimioterápico (BATISTA et al., 2015; TELES et al., 2016).

3.4.3 Agente inibidor de microtúbulos – Taxol

O Taxol, um diterpenoide isolado a partir da casca da árvore da espécie *Taxus brevifolia* (ZOCHER et al., 1996), atua em células em divisão bloqueando a despolimerização dos microtúbulos durante o ciclo celular. Além disso, pode induzir efeitos clastogênicos ou aneugênicos (TAME et al., 2017).

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

3.5 Modelos de estudos *in vivo* e *in vitro*

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo após doenças cardiovasculares (SUDHAKAR, 2009). Um tratamento bem-sucedido requer abordagens multidisciplinares, onde diferentes estratégias, como terapia citotóxica, cirurgia, radiação e imunoterapia, são cuidadosamente combinadas (SILBERMANN et al., 2013; SWARTZ et al., 2012). No entanto, para projetar tais combinações, é essencial aprimorar conhecimentos sobre os principais mecanismos celulares intrínsecos e extrínsecos ligados ao desenvolvimento do tumor, metástase e capacidade de resposta à terapia (WU; HANNUN, 2016). Registra-se que, na procura do tratamento mais eficaz, considerando os diferentes tipos de cânceres, a ciência deposita esperança na pesquisa não clínica, incluindo modelos animais e investigações *in vitro* (TALMADGE; FIDLER, 2010; CHEON; ORSULIC, 2011).

Terapias direcionadas a alvos genéticos e epigenéticos em células cancerígenas colocam demandas crescentes em modelos animais (FULKERSON et al., 2017). Vários modelos animais foram desenvolvidos nas últimas décadas, visando elucidar diversas questões referentes ao câncer *in vivo* (PANTALEÃO; LUCHS, 2010). 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). Esses modelos permitem investigações rápidas de potenciais genes relacionados ao câncer e metástase, sendo, regularmente, utilizados para ensaios de metabólitos secundários, candidatos a fármacos, em fase não clínica (MILTENBURG; JONKERS, 2012).

Um exemplo de modelo xenográfico relata o estudo do tratamento hormonal em implantes de linhagens tumorais de mama em camundongos atímicos (sem timo) e desta forma não apresentam linfócitos (CLARKE, 1996); outro, na mesma linha de investigação, relata a criação de uma linhagem altamente tumorogênica e metastática de melanoma humano para o estudo do crescimento, metástase e expressão de moléculas em camundongos atímicos (VAN MUIJEN et al., 1991). O uso desses modelos murinos, no estudo da eficácia clínica, é uma questão importante, pois modelo apresenta vantagens e desvantagens, refletindo um processo extremamente complexo da carcinogênese humana (PANTALEÃO; LUCHS, 2010).

Além disso, estudos de carcinogênese química, em animais, colaboraram de modo direto para uma redução da incidência do câncer na população humana, essencialmente por sua capacidade de identificar carcinógenos ocupacionais, ambientais e alimentares (HOENERHOFF et al., 2009; YANG et al., 2009; FULKERSON et al., 2017). Considerando

os modelos animais atuais para a carcinogênese química, listamos duas aplicações importantes, nas quais a primeira consiste na pesquisa experimental, responsável por envolver a biologia do câncer; e uma segunda aplicação, que se fundamenta em testar metabólitos secundários com promissor potencial carcinogênico (TSUBURA et al., 2011; KEMP, 2015; STEWART et al., 2015).

Um carcinógeno modelo utilizado para a indução do câncer de mama em fêmeas de ratos e camundongos é o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), um hidrocarboneto aromático policíclico e potente carcinógeno, indutor de danos ao DNA, muito utilizado nas investigações, não clínicas, de compostos com prováveis propriedades antitumorais (ALVARADO et al., 2017; KARNAM et al., 2017).

A glândula mamária tem por característica tecidual acumular gordura, e estudos em roedores têm apontado que o DMBA é rapidamente absorvido no trato intestinal, facilitando que a glândula mamária promova tropismo positivo em resposta ao carcinógeno (ZHAO et al., 2011). Vários tumores de mama aparecem espontaneamente em poucas espécies de animais, como roedores e cães, e desta forma, por razões práticas, a maioria das investigações experimentais relacionadas ao CM utiliza roedores (RUSSO; RUSSO, 1996; KEMP, 2015). Alguns trabalhos utilizando o DMBA como modelo de indução do CM são apresentados na literatura científica. A **Tabela 3** apresenta vários desses estudos com suas principais impressões.

Tabela 3. Modelos de carcinogênese mamária induzidos quimicamente por DMBA em roedores.

Animal / Linhagem	Dose	Período de administração	Principais resultados	Referências
Rato (Lewis)	0,015g/100 g de peso corporal	Dose única	70% dos animais desenvolveram nódulo alveolar hiperplásico (após 12 meses).	Haslam; Bern (1977)
Camundongo (BALB/c)	1 mg/kg/peso	Dose única	100% de adenocarcinoma mamário. Aparecimento dos tumores a partir da 17ª semana.	Medina; Kittrell (2004)
Camundongo (p53 ^{R270H/+} WAPCre)	1 mg/kg/peso	1 dose semanal (durante 6 semanas)	40% dos animais apresentaram tumores de mama (carcinoma, sarcoma, neoplasia intraepitelial).	Wijnhoven et al. (2005)
Camundongo (FVB/N)	1 mg/semana	1 dose semanal (durante 6 semanas)	Formação do tumor após 4 semanas da aplicação da última dose. 75% dos animais desenvolveram tumor de mama.	Currier et al. (2005)
Camundongo (Wild Type)	1 mg/kg/peso	1 dose semanal (durante 6 semanas)	37,5% dos animais com tumor de mama (incidência após 229 dias de aplicação da última dose). Maior frequência de adenocarcinoma mamário.	Lu et al. (2006)
Rato (Wistar)	50 mg/kg/peso	Dose única	Elevação dos níveis de ureia, ácido úrico e creatinina, bem como nas atividades de AST, ALT e LDH e redução nos níveis de proteínas totais, albumina e globulina.	Ozdemir et al. (2007)
Rato (Sprague-Dawley)	25 mg/kg/peso	Dose única	100% dos animais tratados com DMBA desenvolveram carcinoma mamário.	Baskaran et al. (2010)
Rato (Sprague-Dawley)	10 mg/100 g de peso corporal	1 dose durante duas semanas	95% dos animais tratados desenvolveram carcinoma mamário	Zhao et al. (2011)
Rato (Sprague-Dawley)	25 mg/kg/peso	Dose única	Após 90 dias de tratamento todos os animais apresentaram carcinoma mamário.	Kalaiselvi et al. (2013)
Rato (Sprague-Dawley)	80 mg/kg/peso	Dose única	Tumores induzidos após 3ª semana de administração do DMBA. Detecção de alterações como: aumento de citocinas pró inflamatórias (IL-1b, IL-6 e TNF-a), além das defesas antioxidantes (SOD e CAT).	Karnam et al. (2017)

Em relação aos sarcomas, outros modelos animais também são apropriados para investigações da compreensão desse tipo de tumor, além dos avanços nas abordagens terapêuticas (HAYES; LANGENAU, 2017). Embora seja complexo desenvolver modelos animais que mimetizam a doença humana em sua totalidade e complexidade, alguns modelos em roedores e *in vitro*, com sarcomas, forma desenvolvidos e têm, satisfatoriamente, auxiliado pesquisas na obtenção de novos medicamentos (POST, 2012; PHELPS; CHEN, 2016).

O modelo murinho portador de sarcoma 180 (S180) é um dos modelos 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* desenvolvendo-se em múltiplas linhagens de animais consanguíneos, devido à deficiência do 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 modelo tem sido amplamente utilizado nas pesquisas de novos candidatos a agentes antitumorais (CHUNG et al., 2010; YI et al., 2017).

Por fim, os componentes cruciais de um modelo *in vivo* ou *in vitro* são células tumorais que permitem uma comparação direta dos resultados experimentais, além disso são largamente utilizadas para investigar os mecanismos moleculares do tumor e, mais significativamente, como importante ferramenta na procura por novas drogas com verdadeiro potencial antitumoral (GILLET; VARMA; GOTTESMAN, 2013; MCDERMOTT et al., 2014; PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

3.6 Biomarcadores citotóxicos e toxicogénicos

Biomarcadores citogénicos têm sido aplicados, há muito tempo, na vigilância da exposição genotóxica humana, além dos efeitos iniciais de carcinógenos genotóxicos (NORPPA, 2004). A genotoxicidade ao material genético pode ser induzida por agentes químicos e/ou físicos que interagem ao DNA, além de outros caminhos celulares, podendo gerar adutos, quebras de fitas simples e duplas, mutações pontuais e alterações estruturais aos cromossomos, bem como numéricas (BAUMSTARK-KHAN; HELLWEG; REITZ, 2010; LAU et al., 2010; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). Cabe evidenciar que essas alterações podem propiciar o desenvolvimento do câncer, contribuindo para alterações hereditárias, prejudicando a saúde e bem-estar do indivíduo (SINGH et al., 2009; BAUMSTARK-KHAN; HELLWEG; REITZ, 2010). As agressões geradas ao material

genético podem ser detectadas com a aplicação de biomarcadores citogenéticos e/ou moleculares.

Investigações para a detecção de danos ao material genético, comumente, são realizadas com aplicação de vários testes não clínicos, tanto em estudos *in vitro* quanto em estudos *in vivo*, a exemplo do teste cometa, teste de micronúcleos, teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese, *Allium cepa* e teste com *Saccharomyces cerevisiae* (KANG et al., 2013; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015; MORAES et al., 2016). Na avaliação da citotoxicidade, o ensaio com o microcrustáceo *Artemia salina* permite conquistar respostas para a detecção de estresses celulares em populações humanas, muito embora o invertebrado *A. salina* seja restrito a um ambiente único, mas permite analisar processos de interesse biológico geral (GAJARDO; BEARDMORE, 2012).

Comumente, compostos bioativos são quase sempre tóxicos quando em altas doses. Deste modo, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006). Esse ensaio de bioletalidade para as larvas de *A. salina* foi proposto inicialmente por Michael, Thompson e Abramovitz (1956) e tem sido introduzido na rotina de vários grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural de metabólitos secundários (MCLAUGHLIN, 1991; FALKENBERG; BAUMGARTEN; SIMIONATO, 1999; MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002; RUIZ et al., 2005; LIBRALATO et al., 2016). Cistos de *Artemia salina* apresentam baixo custo e são facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco (MEYER et al., 1982). Essas vantagens contribuíram para a popularização desse bioensaio, especialmente a partir da década de 90.

Plantas superiores são reconhecidas como excelentes modelos para estudos de monitoramento ambiental, investigação da atividade biológica de metabólitos secundários e demais agentes biológicos indutores de danos ao material genético (GÓMEZ-ARROYO et al., 2018). O ensaio com *Allium cepa* vem sendo utilizado na avaliação de danos ao DNA e é capaz de avaliar diferentes alterações ocorridas ao material genético com base em marcadores macroscópicos e microscópicos, como a investigação da toxicidade pela inibição do crescimento dos meristemas das raízes desse organismo, das alterações cromossômicas, que são identificadas como consequências de danos genotóxicos (DORNELLES et al., 2017). Além disso, o teste *A. cepa* detecta efeitos tóxicos, citotóxicos, por meio da investigação das alterações no índice mitótico e mutagenicidade, pela formação de micronúcleos (LEME;

MARIN-MORALES, 2009; LAUGHINGHOUSE IV et al., 2012). O teste de *A. cepa* também possibilita associação de um outro ensaio, teste cometa, em gel de agarose, evidenciando a genotoxicidade, bem como atividades de reparo de DNA (POURRUT et al., 2015; SANTOS; POURRUT; OLIVEIRA, 2015). Cabe também destacar que o ensaio com o organismo *A. cepa* apresenta reconhecida correlação envolvendo resultados em outros sistemas teste, que utilizam células procariotas e eucariotas (FISKESJÖ, 1985; YILDIZ et al., 2009). A genotoxicidade de efluentes com resíduos de indústrias farmacêuticas vem sendo investigada com o ensaio *A. cepa* (BAKARE et al., 2009).

A atividade biológica, de células eucarióticas, é constantemente investigada e confrontada, através da ação de agentes químicos (endógenos e exógenos), e físicos (NIKLAS; SCHNEIDER; HEINZLE, 2010). Esses agentes são responsáveis por promover alterações genômicas que levam à manutenção genética e/ou mutações, que envolvem variações no ciclo mitótico, permitindo avaliações detalhadas da bioatividade de candidatos a antineoplásicos (PATTERSON; LARSEN; MOORE, 1994; FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008). Nesse contexto, o teste com o organismo eucarioto *Saccharomyces cerevisiae* é importante para mensurar mecanismos de alterações na fidelidade de replicação, sensibilidade a lesões ao material genético, bem como os mecanismos de respostas celulares a danos ao DNA (SKONECZNA; KANIAK; SKONECZNY, 2015; MORAES et al., 2016). Algumas mutações aparecem de forma espontânea durante vários eventos, tais como as que ocorrem durante os mecanismos moleculares de replicação, durante o metabolismo que promove a geração de espécies reativas de oxigênio, durante a segregação de cromossomos e por erros durante o ciclo celular (OSSOWSKI et al., 2010). Assim diferentes tipos de mutações podem ocorrer, dentre elas as alterações em sequências de DNA e bloqueios da DNA polimerase, mecanismos moleculares que podem ser evidenciados em leveduras, com dados extrapolados para humanos (FORTUNE et al., 2005; SAGATOVA et al., 2018). Desta forma *Saccharomyces cerevisiae* é um modelo ideal para estudar as respostas ao estresse oxidativo por várias razões: a) apresentar genoma com alto grau de homologia com o genoma humano; b) produzir proteínas que apresentam elevada homologia funcional com proteínas humanas específicas; c) ser um sistema cuja manipulação genética é razoavelmente fácil e mais barata que outros modelos; d) apresentar base de dados mais completa, comparado a outros os modelos eucarióticos (DE LA TORRE-RUIZ; PUJOL; SUNDARAN, 2015).

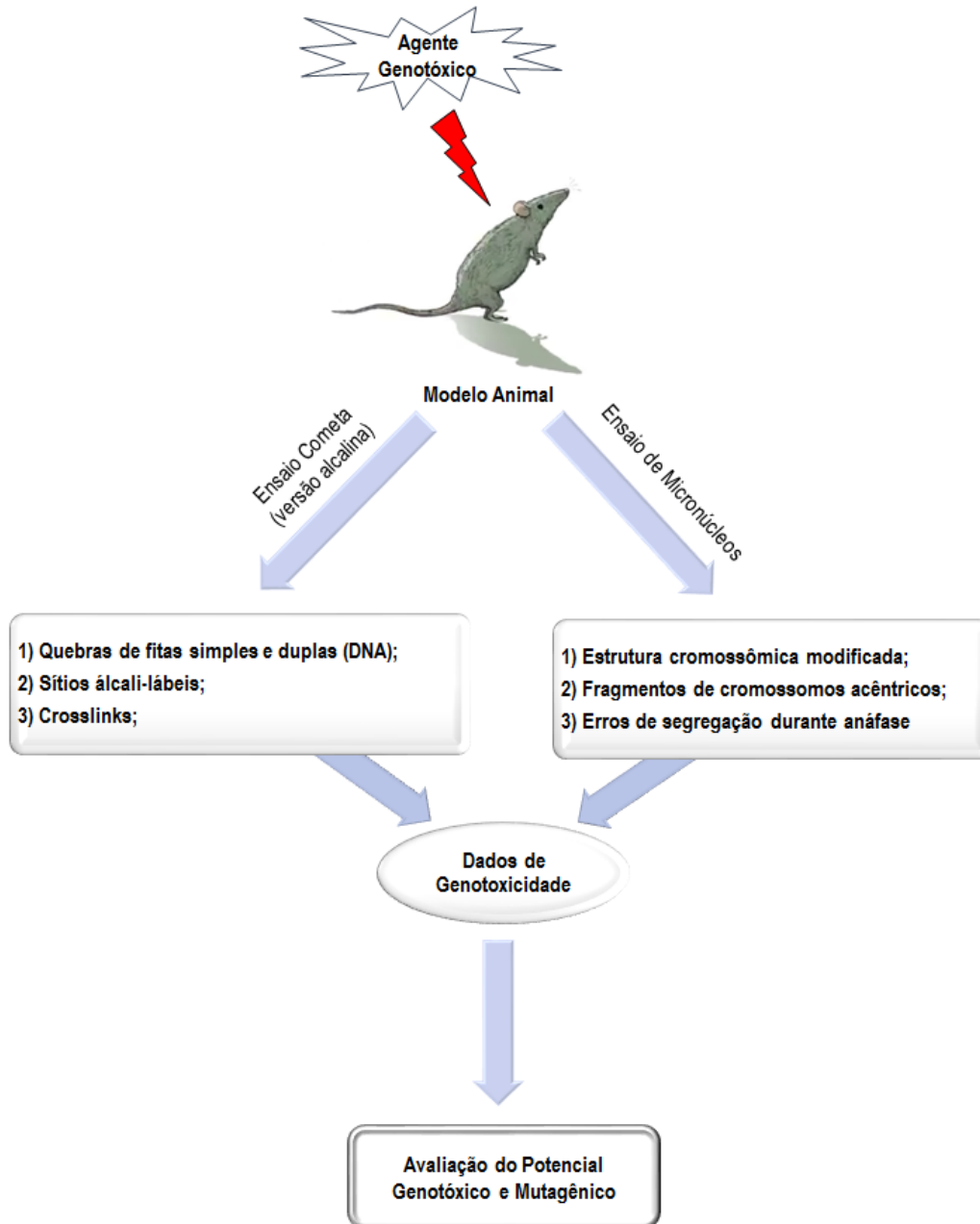
Eventos genotóxicos são conhecidos como cruciais para o início do câncer e para avaliar o risco de uma neoplasia, ensaios de genotoxicidade, incluindo cometa e micronúcleos (MN),

são perfeitamente aceitos (KANG et al., 2013). A combinação do ensaio cometa *in vivo* com o teste de MN tem sido considerada como uma importante metodologia para avaliar danos genéticos, além de ser usada na avaliação do potencial de carcinogenicidade (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

No campo da genotoxicologia, o teste cometa *in vivo* tem sido considerado como uma poderosa ferramenta para distinguir entre carcinógenos genotóxicos e carcinógenos não-tóxicos, bem como para identificar mutágenos, além de propriedades de candidatos a antitumorais (SINGH et al., 1988; RAMOS et al., 2015; IMANIKIA et al., 2016). Além do teste cometa, o teste de MN foi desenvolvido para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade de produtos naturais e/ou químicos que induzem a formação de pequenos fragmentos de DNA ligados à membrana nas células (micronúcleos) (FENECH, 2007). Presumivelmente, o teste de MN é capaz de detectar potenciais substâncias genotóxicas que podem modificar a estrutura dos cromossomos e induzir erros de segregação (SAVAGE, 1988; LEE et al., 2014). Estudos utilizando o teste de MN, têm mostrado que o aumento significativo da frequência de MN está relacionado ao risco direto de danos ao DNA, apoiando a evidência de que o ensaio de MN é um importante biomarcador de mutagenicidade (BONASSI et al., 2007; KANG et al., 2013).

Por fim, a combinação dos ensaios cometa e MN consiste na premissa de que não há nenhum ensaio, que sozinho forneça todos os aspectos necessários para uma completa investigação da genotoxicidade e mutagenicidade de compostos naturais (GRUJIČIĆ et al., 2016; STORNETTA et al., 2017) (**Figura 7**).

Figura 7. Perfil geral do ensaio cometa e teste de micronúcleos em modelo animal.



Fonte: Adaptado de Kang et al., 2013.

REFERÊNCIAS

- ACLOQUE, H.; ADAMS, M. S. FISHWICK, K.; BRONNER-FRASER, M.; NIETO, A. M. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1436-1449, 2009.
- ALBACHA, J. D.; KHOURY, M.; MOUAWAD, C.; HADDAD, K.; HAMOUI, S.; AZAR, A.; FAJLOUN, Z.; MAKDISSY, N. High incidence of ACE/PAI-1 in association to a spectrum of other polymorphic cardiovascular genes involving PBMCs proinflammatory cytokines in hypertensive hypercholesterolemic patients: Reversibility with a combination of ACE inhibitor and statin. **Plos One**, v. 10, n. 5, e0127266, 2015.
- ALBERTSMEIER, M.; RAUCH, A.; ROEDER, F.; HASENHÜTL, S.; PRATSCHKE, S.; KIRSCHNECK, M.; GRONCHI, A.; JEBSEN, N. L.; CASSIER, P. A.; SARGOS, P.; BELKA, C.; LINDNER, L. H.; WERNER, J.; ANGELE, M. K. External beam radiation therapy for resectable soft tissue sarcoma: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Surgical Oncology**, v. 25, n. 3, p. 754-767, 2018.
- 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.
- ALI, R.; RAKHA, E. A.; MADHUSUDAN, S.; BRYANT, H. E. DNA damage repair in breast cancer and its therapeutic implications. **Pathology**, v. 49, n. 2, p. 156-165, 2017.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALVARADO, A.; FAUSTINO-ROCHA, A. I.; COLAÇO, B.; OLIVEIRA, P. A. Experimental mammary carcinogenesis – Rat models. **Life Sciences**, v. 173, p. 116-134, 2017.
- AMAGATA, T.; AMAGATA, A.; TENNEY, K.; VALERIOTE, F.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.; CREWS, P. Unusual C25 produced by a sponge-derived *Penicillium citrinum*. **Organic Letters**, v. 5, n. 23, p. 4393-4396, 2003.
- AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 325-330, 2005.
- ANDRADE, T. J. A. S. Investigação Química e Biológica dos Metabólitos Secundários Derivados de Macroalgas Marinhas e Microrganismos Associados. Tese de doutorado em Química, Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2014. p.358.
- ARAI, M.; HIBINO, T. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. **Cancer Letters**, v. 17, n. 3, p. 281–287, 1983.

- ARORA, D. S.; CHANDRA, P. In Vitro Antioxidant Potential of Some Soil Fungi: Screening of Functional Compounds and Their Purification from *Penicillium citrinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 639-651, 2011.
- ASAI T.; LUO, D.; YAMASHITA, K.; OSHIMA, Y. Structures and biomimetic synthesis of novel α -pyrone polyketides of an endophytic *Penicillium* sp. in *Catharanthus roseus*. **Organic Letters**, v. 15, n. 5, p. 1020–1023, 2013.
- 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.
- BAKARE, A. A.; OKUNOLA, A. A.; ADETUNJI, O. A.; JENMI, H. B. Genotoxicity assessment of a pharmaceutical effluente using four bioassays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 373-381, 2009.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade de Fármacos: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-388, 2009.
- BARROS, F. A.; RODRIGUES-FILHO, E. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. Isolated as na endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 3, p. 257-268, 2005.
- BASKARAN, N.; MANOHARAN, S.; BALAKRISHNAN, S.; PUGALENDHI, P.; Chemopreventive potential of ferulic in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 637, p. 22-29, 2010.
- BATISTA, S. E. R.; GRASS, A. V.; AVILÉS, E. D. C.; PÉREZ, L. T.; PORTELLES, A. F. Ciclofosfamida en el tratamiento de la esclerosis sistémica. **Correo Científico Médico de Holguín**, v. 19, n. 4, p. 1-12, 2015.
- BAUMSTARK-KHAN, C.; HELLWEG, C. E.; REITZ, G. Cytotoxicity and genotoxicity reportes systems based on the use of mammalian cells. **Whole Cell Sensing System II**, v. 118, p. 113-151, 2010.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2013.
- BERNDT, W. O.; HAYES, A. W. The effect of probenecid on citrinin-induced nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 118–124, 1982.
- BETINA, V. Mycotoxins: Chemical, Biological, and Environmental Aspects, Elsevier, Amsterdam, 1989.
- BHATNAGAR, I.; KIM, S. K. Pharmacologically prospective antibiotic agentes and their sources: A marine microbial perspective. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 631-643, 2012.
- BLACKADAR, C.B. Historical review of the causes of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n.1, pp. 54-86, 2016.

BLUNT, J. W.; COOP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 116-211, 2015.

BOHM, J.; DE SAEGER, S.; EDLER, L.; FINK-GREMMELS, J.; MANTLE, P.; PERAICA, M.; STETINA, R.; VRABCHEVA, T. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. **European Food Safety Authority (EFSA)**, v. 10, n. 3, 2605, 82 p., 2012.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. Na increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.

BORGES, U. S.; COSTA-SILVA, D. R.; SILVA-SAMPAIO, J. P.; ESCÓCIO-DOURADO, C. S.; CONDE JR, A. M.; CAMPELO, V.; GEBRIM, L. H.; SILVA, B. B.; LOPES-COSTA, P. V. A comparative study of Ki-67 antigen expression. Between luminal A and triple-negative subtypes of breast cancer. **Medical Oncology**, v. 34, n. 156, 2017.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 1-17, 2009.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-254, 2005.

CAVALINI, L. T.; CRUZ, P. S.; SILVA, G. M.; SILVA, I. F. Perfil da assistência em um hospital universitário: informações do registro hospitalar de câncer, 2000-2009. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 153-161, 2012.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, p. 1559-64, 2011.

CHAGAS, G. M.; KLIIPPEL, M. L.W.; CAMPELLO, A. P.; BUCHI, D. F.; OLIVEIRA, M. B. M. Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. **Cell Structure and Function**, v. 19, p. 103-108, 1994.

CHAN, W.H; SHIAO, N.H. Effect of citrinin on mouse embryonic development *in vitro* and *in vivo*. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 120-125, 2007.

CHANG, C. H.; YU, F. Y.; WANG, L. T.; LIN, Y. S.; LIU, B. H. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, n. 237, p. 281-287, 2009.

CHEN, C. C.; CHAN, W. H. Inhibition of citrinin-induced apoptotic biochemical signaling in human hepatoma G2 cells by resveratrol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 8, p. 3338-3357, 2009.

CHEN, L.; GONG, M. W.; PENG, Z. F.; ZHOU, T.; YING, M. G.; ZHENG, Q. H.; LIU, Q. Y.; ZHANG, Q. Q. The marine fungal metabolite, Dicitrinone B, induces A375 cell apoptosis through the ROS-related caspase pathway. **Marine Drugs**, v. 12, p. 1939-1958, 2014.

CHEN, L.; LIU W.; HU, X.; HUANG, K.; WU, J-L.; ZHANG, Q-Q. Citrinin Derivatives from the Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.59, n. 4, p. 515-517, 2011.

CHEON, D.J.; ORSULIC, S. Mouse models of cancer. **Annual Review of Pathology**, v. 6, n.1, p. 95-119, 2011.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. DNA-Damaging Agents in cancer chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. **Chemistry and Biology**, v. 4, p. 649-659, 2013.

CHIBON, F.; LAGARDE, P.; SALAS, S.; PÉROT, G.; BROUSTE, V.; TIRODE, F.; LUCCHESI, C.; REYNIES, A.; KAUFFMANN, A.; BUI, B.; TERRIER, P.; BONVALOT, S.; LE CESNE, A.; VINVE-RANCHÈRE, D.; BLAY, J. Y.; COLLIN, F.; GUILLOU, L.; LEROUX, A.; COINDRE J. M.; AURIAS, A. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. **Nature Medicine**, v.16, p. 781-787, 2010.

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, p. 177-182, 2010.

CLARK, B. R.; CAPON, R. J.; LACEY, E.; TENNANT, S.; GILL, J. H. Citrinin revised: From monomers to dimers and beyond. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 4, p. 1520-1528, 2006.

CLARKE, R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 39, n. 1, p. 69-86, 1996.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. A tecnologia de *microarray* no estudo do câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 64-72, 2010.

COSTA-SILVA, D. R.; BARROS-OLIVEIRA, M. C.; BORGES, R. S.; CAMPOS-VERDES, L. M.; SILVA-SAMPAIO, J. P.; ESCORCIO-DOURADO, C. S.; MARTINS, L. M.; ALENCAR, A. P.; BARACAT, E. C.; SILVA, V. C.; SILVA, B. B. Insuline-like growth factor 1 gene polymorphism in women with breast cancer. **Medical Oncology**, v. 1, p. 34-59, 2017.

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

DAVICIONI, E.; ANDERSON, M. J.; FINCKENSTEIN, F. G.; LYNCH, J. C.; QUALMAN, S. J.; SHIMADA, H.; SCHOFIELD, D. E.; BUCKLEY, J. D.; MEYER, W. H.; SORENSE, P. H. B.; TRICHE, T. J. Molecular classification of rhabdomyosarcoma– genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 2, p. 550-564, 2009.

- DE LA TORRE-RUIZ, M. A.; PUJOL, N.; SUNDARAN, V. Coping with oxidative stress. The yeast model. **Current Drug Targets**, v. 16, n. 1, p. 2-12, 2015.
- DeSANTIS, C.; SIEGEL, R.; BANDI, P.; JEMAL, A. Breast cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 6, p. 409-418, 2011.
- DESHMUKH, S. K.; PRAKASH, V.; RANJAN, N. Marine fungi: A source of potential anticancer compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, doi: 10.3389/fmicb.2017.02536, 2017.
- DONATI, A.; CASTRO, L. G. M. Efeitos colaterais cutâneos de quimioterapia com taxanos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 755-758, 2011.
- DORNELLES, R. C.; LEAL, G. C.; DECIAN, A. C. S.; SANTOS, D. D.; RADISKE, G. A.; MANFRON, M. P.; TEDESCO, S. B. Antiproliferative and genotoxic potential from extracts and fractions of *Richardia brasiliensis* Gomes (*Rubiaceae*) by the *Allium cepa* L. test system. **Lheringia**, v. 72, n. 3, p. 424-431, 2017.
- EARL, H. M.; VALLIER, A. L.; HILLER, L.; FENWICK, N.; YOUNG, J.; IDDAWELA, M.; ABRAHAM, J.; HUGHES-DAVIES, L.; GOUNARIS, I.; MCADAM, K.; HOUSTON, S.; HICKISH, T.; SKENE, AN.; CHAN S.; DEAN, S.; RICHIE, D.; LAING, R.; HARRIES, M.; CALDAS, C. Effects of the addition of gemcitabine, and paclitaxel-first sequencing, in neoadjuvant sequential epirubicin, cyclophosphamide, and paclitaxel for women with high-risk early breast cancer (Neo-tAnGo): an open-label, 2×2 factorial randomised phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 2, p. 201-212, 2014.
- EBEL, R. Terpenes from marine-derived fungi. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2340-2368, 2010.
- ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.
- EL-NEKETI, M.; EBRAHIM, W.; LIN, W.; GEDARA, S.; BADRIA, F.; SAAD, H. E. A.; LAI, D.; PROKSCH, P. Alkaloids and polyketides from *Penicillium citrinum*, an endophyte isolated from the Moroccan Plant *Ceratonia siliqua*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1099-1104, 2013.
- ENDO, A.; KURODA, M. Citrinin an inhibitor of cholesterol synthesis. **The Journal of Antibiotics**, v. 39, p. 841-843, 1976.
- FAKHAR, M.; CHABRA, A.; RAHIMI-ESBOEI, B.; REZAEI, F. In vitro protoscolicidal effects of fungal chitosan isolated from *Penicillium waksmanii* and *Penicillium citrinum*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, n. 2, p. 162-167, 2013.
- FALKENBERG, M.; BAUMGARTEN, D.; SIMIONATO, C. Screening of some Brazilian medicinal plants with the brine shrimp assay. **Acta Horticulturae**, v. 502, p. 401-404, 1999.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.
- 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**, Genève, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, 99-112, 1985.

FLAJS, D.; PERAICA, M. Toxicological properties of citrinin. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, p. 457-464, 2009.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v.10, p. 226–236, 1929.

FÖLLMANN, W.; BEHM, C.; DEGEN, G. H. Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A *in vitro*. **Archives Toxicology**, doi: 10.1007/s00204-014-1216-8, Published on line: 28 feb 2014.

FORTUNE, S. M.; JAEGER, A.; SARRACINO, D. A.; CHASE, M. R.; SASSETTI, C. M.; SHERMAN, D. R.; BLOOM, B. R.; RUBIN, E. J. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10676-10681, 2005.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 231-240, 2008.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, 1-173, 2004.

FULKERSON, C. M.; DHAWAN, D.; RATLIFF, T. L.; HAHN, N. M.; KNAPP, D. W. Naturally occurring canine invasive urinary bladder cancer: A complementary animal model to improve the success rate in human clinical trials of new cancer drugs. **International Journal of Genomics**, v. 2017, 6589529, 2017.

GAJARDO, G. M.; BEARDMORE, J. A. The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 185, 2012.

GALLUZI, L.; LÓPEZ-SOTO, A.; KUMAR, S.; KROEMER, G. Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. **Immunity**, v. 44, p. 221-231, 2016.

GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, p. 1-25, 2010.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 334-361, 1998.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 727-741, 1991.

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.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: Atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial de Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 48, n. 6, p. 463-474, 2012.

GÓMEZ-ARROYO, S.; CORTÉS-ESLAVA, J.; LOZA-GÓMEZ, P.; ARENAS-HUERTERO, F.; LA MORA, M. G.; BERMEA, O. M. *In situ* biomonitoring o fair quality in rural and urban enviroments of Mexico Valley through genotoxicity envaluated in wild plants. **Atmospheric Pollution Research**, v. 9, p. 119-125, 2018.

GONZALEZ-ANGULO, A. M.; TIMMS, K. M.; LIU, S.; CHEN, H.; LITTON, J. K.; POTTER, J.; LANCHBURY, J. S.; STEMKE-HALE, K.; HENNESSY, B. T.; ARUN, B. K.; HORTOBAGYI, G. N.; DO, K. A.; MILLS, G. B.; MERIC-BERNSTAM, F. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. **Clinical Cancer Resesearch**, v. 17, n. 5, p. 1082–1089, 2011.

GOZZO, T. O. **Toxicidade ao tratamento quimioterápico em mulheres com câncer de mama**. Tese de Doutorado apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP – Programa Interunidades de Doutoramento em Enfermagem. Área de Concentração – Enfermagem. Ribeirão Preto, 2008.

GRAHAM, M. A.; RILEY, R. J.; KERR, D. J. Drug metabolism in carcinogenesis and cancer chemotherapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 51, p. 275-289, 1991.

GRUJIČIĆ, D.; RADOVIĆ, M.; ARSENIJEVIĆ, S.; MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ, O. Cytogenetic biomarkers in detection of genotoxic effects of gestagens in peripheral blood lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Medical Genetics**, V. 59, N. 12, P. 624-633, 2016.

GUERREIRO, P. S.; FERNANDES, A. S.; COSTA, J. G.; CASTRO, M.; MIRANDA, J. P.; OLIVEIRA, N. G. Differential effects of methoxyamine on doxorubicin cytotoxicity and genotoxicity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Mutation Research**, v. 757, n. 2, p. 140-147, 2013.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of cometa assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. 1-5, 2015.

GUPTA, M.; BANDYOPADHYAY, S.; SAHMAD, D. Effects of ochratoxin A and citrinin on liver function and metabolism. **IRCS Medicine Scielo**, v. 7, p. 320, 1979.

HAENEN, G. R. R. M.; VERMEULEN, N. P. E.; TAI TIN TSOI, J. N. L.; RAGETLI, H. M. N.; TIMMERMAN, H.; BAST, A. Activation of the microsomal glutathione-S-transferase and reduction of the glutathione dependent protection against lipid peroxidation by acrolein. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 10, p. 1933-1938, 1988.

- HASAN, S.; ANSARI, M. I.; AHMAD, A.; MISHRA, M. Major bioactive metabolites from marine fungi: A Review, **Bioinformation**, v. 11, n. 4, p. 176-181, 2015.
- HASLAM, S. Z.; BERN, H. A. Histopathogenesis of 7,12dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. **Proceedings of National Academy Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 9, p. 4020-4024, 1977.
- 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, p. 525-561, 2017.
- HELMAN, L.; MELTZER, P. Mechanisms of sarcoma development. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 685-694, 2003.
- HENGSTLER, J. G.; HENGST, A.; FUCHS, J.; TANNER, B.; POHL, J.; OESCH, F. Induction of DNA crosslinks and DNA strand lesions by cyclophosphamide after inactivation by cytochrome P-450 2B1. *Mutation Research*, v. 373, p. 215-223, 1997.
- HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, p. 4688-4716, 2009.
- HERZON, S. B. The Mechanism of Action of (-)-Lomaiviticin A. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 10, p. 2577-2588, 2017.
- HETHERINGTON, A.C.; RAISTRICK, H. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 220, p. 269-295, 1931.
- 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, p. 835-848, 2009.
- HORAK, C. E.; BRONDER, J. L.; BOUADIS, A.; STEEG, P. S. Metastasis: The Evasion of Apoptosis. **Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms**, v. 1, p. 63-96, 2007.
- HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium* section citrina. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 53-138, 2011.
- HU, Y.; ZHANG, J.; LIU, D.; GUO, J.; LIU, T.; XIN, Z. Pencitrin and pencitrinol, two new citrinin derivatives from an endophytic fungus *Penicillium citrinum* salicorn 46. **Phytochemistry Letters**, v. 22, p. 229-234, 2017.
- HUANG, Y. T.; LAI, C. Y.; LOU, S. L.; YEH, J. M.; CHAN, W. H. Activation of JNK and PAK2 is essential for citrinin-induced apoptosis in a human osteoblast cell line. **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 343-356, 2009.
- HULIKERE M, M.; JOSHI, C. G. Characterization, antioxidant and antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using marine endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. **Biochemistry and Biophysics Reports**, *In Press*, 2017.

- HULIKERE M, M.; JOSHI, C. G.; ANANDA D.; POYYA, J.; KUDVA, A. K.; LAKKAPPA, D. B. Biogenic synthesis of gold nanoparticles by marine endophytic fungus-*Cladosporium cladosporioides* isolated from seaweed and evaluation of their antioxidant and antimicrobial properties. **Process Biochemistry**, *In Press*, 2017.
- IMANIKIA, S.; GALEA, F.; NAGY, E.; PHILLIPS, D. H.; STÜRZENBAUM, S. R.; ARLT, V. M. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 356-361, 2016.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>> Acesso em: 20 abr. 2018.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>> Acesso em: 21 set. 2018.
- IOANNOU, E.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. **Bioactive metabolites from marine algae**. *Bio Environment.*, v. 24, n. 1, p. 31-86, 2010.
- ISLAM, M. T.; STREACK, L.; ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, S. W. C.; MACHADO, K. C.; MACHADO, K. C.; GOMES JÚNIOR, A. L.; PAZ, M. F. C. J.; MATA, A. M. O. F.; SOUSA, J. M. C.; COSTA JUNIOR, J. S.; ROLIM, H. M. L.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. Evaluation of toxic cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, 2017.
- IWAHASHI, H.; KITAGAWA, E.; SUZUKI, Y.; UEDA, Y.; ISHIZAWA, Y.; NOBUMASA, H.; KUBOKI, Y.; HOSODA, H.; IWAHASHI, Y. **Evaluation of Toxicity of the Mycotoxin Citrinin Using Yeast ORF DNA Microarray and Oligo DNA Microarray**. **BMC Genomics**, v. 8, n. 95, 2007.
- JEMAL, A.; MURRAY, T.; SAMUELS, A.; GHAFOOR, A.; WARD, E.; THUN, M.J. Cancer statistics, 2003. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 53, n.1, pp. 5-26, 2003.
- JIMENO, J.; FAIRCLOTH, G.; FERNÁNDEZ SOUSA-FARO, J.M.; SCHEUER, P.; RINEHART, K. New marine derived anticancer therapeutics: A journey from the sea to clinical trials. **Marine Drugs**, v. 2, p. 14-29, 2004.
- JONES, E. G.; SUETRONG, S.; SAKAYAROJ, J.; BAHKALI, A. H.; ABDEL-WAHAB, M. A.; BOEKHOUT, T.; PANG, K. L. Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. **Fungal Diversity**, v. 73, p. 1-72, 2015.
- JUNG, J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. **Toxicology Research**, v. 30, n. 1, pp. 1-5, 2014.
- KALAISELVI, M.; GOMATHI, D.; RAVIKUMAR, G.; DEVAKI, K.; UMA, C. Ameliorative effect of *Ananus comosus* pell on 7, 12 dimethylbenz(α)anthracene induced mammary carcinogenesis with reference to oxidative stress. **Journal of Acute Disease**, p. 22-28, 2013.

- KAMIŃSKA, M.; CISZEWSKI, T.; ŁOPACKA-SZATAN, K.; MIOTŁA, P.; STAROSŁAWSKA, E. Breast cancer risk factors. **Przegląd Menopauzalny**, v. 14, n.3, pp. 196-202, 2015.
- 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, 2013.
- KAR, P. K.; MURMU, S. SAHA, S.; TANDON, V.; ACHARYA, K. Anthelmintic efficacy of gold nanoparticles derived from a phytopathogenic fungus, *Nigrospora oryzae*. **Plos One**, v. 9, e84693, 2014.
- KARNAM, K. C.; ELLUTLA, M.; BODDULURU, L. N.; KASALA, E. R.; UPPULAPU, S. K.; KALYANKUMARRAJU, M.; LAHKAR, M. Preventive effect of berberine against DMBA-induced breast cancer in female Sprague Dawlwy rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 207-214, 2017.
- KASAPOVIĆ, J.; PEJIĆ, S.; STOJILJKOVIĆ, V.; TODOROVIĆ, A.; RADOŠEVIĆ-JELIĆ, L.; SAIČIĆ, Z. S.; PAJOVIĆ, S. B. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages after chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 16-17, p. 1287-1293, 2010.
- KAUSHIK, N. K.; MURALI, T. S.; SAHAL, D.; SURYANARAYANAN, T. S. A search for antiplasmodial metabolites among fungal endophytes of terrestrial and marine plants of Southern India. **Acta Parasitologica**, v. 54, n. 4, p. 745-757, 2014.
- KAWAHARA, T.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. JBIR-124: A novel antioxidative agent from a marine sponge-derived fungus *Penicillium citrinum* SpI080624G1f01. **Journal of Antibiotics**, v. 65, p. 45-47, 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. 865-874, 2015.
- KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. **Marine Drugs**, v. 2, p. 73-82, 2004.
- KIM, E. J.; KIM, S. Y.; KIM, S. M.; LEE, M. A novel topoisomerase 2a inhibitor, cryptotanshinone, suppresses the growth of PC3 cells without apparent cytotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 330, p. 84-92, 2017.
- KIM, T. H.; SHIN, Y. J.; WON, A. J.; LEE, B. M.; CHOI, W. S.; JUNG, J. H. Resveratrol enhances chemosensitivity of doxorubicin in multidrug-resistant human breast cancer cells via increased cellular influx of doxorubicin. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1840, p. 615-625, 2014.
- KITABATAKE, N.; TRIVEDI, A. B.; DOI, E. Thermal decomposição and detoxification of citrinin under various moisture conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 2240-2244, 1991.
- KLEMKE, C.; KEHRAUS, S.; WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M. New secondary metabolites from the marine endophytic fungus *Apiospora mantagnei*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1058-1063, 2004.

KLEMM, F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 4, p. 198-213, 2015.

KNASMÜLLER, S.; CAVIN, C.; CHAKRABORTY, A.; DARROUDI, F.; MAJER, B. J.; HUBER, W. W.; EHRLICH, V. A. Structurally related mycotoxins ochratoxin a, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in humanderived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. **Nutrition and Cancer**, v. 50, n. 2, p. 190–197, Published online, 2009.

KUMAR, A.; PATIL, D.; RAJAMOCHANAN, P. R.; AHMAD, A. Isolation, purification and characterization of Vinblastine and Vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **Plos One**, v. 8, n. 9, e71805, 2013.

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

LAI, B.; OESTERHELT, H. B.; MÜLLER, W. E. G.; WRAY, V.; PROKSCH, P. Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum*. **Fitoterapia**, v. 91, p. 100-106, 2013.

LAM, S. W.; JIMENEZ, C. R.; BOVEN, E. Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 1, p. 129–138, 2014.

LAU, P.; BAUMSTARK-KHAN, C.; HELLWEG, C. E.; REITZ, G. X-irradiation-induced cell cycle delay and DNA double-strand breaks in the murine osteoblastic cell line OCT-1. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 49, n. 2, p. 271-280, 2010.

LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M. E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V. D. S.; FIORE, M. F.; TEDESCO, S. B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of The Total Environment**, v. 432, p. 180-188, 2012.

LEE, W. J.; KIM, S. C.; LEE, S. J.; LEE, J.; PARK, J. H.; YU, K. S.; LIM, J.; KWON, S. W. Investigating the different mechanisms of genotoxic and non-genotoxic carcinogens by a gene set analysis. **Plos One**, v. 9, n. 1, e86700, 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

LIBRALATO, G.; PRATO, E.; MIGLIORE, L.; CICERO, A. M.; MANFRA, L. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. **Ecological Indicators**, v. 69, p. 35-49, 2016.

LIU, B. H.; YU, F. Y.; WU, T. S.; LI, S. Y.; SU, M. C.; WANG, M. C.; SHIH, S. M. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to

mycotoxins, patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, n. 3, p. 255–263, 2003.

LIU, S.; SU, M.; SONG, S. J.; JUNG, J. H. Marine-derived *Penicillium* species as producers of cytotoxic metabolites. **Marine Drugs**, v. 15, n. 329, md15100329, 2017.

LIU, Y. F.; ZHONG, R.; CAO, F.; WANG, C.; WANG, C. Y. Citrinin derivatives and unusual C25 steroids from a sponge-derived *Penicillium* sp. Fungus. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n. 3, p. 548-551, 2016.

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.

LU, S.; SHEN, K.; YAOLIN, W.; SANTER, S. T.; CHEN, J.; BROOKS, S. C.; WANG, Y. A. Atm-haploinsufficiency enhances susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 4, p. 848-855, 2006.

LU, Z. Y.; LIN, Z. J.; WANG, W. L.; DU, L.; ZHU, T. J.; FANG, Y. C.; GU, Q. Q.; ZHU, W. M. Citrinin dimers from the halotolerant fungus *Penicillium citrinum* B-57. **Journal Natural Products**, v. 71, n. 4, p. 543–546, 2008.

LYMAN, G. H.; DALE, D. C.; TOMITA, D.; WHITTAKER, S.; CRAWFORD, J. A retrospective evaluation of chemotherapy dose intensity and supportive care for early-stage breast cancer in a curative setting. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 139, n. 3, p. 863-872, 2013.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas Mediciniais: A necessidade de estudos interdisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAJIDINIA, M.; YOUSEFI, B. Breast tumor stroma: A driving force in the development of resistance to therapies. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 89, n. 3, p. 309-318, 2017A.

MAJIDINIA, M.; YOUSEFI, B. DNA repair and damage pathways in breast cancer development and therapy. **DNA Repair**, v. 54, n. 1, pp. 22-29, 2017B.

MARSH, S.; LIU, G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 381-387, 2009.

MÁTÉ, G.; GAZDAG, Z.; MIKE, N.; PAPP, G.; PÓCSI, I.; PESTI, M. Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Toxicon**, v. 90, p. 155-166, 2014.

MAZUMDER, P. M.; MAZUMDER, R.; MAZUMDER, A.; SASMAL, D.S. Antimicrobial activity of the mycotoxin citrinin obtained from the fungus *Penicillium citrinum*. **Ancient Science of Life**, v. XXI, n. 3, p. 191–197, 2002.

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, p. 1-14, 2014.

MCLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey PM, Harbone JB (ed.) *Methods in Plant Biochemistry*. New York: Academic Press, p. 1-32, 1991.

MEDINA, D.; KITTRELL, F. Stroma is not a major in DMBA-mediated tumorigenesis of mouse mammary preneoplasia. **Journal of Cell Sciences**, v. 118, p. 123-127, 2004.

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.

MERTENS, F.; ANTONESCU, C. R.; HOHENBERGER, P.; LADANYI, M.; MODENA, P.; D'INCALCI, M.; CASALI, P. G.; AGLIETTA, M.; ALVEGÅRD, T. Translocation-related sarcomas. **Seminars in Oncology**, v. 36, n. 4, p. 312-323, 2009.

MEYER, B. N.; FERRINGNI, N. R.; PUAM, J. E.; LACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L.; Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. **Science**, v. 123, n. 3194, p. 464-468, 1956.

MILTENBURG, M. H. V.; JONKERS, J. Using genetically engineered mouse models to validate candidate cancer genes and test new therapeutic approaches. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 22, n. 1, p. 21-27, 2012.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, p. 185-229, 2004.

MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MERTENS, F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 233-245, 2007.

MORAES, G. P.; ALENCAR, M. V. O. B.; ISLAM, M. T.; ARAÚJO, L. S.; SOBRAL, A. L. 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: Toxicology and Therapeutics**, v. 9, n. 96, doi: 10.3823/1967, 2016.

MÜLLER, C. R.; PAULSEN, E. B.; NOORDHUIS, P.; PEDEUTOUR, F.; SAETER, G.; MYKLEBOST, O. Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin-3A. **International Journal of Cancer**, v.121, n. 1, p. 199-205, 2007.

NEJATI, P.; NOSRATI, A. C.; BAYAT, M.; AZAR, O. L. An investigation on measurement means of Citrinin toxin quantity by toxigenic *Aspergillus* species in biomass, using ELISA. **International Journal Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 2, p. 2466–2471, 2014.

- NIKLAS, J.; SCHNEIDER, K.; HEINZLE, E. Metabolic flux analysis in eukaryotes. **Current Opinion in Biotechnology**. V. 21, n. 1, p. 63-69, 2010.
- NIKOLOVA, T.; MARINI, F.; KAINA, B. Genotoxicity testing: Comparison of the γ H2AX focus assay with the alkaline and neutral comet assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 822, p. 10-18, 2017.
- NONG, X. H.; ZHENG, Z. H.; ZHANG, X. Y.; LU, X. H.; QI, S. H. Polyketides from a marine-derived fungus *Xylariaceae* sp. **Marine Drugs**, v. 11, n. 5, p. 1718-1727, 2013.
- NORPPA, H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. **Toxicology Letters**, v. 149, p. 309-334, 2004.
- OLIVEIRA, A. L. L.; FELÍCIO, R.; DEBONSI, H. M. Marine natural products: Chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 4, p. 906-920, 2012.
- OSSOWSKI, S. SCHNEEBERGER, K.; LUCAS-LLEDÓ, J. I.; WARTHMAN, N.; CLARK, R. M.; SHAW, R. G.; WEIGEL, D.; LYNCH, M. The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. **Science**, v. 327, n. 5961, p. 92-94, 2010.
- OZDEMIR, I. SELAMOGLU, Z.; ATEŞ, B.; GOK, Y.; YILMAZ, I. Modulation of DMBA-induced biochemical changes by organoselenium compounds in blood of rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 44, p. 257-259, 2007.
- PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 439-445, 2010.
- PASTRE, R.; MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L.; PEREIRA, J. O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007.
- PATTERSON, G. M. L.; LARSEN, L. K.; MOORE, R. E. Bioactive natural products from blue-green algae. **Journal of Applied Phycology**. V. 6, n. 2, p. 151-157, 1994.
- PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B.; The emerging hallmarks of cancer metabolism. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27-47, 2016.
- PAZ, M. F. C. J.; ALENCAR, M. V. O. B.; GOMES JUNIOR, A. L.; MACHADO, K. C.; ISLAM, M. T.; ALI, E. S.; SHILL, M. C.; AHMED, M. I.; UDDIN, S. J.; MATA, A. M. O. F.; CARVALHO, R. M.; MACHADO, K. C.; SOBRAL, A. L. P.; SILVA, F. C. C.; SOUZA, J. M. C.; ARCANJO, D. D. R.; FERREIRA, P. M. P.; MISHRA, S. K.; SILVA, J.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. Correlations between risk factors for breast cancer and genetic instability in cancer patients – A clinical perspective study. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. 236, 2018.
- PHELPS, M.; CHEN, E. Zebrafish Rhabdomyosarcoma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 916, n. 1, p. 371-389, 2016.
- PIMENTA, E. F.; VITA-MARQUES, A. M.; TININIS, A.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; WILLIAMS, D. E.; PATRICK, B. O.; DALISAY, D. S.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S. Use of experimental design for the

optimization of the production of new secondary metabolites by two *Penicillium species*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 11, p. 1821–1832, 2012.

PISTRITTO, G.; TRISCIUOGLIO, D.; CECI, C.; GARUFI, A.; D’ORAZI, G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Impact Journal on Aging**, v. 8, n. 4, p. 603-619, 2016.

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer. Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, n. 4, p. 1124-1149, 2008.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual Review Phytopathology**, v. 49, p. 291–315, 2011.

POST, S. M. Mouse models of sarcoma: Critical tools in our understanding of the pathobiology. **Clinical Sarcoma Research**, v. 2, n. 20, 2012.

POURRUT, B.; PINELLI, E.; MENDIOLA, V. C.; SILVESTRE, J.; DOUAY, F. Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. **Mutagenesis**, v. 30, p. 37-43, 2015.

RABHA, J.; JHA, D. K. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Penicillium* System Properties and Applications. *Chapter 12: Metabolic diversity of Penicillium*. **Elsevier**, p. 217-234, 2018.

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: An ecological perspective. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 19-35, 2008.

RAMADOSS, C. S.; MUKHERJEE, A. *In vitro* inhibition of bovine liver glutamate dehydrogenase by citrinin, a mycotoxin. **The Journal of Antibiotics**, v. 30, p. 172-174, 1977.

RAMOS, A. A.; PRATA-SENA, M.; CASTRO-CARVALHO, B.; DETHOUP, T.; BUTTACHON, S.; KIJJOA, A.; ROCHA, E. Potential of four marine-derived fungi extracts as anti-proliferative and cell death-inducing agentes in seven human cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 10, p. 798-806, 2015.

REEN, F.; GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J.; DOBSON, A.; ADAMS, C.; O’GARA, F. Emerging concepts promising new horizons for marine biodiscovery and synthetic biology. **Marine Drugs**, v. 13, p. 294-2954, 2015.

ROMANO, G.; CONSTANTINI, M.; SANSONE, C.; LAURITANO, C.; RUOCCO, N.; IANORA, A. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Marine Environmental Research**, v. 128, p. 58-59, 2017.

ROWLEY, D. C.; KELLY, S.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Halovirs A-E, new antiviral agentes from a marine-derived fungus of the genus *Scytalidium*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 4263-4274, 2003.

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.

RUIZ, A. L. T. G.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.

Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 98-102, 2005.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Experimentally induced mammary tumors in rats. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 39, p. 7-20, 1996.

SAGATOVA, A. A.; KENIYA, M. V.; TYNDALL, J. D. A.; MONK, B. C. Impacto f homologous resistance mutations from pathogenic yeast on *Saccharomyces cerevisiae* Lanosterol 14 α -Demethylase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 3, e002242-17, 2018.

SALEHI, B.; ZUCCA, P.; SHARIFI-RAD, M.; PEZZANI, R.; RAJABI, S.; SETZER, W. N.; VARONI, E.M.; IRITI, M.; KOBARFARD, F.; SHARIFI-RAD, J. Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis. **Phytotherapy Research, In Press**, 2018.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; PEÑARROJA-FLORES, R.; TOLEDO-GARCÍA, J.; BRAVO, J. L.; DEL CASTILLO, E. R.; BRIBIESCA, L. B. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutation Research**, v. 640, n. 1-2, p. 8-15, 2008.

SANNA, V.; PALA, N.; DESSI, G.; MANCONI, P.; DEDOLA, S.; RASSU, M.; CROSIO, C.; LACCARINO, C.; SECHI, M. Single-step green synthesis and characterization of gold-conjugated polyphenol nanoparticles with antioxidant and biological activities, **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 4935–4951, 2014.

SANTOS, C. L.; POURRUT, B.; OLIVEIRA, J. M. F. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 216, doi: 10.3389/fgene.2015.00216, 2015.

SASAKI, M.; TSUDA, M.; SEKIGUCHI, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Perinadine A, a novel tetracyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Organic Letters**, v. 7, n. 19, p. 4261-4264, 2005.

SAVAGE, J. R. A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v. 207, p. 33-36, 1988.

SHI, Y. C., PAN, T. M. Red mold, diabetes, and oxidative stress: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 47-55, 2012.

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, p. 116-135, 2015.

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, p. 41-47, 2013.

SILVA, A. A.; CARLOTTO, J.; ROTTA, I. Padronização da ordem de infusão de medicamentos antineoplásicos utilizados no tratamento dos cânceres de mama e colorretal. **Einstein**, v. 16, n. 2, p. 1-19, eRW4074, 2018.

- SILVA, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. c. 107. p.1055-1070, 2006.
- SINGH, B.; SHARMA, D. K.; KUMAR, R.; GUPTA, A. Controlled release of the fungicide thiram from starch-alginath-clay based formulation. **Applied Clay Science**, v. 1, n. 2, p. 76-82, 2009.
- 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. 184-191, 1988.
- SINN, H. P.; KREIPE, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Inssues and Updates from the 3rd Edition. **Breast Care**, v. 8, p. 149-154, 2013.
- SKONECZNA, A.; KANIAK, A.; SKONECZNY, M. Genetic instability in budding and fission yeast-sources and mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 917-967, 2015.
- SLATTERY, M. L.; MULLANY, L. E.; SAKODA, L. C.; WOLFF, R. K.; SAMOWITZ, W. S.; HERRICK, J. S. Dysregulated genes and miRNAs in the apoptosis pathway in colorectal cancer patients. **Apoptosis**, v. 23, n. 3-4, p. 237-250, 2018.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. *Saccharomyces cerevisiae* as a biological model to evaluate the antioxidante capacity of compounds. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 85, n. 2, p. 45-47, 2004.
- SOLIMAN, S. S. M.; TROBACHER, C. P.; TSAO, R.; GREENWOOD, J. S.; RAIZADA, M. N. A fungal endophyte induces transcription of genes encoding a redundant fungicide pathway in its host plant. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 93, 2013.
- STEEN, S.; STEPHENSON, G. Current treatment of soft tissue sarcoma. **Archive of Proceedings**, v. 21, n. 4, p. 392-396, 2008.
- STEINSTRAEßER, L.; HAUKE, J.; AL-BENNA, S.; LANGER, S.; RING, A.; KESTING, M.; SUDHOFF, H.; BECERIKLI, M.; KÄFFERLEIN, H.; JACOBSEN, F. Genotoxic and cytotoxic activity of host defense peptides against human soft tissue sarcoma in na *in vitro* model. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 96-103, 2012.
- STEWART, M. K. G.; BECHBERGER, J. F.; WELCH, I.; NAUS, C. C.; LAIRD, D. W. Cx26 knock-out predisposes the mammary gland to primary mammary tumors in a DMBA-induced mouse model of breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 35, p. 37185-37199, 2015.
- STORNETTA, A.; ZIMMERMANN, M.; CIMINO, G. D.; HENDERSON, P. T.; STURLA, S. J. DNA from anticâncer drugs as candidate predictive markers for precision medicine. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, p. 388-409, 2017.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- SU, Z.; YANG, Z.; XU, Y.; CHEN, Y.; YU, Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 48, 2015.

SUDHAKAR, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. **Journal of Cancer Sciencer and Therapy**, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2009

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, p. 219-233, 1994.

SWARTZ, M. A.; LIDA, N.; ROBERTS, E. W.; SANGALETTI, S.; WONG, M. H.; YULL, F. E.; COUSSENS, L. M.; DeCLERCK, Y. A. Tumor microenvironment complexity: Emerging roles in cancer therapy. **Cancer Research**, v. 72, n. 10, p. 2473-2480, 2012.

SZKANDER, J.; GERGER, A.; LIEGI-ATZWANGER, B.; ABSENGER, G.; STOTZ, M.; FRIESENBICHLER, J.; TRAJANOSKI, E.; STOJAKOVIC, T.; EBERHARD, K.; LEITHNER, A.; PICHLER, M. The lymphocyte/monocyte ratio predicts poor clinical outcome and improves the predictive accuracy in patients with soft tissue sarcomas. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 2, p. 362-370, 2014.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR Centennial Series: The Biology of cancer historical perspective. **Cancer Research**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, 2010.

TAME, M. A.; MANJÓN, A. G.; BELOKHOVOSTOVA, D.; RAAIJMAKERS, J. A.; MEDEMA, R. H. TUBB3 overexpression has a negligible effect on the sensitivity to taxol in cultured cell lines. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 71536-71547, 2017.

TAYLOR, B.S.; BARRETINA, J.; MAKI, R.G.; ANTONESCU, C.R.; SINGER, S.; LADANYI, M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 8, p. 541-557, 2011.

TELES, K. A.; MEDEIROS-SOUZA, P.; LIMA, F. A. C.; ARAÚJO, B. G.; LIMA, R. A. C. Review article Cyclophosphamide administration routine in autoimmune rheumatic diseases: a review. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 6, p. 596-604, 2016.

THACKER, H. L.; CARLTON, W. W.; SANSING, G. A. Citrinin mycotoxicosis in the Guinea-Pig. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 15, p. 553-561, 1977.

TOUSSAINT, M.; LEVASSEUR, G. GERVAIS-BIRD, J.; WELLINGER, R.J.; ELELA, S.A.; CONCONI, A. A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures. **Mutation Research**, v. 606, n. 1-2, p. 92-105, 2006.

TRIVEDI, A. B.; DOI, E.; KITABATAKE, N. Toxic compounds formed on prolonged of citrinin under watery conditions. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 229-232, 1993.

TRIVEDI, A. B.; HIROTA, M.; DOI, E.; KITABATAKE, N. Formation of a new toxic compound, Citrinin H1, from citrinin on mild heating in water. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 0, n. 18, p. 2167-2171, p. 1993.

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, p. 11-22, 2011.

- TSUDA, M.; KASAI, Y.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Organic Letters**, v. 6, n. 18, p. 3087-3089, 2004.
- VAN MUIJEN, G. N.; JANSEN, K. F.; CORNELISSEN, I. M.; SMEETS, D. F.; BECK, J. L.; RUITER, D. J. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. **International Journal of Cancer**, v. 48, n. 1, p. 85-91, 1991.
- VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.
- VON MINCKWITZ, G. Neoadjuvant Therapy: What are the Lessons so far? **Hematology Oncology Clinic**, v. 27, n.4, p. 767-784, 2013.
- VOROBIOF, D. A.; RAPOPORT, B. L.; CHASEN, M. R.; SLABBER, C.; MCMICHAEL, G.; EEK, R.; MOHAMMED, C. FIRST line therapy with paclitaxel (Taxol) and pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in patients with metastatic breast cancer: a multicentre phase II study. **The Breast**, v. 13, n. 3, p. 219-226, 2004.
- VRIENS, B. E.; AARTS, M. J.; DE VRIES, B.; VAN GASTEL, S. M.; WALSH, J.; SMILDE, T. J.; VAN WARMERDAM, L. J. C.; BOER, M.; VAN SPRONSEN, D. J.; BORM, G. F.; TJAN-HEIJNEN, V. C. G. Doxorubicin/cyclophosphamide with concurrent versus sequential docetaxel as neoadjuvant treatment in patients with breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 49, p. 3102-3110, 2013.
- VRIENS, B. E.; AARTS, M. J.; DE VRIES, B.; VAN GASTEL, S. M.; WALSH, J.; SMILDE, T. J.; VAN WARMERAM, L. J. C.; BOER, M.; VAN SPRONSEN, D. J.; BORM, G. F.; TJAN-HEIJNEN, V. C. G. Doxorubicin/cyclophosphamide with concurrent versus sequential docetaxel as neoadjuvant treatment in patients with breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 15, p. 3102-3110, 2013.
- WAKANA, D.; HOSEO, T.; ITABASHI, T.; OKADA, K.; TAKAKI, G. M. C.; YAGUCHI, T.; FUKUSHIMA, K.; KAWAI, K. I. New citrinin derivatives isolated from *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 60, p. 279-284, 2006.
- WANG, M. L.; LU, C. H.; XU, Q. Y.; SONG, S. Y.; HU, Z. Y.; ZHENG, Z. H. Four new citrinin derivatives from a marine-derived *Penicillium* sp fungal strain. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5723-5735, 2013.
- WIJNHOFEN, S. W. P.; ZWART, E.; SPEKSNIJDER, E. N.; BEEMS, R. B.; OLIVE, K. P.; TUVESON, D. A.; JONKERS, J.; SCHAAP, M. M.; BERG, J.; JACKS, T.; STEEG, H.; VRIES, A. Mice expressing a mammary gland-specific R270H mutation in p53 tumor suppressor gene mimic human breast cancer development. **Cancer Research**, v. 65, n. 18, p. 8166-8173, 2005.
- WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental and Clinical Cancer**, v. 30, n. 87, 2011.

- WOO, J. T.; ONO, H.; TSUJI, T. Cathestatins, new cysteine protease inhibitors produced by *Penicillium citrinum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 2, p. 350-352, 1994, Published online: 12 jun 2014.
- WU, S.; HANNUN, Y. The importance of extrinsic factors in the development of cancers. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 3, n. 3, p. 1-3, 2016.
- XIAO, J.; ZHANG, Q.; GAO, Y. Q.; TANG, J. J.; ZHANG, A. L.; GAO, J. M. Secondary metabolites from the endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3584–3590, 2014.
- XU, B. J.; JIA, X. Q.; GU, L. J.; SUNG, C. K. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**, v. 17, p. 271–285, 2006.
- YADAV, A. N.; VERMA, P.; KUMAR, V.; SANGWAN, P.; MISHRA, S.; PANJIAR, N.; GUPTA, V. K.; SAXENA, A. K. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Penicillium* system Properties and Applications. Chapter 1: biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats**. Elsevier, p. 3-18, 2018.
- YAN, J. F.; BROUGHTON, S. J.; YANG, S. L.; GANGE, A. C. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? **Fungal Ecology**, v. 3, p. 53-59, 2015.
- YANG, C. S.; WANG, X.; LU, G.; PICINICH, S. C. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 429-439, 2009.
- YAO, G.; SEBISUBI, F. M.; VOO, L. Y. C.; HO, C. C.; TAN, G. T.; CHANG, L. C. Citrinin derivatives from the soil filamentous fungus *Penicillium* sp. H9318. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1125-1129, 2011.
- YI, R.; QI, Y. C.; ZHAO, X.; PARK, K. Y. Anti-tumor activities of bamboo salt on sarcoma 180 tumor-bearing BALB/c mice. **Biomedical Research**, v. 28, n. 9, p. 4043-4048, 2017.
- YILDIZ, M.; CİĞERCI, I. H.; KONUK, M.; FIDAN, A. F. TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulfate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 934-938, 2009.
- YIN, H.; ZHAO, Q.; SUN, F. M.; AN, T. Gentiopicroin-producing endophytic fungus isolated from *Gentiana macrophylla*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 8, p. 793-797, 2009.
- YONEYAMA, M.; SHARMA, R. P.; KLEINSCHUSTER, S. J. Cytotoxicity of citrinin in cultured kidney epithelial cell systems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 11, p. 100–111, 1986.
- YU, G.; WANG, S.; WANG, L.; CHE, Q.; ZHU, T.; ZHANG, G.; GU, Q.; GUO, P.; LI, D. Lipid-Lowering polyketides from the fungus *Penicillium steckii* HDN13-279. **Marine Drugs**, v. 16, n. 25, p. 1-13, 2018.
- YURCHENKO, A. N.; SMETANINA, O. F.; KALINOVSKII, A. I.; KIRICHUK, N. N.; YURCHENKO, E. A.; AFIYATULLOV, S. S. Biologically active metabolites of the

facultative marine fungus *Penicillium citrinum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 6, p. 996-998, 2013.

ZHANG, J.; ZHANG, F.; NIU, R. Functions of Shp2 in cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 9, p. 2075-2083, 2015.

ZHAO, J. A.; CHEN, J. J.; JU, Y. C.; WU, J. H.; GENG, C. Z.; YANG, H. C. The effect of childbirth on carcinogenesis of DMBA-induced breast cancer in female SD rats. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 11, p. 779-758, 2011.

ZHENG, Y. K.; QIAO, X. G.; MIAO, C. P.; LIU, K.; CHEN, Y. W.; XU, L. H.; ZHAO, L. X. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals Microbiology**, v. 66, p. 529-542, 2016.

ZHURAVLEVA, O. I.; AFİYATULLOV, S. S.; DENISENKO, V. A.; ERMAKOVA, S. P.; SLINKINA, N. N.; DMITRENOV, P. S.; KIM, N. Y. Secondary metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus carneus* Blochwitz. **Phytochemistry**, v. 80, p. 123-131, 2012.

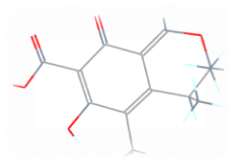
ZIMMERMAN, N. B.; VITOUSEK, P. M. Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 32, p. 13022–13027, 2012.

ZOCHER, R.; WECKWERTH, W.; HACKER, C.; KAMMER, B.; HORNBOGEN, 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, p. 16-20, 1996.

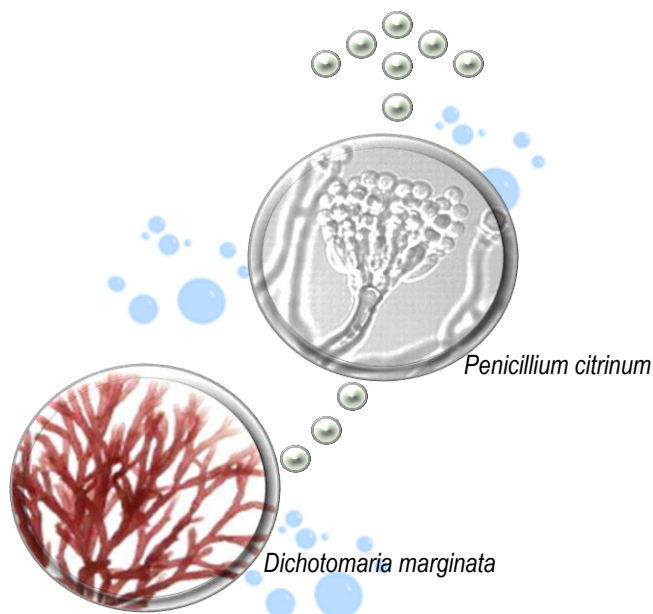
Capítulo 1

Uma revisão abrangente sobre as propriedades biológicas da Citrinina

Investigar o atual status sobre citrinina, metabólito majoritário do extrato acetoneitrila do *Penicillium citrinum*, com base nas atividades biológicas e aplicações biomédicas



Citrinina



Penicillium citrinum

Dichotomaria marginata

OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

Uma revisão abrangente sobre as propriedades biológicas da Citrinina

José Williams Gomes de Oliveira Filho, Muhammad Torequl Islam, Eunus S. Ali, Shaikh Jamal Uddin, Jose Victor de Oliveira Santos, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Antonio Luiz Gomes Júnior, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Maria dos Remédios Mendes de Brito, João Marcelo de Castro e Sousa, Subrata Shaw, Maria das Graças Freire de Medeiros, Sandra Maria Mendes de Moura Dantas, Hercília Maria Lins Rolim, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, Mohammad Amjad Kamal, Magdalena D. Pieczynska, Niranjana Das, Vijai K. Gupta, Andrei Mocan, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Brahma Nand Singh, Siddhartha K. Mishra, Atanas G. Atanasov, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante

Artigo aceito no periódico *Food and Chemical Toxicology* (ANEXO A)

QUALIS A2 – Biotecnologia

Resumo

Citrinina é uma micotoxina que causa contaminação no alimento e está associada a diferentes efeitos tóxicos. Uma pesquisa na web, sobre citrinina, foi realizada envolvendo o período de 1946 a 2017. Os dados coletados indicam que citrinina é produzida por várias linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Monascus*, e geralmente é encontrada junto com outra micotoxina nefrotóxica, a Ocratoxina A. Embora seja evidente que a exposição à citrinina pode exercer efeitos tóxicos sobre o coração, fígado, rim, bem como no sistema reprodutor, o mecanismo de toxicidade induzida por esta micotoxina continua a ser bastante evasivo. Os efeitos genotóxicos e mutagênicos provocados pela citrinina ainda são controversos. Até agora, o efeito tóxico induzido pela citrinina, foi associado ao estresse oxidativo, relacionado à disfunção mitocondrial em sistemas biológicos. No entanto, a toxicidade depende fortemente de sua concentração, rota, frequência e tempo de exposição, bem como dos sistemas de testes usados. Além dos efeitos tóxicos, citrinina também possui um amplo espectro de bioatividades, incluindo atividade antibacteriana, antifúngica e potenciais efeitos anticancerígenos, além de neuroprotetores *in vitro*. Esta revisão sistemática apresenta o estado atual dos estudos sobre citrinina, com ênfase em seu perfil de bioatividade.

Palavras-chave: Micotoxinas. Citrinina. Toxicidade. Genotoxicidade. Anticâncer.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais e seus efeitos benéficos são de importância fundamental para prevenção e tratamento de doenças humanas (ATANASOV et al., 2015; HUSSEIN; BRASEL, 2001). Muitos estudos importantes comprovaram seu profundo impacto na saúde humana, nas últimas décadas (HUSSEIN; BRASEL, 2001; FLAJS; PERAICA, 2009; DeCORTE, 2016). Contudo, os produtos naturais, às vezes, também exibem efeitos tóxicos perigosos. Micotoxinas são toxinas naturais produzidas como metabólitos secundários por muitos fungos, particularmente pelas espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, que muitas vezes apresentam propriedades carcinogênicas e representam um importante grupo de contaminantes em alimentos (SULAIMAN et al., 2007). Muitas ervas são utilizadas mundialmente para fins medicinais e culinários (VOGL et al., 2013; BOWER et al., 2016), podendo sua importância econômica e culinária ser facilmente prejudicada pela contaminação por micotoxinas (KABAK; DOBSON, 2017). As micotoxinas possuem diversos mecanismos de toxicidade, o que permite que as mesmas sejam amplamente utilizadas como potentes agentes antitumorais (BOPPANA et al., 2017).

Citrinina (CIT) é uma micotoxina do grupo dos policetídeos, produzida por várias espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Monascus* (KOVÁČ et al., 1961). Outras espécies de *Penicillium* (*P. expansum* e *P. viridicatum*), e mesmo de *Aspergillus* (*A. niveus* e *A. terreus*), foram posteriormente confirmados como produtoras de CIT (JHA, 2016; SAMSON et al., 2014). CIT é obtida a partir dos grãos das plantas colhidas, sob condições típicas de armazenamento (ABRAMSON et al., 2005). Outras fontes de CIT incluem feijão, frutas, sucos de frutas e vegetais, ervas e especiarias, produtos lácteos estragados (EFSA - Painel de Contaminantes na Cadeia Alimentar (CONTAM), 2012), além de representar um contaminante no arroz de mofo vermelho, usado como conservante de alimentos e corante em alimentos asiáticos (FINK-GREMMELS et al., 1991).

Embora CIT seja conhecida principalmente por suas propriedades tóxicas (FLAJS; PERAICA, 2009), há uma crescente evidência de apoio a outros fatores biológicos e atividades desta micotoxina, especialmente anticancerígena (CHANG et al., 2009) e neuroprotetora (NAKAJIMA et al., 2016). Isso está provocando um interesse em pesquisa contínua deste produto natural. Dese modo, esta revisão tem por objetivo resumir o status atual do conhecimento relacionado à CIT, com foco nas bioatividades relatadas e potenciais aplicações biomédicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estratégias da pesquisa

Uma pesquisa abrangente na literatura sobre CIT foi realizada, cobrindo o período de tempo de 1946 a 2017, usando várias plataformas de banco de dados, como *PubMed*, *Science Direct*, *Scopus*, *Web of Science* e *Google Acadêmico*, com o termo ‘citrinina’ associado com ‘fonte’, ‘síntese’, ‘propriedades físico-químicas’, ‘atividade biológica/farmacológica’, ‘toxicidade’, ‘toxicidade orgânica’, ‘citotoxicidade’, ‘antioxidante’, ‘stress oxidativo’, ‘carcinogenicidade’, ‘genotoxicidade’ e ‘mutagenicidade’.

2.1.1 Critérios de inclusão:

01. Estudos realizados *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, com ou sem animais experimentais, incluindo estudos em humanos ou trabalhos utilizando tecidos, células.
02. Estudos com CIT e seus derivados aplicados isoladamente ou em combinação com outras substâncias.
03. Estudos com ou sem mecanismos de atividade explicados.

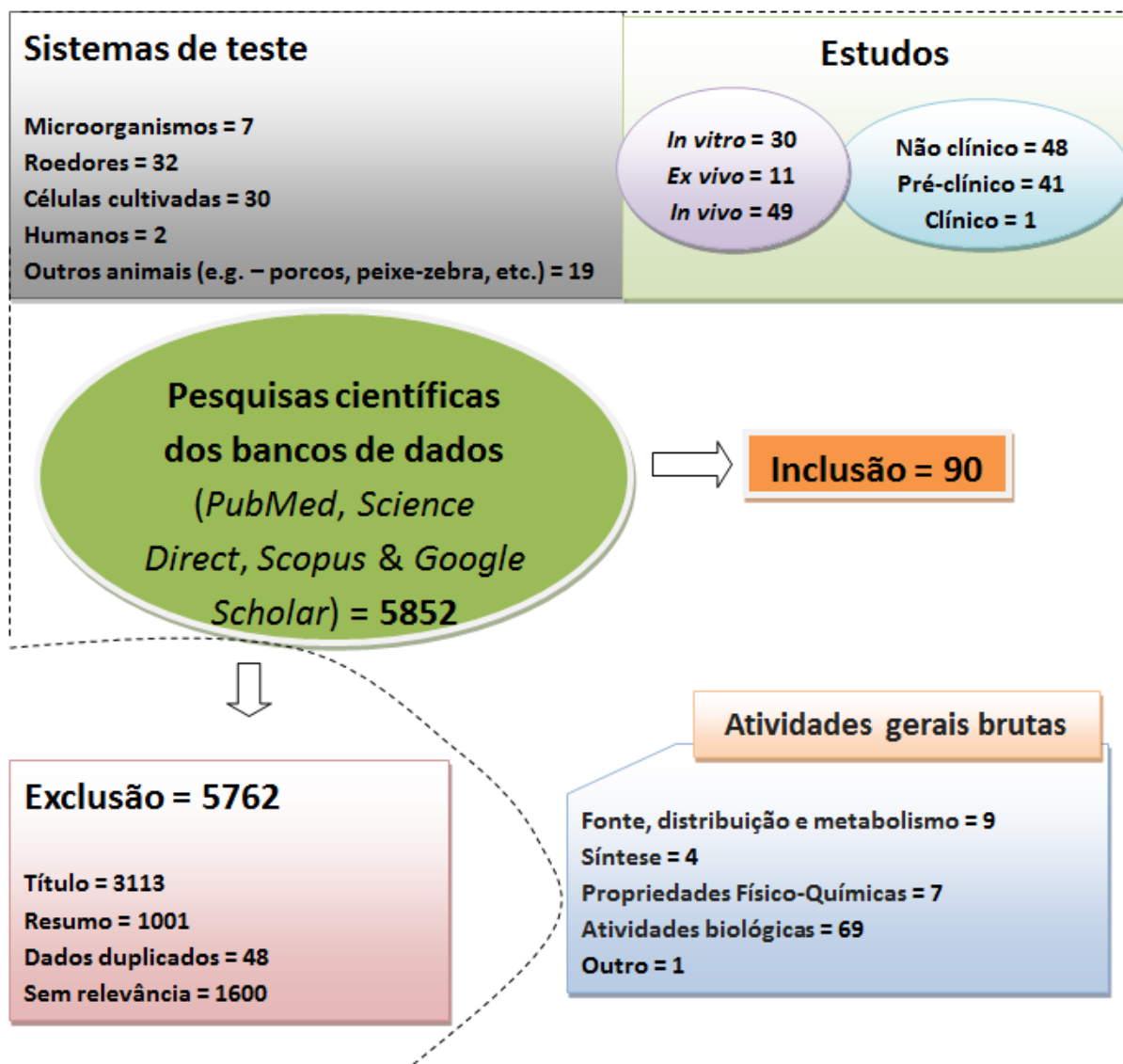
2.1.2 Critérios de exclusão:

01. Estudos sobre outras micotoxinas.
02. Artigo duplicados; títulos ou resumos que não atendem aos critérios de inclusão.
03. Estudos de CIT não cobertos pelo tópico da revisão.

Os artigos foram avaliados quanto à informação relacionada à dose ou concentração, via de administração, sistema de teste, resultados e discussão, conclusão e mecanismo de ação sugerido. A pesquisa, nas bases de dados de artigos relacionados à CIT, revelou 5.852 registros, com 90 estudos preenchendo os critérios de inclusão. Quanto à exclusão (n = 5.762) incluímos: ausência do termo CIT mencionando no título ou no resumo, duplicação de informações e a não relevância do estudo (3.113, 1.001, 48 e 1.600 estudos excluídos, respectivamente). As etapas

gerais da pesquisa de dados, os critérios de exclusão-inclusão e outras informações relevantes são apresentadas na **Figura 1**.

Figura 1. Fluxo da pesquisa nas bases de dados, inclusão e exclusão de artigos.



3. RESULTADOS

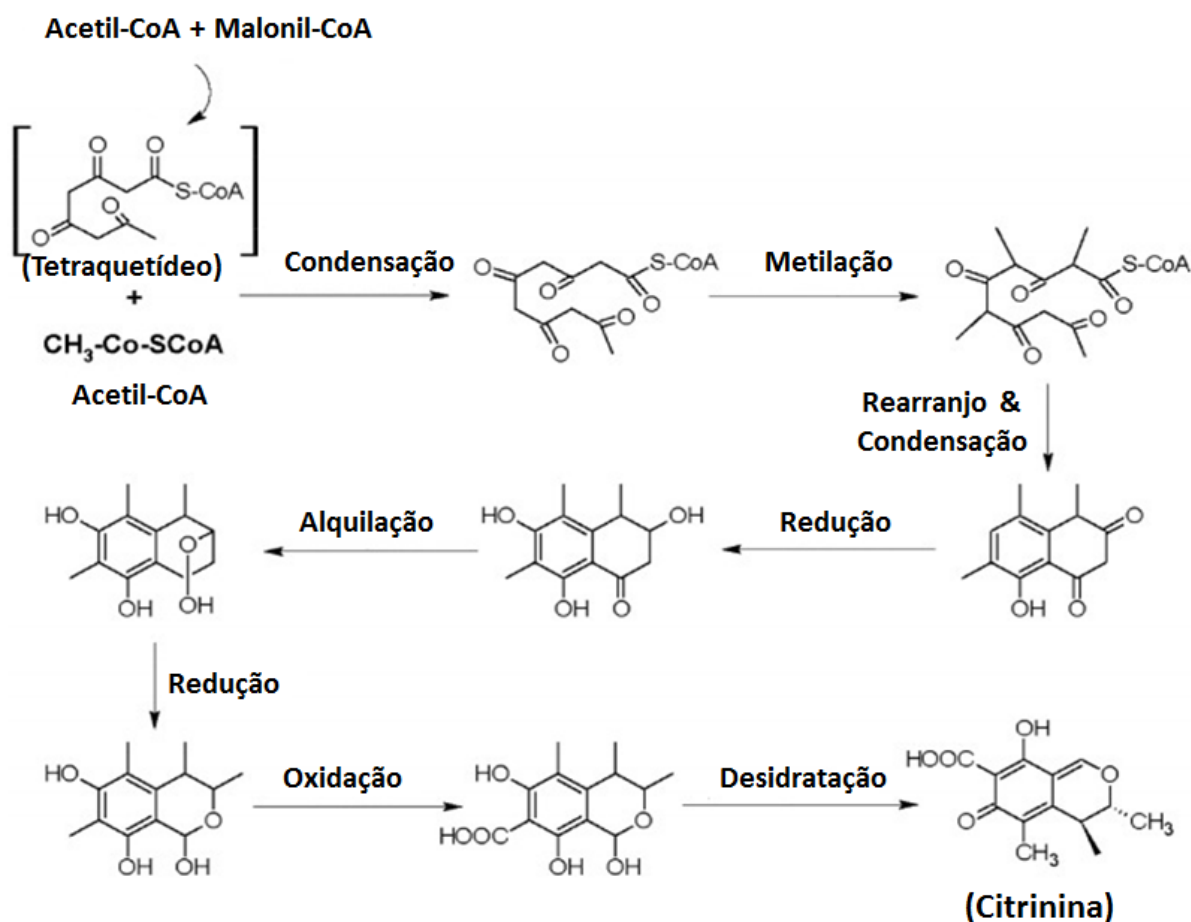
3.1 Fonte, distribuição e metabolismo da CIT

A micotoxina CIT, foi isolada pela primeira vez do *Penicillium citrinum* em 1831 por dois pesquisadores, Hetherington e Raistrick. Desde então, CIT foi encontrada repetidamente em fungos do gênero *Penicillium* e *Monascus* (por exemplo, *M. purpureus*, *M. ruber*), além de outros gêneros de fungos que desempenham um papel importante na contaminação de alimentos

3.2 Biossíntese e síntese laboratorial da CIT

A biossíntese da CIT depende fortemente das espécies de fungos que se multiplicam na amostra, em vez do pigmento produzido por essas linhagens fúngicas (**Figuras 2 e 3**). A CIT pode se originar de um tetraquetídeo em vez de um pentaquetídeo, nas espécies de *A. terreus* e *P. citrinum*. As enzimas envolvidas em seu processo de biossíntese têm mecanismos independentes de regulação gênica. A frequência respiratória e morfologia das hifas funcionam como fatores essenciais para afetar a produção da micotoxina CIT (PISAREVA et al., 2005; SRIANTA et al., 2014).

Figura 3. Biossíntese de citrinina (CIT) via tetraketide-acetil-CoA em *M. Ruber*.



Fonte: Adaptado de HAJJAJ et al. (1999).

A CIT é um produto natural e pode ser obtido por extração de suas fontes naturais, como fungos produtores dessa micotoxina e alimentos contaminados (BENNETT; KLICH, 2003).

Para a síntese laboratorial, o 3- (4,6-di-hidroxi-orto-tolil) butan-2-ol é carboxilado e submetido à reação de Gattermann (conversão do fenol para o aldeído aromático por reação com cianeto de hidrogênio/cloreto de hidrogênio na presença de um catalisador de cloreto de zinco); posteriormente, é ciclizado com ácido sulfúrico para formar CIT. A CIT é então purificada por cristalização com etanol. Alternativamente, a CIT pode ser sintetizada pela conversão da di-hidroxicitrinina em CIT, por oxidação com bromo (O'NEIL, 2001).

3.3 Propriedades físico-químicas da CIT

CIT é uma toxina sólida, em forma de agulhas, com coloração amarelo-limão e pH 4,6. Muda a cor para vermelho cereja em pH 9,9. Tem um ponto de fusão a uma temperatura de 175 a 178,5°C. A CIT é praticamente insolúvel em água fria, moderadamente solúvel em água quente, mas solúvel em hidróxido de sódio aquoso, carbonato de sódio ou acetato de sódio, bem como em solventes orgânicos polares como metanol, acetonitrila, etanol, entre outros (DESHPANDE, 2002; XU et al., 2006; NEJATI et al., 2014). CIT é um policetideo [C₁₃H₁₄O₅, IUPAC: (3R, 4S)-4,6-dihidro-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-3H-2-benzopirano-7-ácido carboxílico (**Figura 2**)], com peso molecular de 250,25 g/mol. CIT forma cristais ácidos amarelo-limão, com absorção ultravioleta (UV) máxima entre 321 e 250 nm (etanol: 222-321 nm; 3-metil pentano: 322 nm; clorofórmio: 332 nm) (HACKBART et al., 2012).

A decomposição da CIT ocorre em uma temperatura acima de 175°C sob condições secas, ou acima de 100°C na presença de água (TRIVEDI et al., 1993). CIT pode formar complexos quelados e pode ser degradada em solução ácida ou alcalina, ou por aquecimento. Estruturalmente, CIT é uma quinona com duas ligações de hidrogênio intramoleculares. Esta micotoxina cristaliza-se em uma estrutura desordenada com as formas tautoméricas *p*-quinona e *o*-quinona, em um equilíbrio dinâmico no estado sólido. Apresenta uma estrutura planar conjugada, que fornece fluorescência natural para ela; a fluorescência mais alta é produzida por uma molécula de CIT não ionizada em pH 2,5 (FRANCO et al., 1996). Em misturas de metanol ou metanol/cloreto de metileno, sofre uma reação de adição nucleofílica, que pode ser reversível (POUPKO et al., 1997). O teste de pH é um fator importante na modulação da captação, atividade antifúngica e inibitória da respiração celular induzida pela CIT. Uma forte dependência de pH foi demonstrada para *S. cerevisiae*. A dependência do pH em relação à toxicidade induzida pela CIT, pode contribuir para explicar sua atividade nefrotóxica, bem conhecida, pois a urina apresenta pH em torno de 4,5 (HARAGUCHI et al., 1987). Berndt

(1983) demonstrou que a probenecida, um antagonista específico do transporte de ânions orgânicos, reduz significativamente o acúmulo de CIT em cortes do córtex renal de ratos.

3.4 Atividade antimicrobiana

Tradicionalmente, a CIT tem demonstrado uma fraca atividade contra algumas bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, e *Micrococcus luteus* (HIROYUKI et al., 1987). CIT, em concentrações variadas (3, 5, 10, 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL), apresentou atividade antimicrobiana (halo de inibição entre 6 e 15 mm) contra *Shigella dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. boydii*, *Escherichia coli* (ROW 7/12, AM 8/98, VC Sonawave 3.37C), *Salmonella typhimurium* (ATCC 6539), *Vibrio cholerae*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus* (M1267, AM 8/98, NCTC 7447, 8531, ATCC 29737), *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereus var mycoides*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus arabinosa* e *Sarcina lutea* (MAZUMDER et al., 2002). Além disso, CIT, nas concentrações de 250, 500 ou 1000 µM, induziu efeito citotóxico em *Schizosaccharomyces pombe* (BLASKO et al., 2013).

Neste último caso, a CIT pode ter interagido com os grupos sulfidríla livres das proteínas integrais da membrana plasmática de *S. pombe*, causando fluidização da membrana, levando a uma perturbação da homeostase iônica.

3.5 Citotoxicidade e toxicologia

Um número substancial de derivados da CIT, obtidos a partir de diferentes espécies de fungos, foram identificados por exercerem efeitos citotóxicos contra diversos tipos de células (XU et al., 2013). O estudo da micotoxina CIT, em uma faixa de concentração entre 0,1 e 3,0 µM, em células do rim bovino Madin-Darby (MDBK) e em linhagem primária de rim bovino fetal (PPBK), tem demonstrado um claro efeito citotóxico, manifestando-se no alongamento, achatamento, inchaço e arredondamento das células (YONEYAMA et al., 1986). A CIT provocou graves alterações nas mitocôndrias, levando ao inchaço e morte celular em células renais de filhotes de hamsters (BHK-21) (CHAGAS et al., 1994). CIT desencadeia apoptose em osteoblastos humanos, via aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação das vias dependentes da cinase N-terminal c-Jun (JNK), caspases e proteína quinase 2 ativada por p21 (PAK2) (HUANG et al., 2008). Além disso, em células-tronco embrionárias de camundongos (ESC-B5), a CIT induziu uma série de eventos, incluindo a geração de EROs e

mitocôndrias dependentes da relação Bax/Bcl-2, perda de potencial de membrana mitocondrial, indução da liberação de citocromo *c* e ativação da caspase-3, e morte celular apoptótica (CHAN; SHIAO, 2007). CIT (0-250 μM) mostrou uma fraca inibição da proliferação celular; enquanto que a adição de ocratoxina A (0-50 μM) exerceu um efeito inibidor da viabilidade celular e expressão de Hsp-70 (proteína que protege a célula do estresse térmico) (CHAN, 2007; BOUSLIMI et al., 2008a).

CIT na faixa de 0,25–7,5 μM foi responsável por antagonizar o efeito de ativação da caspase 3, induzida por ocratoxina A (25 ou 50 nM), em células derivadas de túbulos proximais humanos (IHKE) (KNECHT et al., 2005).

Além disso, foi relatado que a CIT (0,50-4,0 mg/L) exerce uma inibição combinada e dose-dependente da proliferação de linfócitos em porcos machos castrados ($n = 6$), quando tratados com ocratoxina A, ácido ciclopiazônico, patulina, ácido penicílico e roquefortina C (BERNHOFET et al., 2004). CIT, a uma concentração de 5-35 mg/L, também provou inibir a proliferação de linfócitos (IC₅₀: 9,6 mg /L) em porcos machos castrados, norueguês, ($n = 6$) (KEBLYS et al., 2004).

CIT (0,2 a 50 $\mu\text{g/mL}$) tem sido associada à redução dos níveis de glutathiona epitelial (GSH) e fator de crescimento transformante beta 1 (TGF β 1), juntamente com a elevação dos níveis de interleucina (IL) -6 e -8, em células epiteliais alveolares humanas (A549) (JOHANNESSEN et al., 2007). Em células mesangiais glomerulares (MES-13), a CIT suprimiu a produção de óxido nítrico, induzida por lipopolissacarídeos (LPS)/interferon (IFN) - γ (NO) e pela via inibição da JAK/STAT-1 α e do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (LIU et al., 2010).

A CIT, em linhagem celular HepG2, induziu a geração de EROs, ativação de proteínas JNK, bem como ativação de caspase-9, -3 e PAK2 (CHEN; CHAN, 2009). Gayathri et al. (2015) e Ribeiro et al. (1997) também relataram um efeito citotóxico, mediada por EROs, induzida pela CIT, na mesma linha celular. Além disso, nas células HEK293 e HeLa, a CIT é propensa a desencadear atividade de caspase-3 através de receptores quinase extracelulares (ERK) -1/2 e JNK, sugerindo a morte celular apoptótica (CHANG et al., 2009). CIT em diferentes concentrações (2,5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/disco}$), demonstrou um fraco efeito citotóxico em linhagens celulares MCF-7, LNCaP, LU-1 e KB (IC₅₀ entre 65,93 e 147,85 μM / L) (YAO et al., 2011).

Kumar et al. (2014) relataram que o tratamento combinado de CIT com ocratoxina A contribuiu para uma maior morte celular por apoptose, em coelhos brancos da Nova Zelândia do que em grupos individuais. Além disso, tricitrinol B, um trímico de CIT induziu a morte

celular apoptótica em células HL60 e HCT116, muito provavelmente, pela intercalação com a enzima topoisomerase II α .

Além disso, tem sido comprovada citotoxicidade com CI 50 entre 1-10 μ M em linhagens 786-O, BxPC3, Rh30, HL60, HCT-116, BEL-7402, MKN45, SMMC-7901, PC3, HeLa, KB, MCF-7, MDA-MB-468, SKOV-3, A549, A431 e células HMEO (DU et al., 2011).

CIT foi relatada para exercer efeitos tóxicos no fígado, rim, coração e trato gastrointestinal dos animais testados (KREJCI et al., 1996; FLAJS; PERAICA, 2009), bem como tem sido associada à doença do arroz amarelo no Japão (KROGH, 1987) e às lesões no desenvolvimento de células estaminais embrionárias de camundongos (ESC-B5) (CHAN, 2007).

A DL₅₀ aguda (dose que causa a morte de 50% dos animais experimentais) da CIT depende principalmente da rota de sua administração, condições fisiológicas e espécies animais. A DL₅₀ oral da CIT para coelho tem sido relatada em uma faixa de 120-134 mg/kg, enquanto para intravenosa (i.v.) e intraperitoneal (i.p.), de 19 e 50 mg/kg, respectivamente (AMBROSE; DeEDS, 1946; HANIKA et al., 1983, 1984). Foi referido que a DL₅₀ subcutânea de CIT é de 37 mg/kg em porquinhos-da-índia (AMBROSE; DeEDS, 1946), e para patos e galinhas entre 57 e 95 mg/kg, respectivamente (MEHDI et al., 1983). Em ratos, a DL₅₀ de CIT foi relatada por atingir 50 mg/kg (p.o.) (SAKAI, 1955) e 35-58 mg/kg (i.p.), enquanto a DL₅₀ subcutânea foi de 67 mg/kg/peso corporal (AMBROSE; DeEDS, 1945; REDDY et al., 1982). Em camundongos, a DL₅₀ de CIT foi relatada por ser alta, sendo 87-105 e 62-80 mg/kg para administração oral e intraperitoneal, respectivamente (JORDON et al., 1977).

3.5.1 Mecanismo de toxicidade

Estresse oxidativo e alterações nas defesas enzimicas antioxidantes (por exemplo GSH e transhidrogenase) são as duas principais causas de efeitos tóxicos mediados pela CIT, em sistemas biológicos (RIBEIRO et al., 1997; JOHANNESSEN et al., 2007). Verificou-se que CIT aumenta a formação de EROs e estimula a produção de ânions superóxidos na cadeia respiratória. Estas bioatividades podem explicar a peroxidação lipídica observada (CHAGAS et al., 1994) e a morte celular ligada à disfunção mitocondrial (CHAGAS et al., 1995). A apoptose induzida pela CIT, em linhagem celular de leucemia promielocítica humana (HL-60) e em células renais suínas (PK15), tem sido associada com a ativação das

caspsases-3, -6, -7 e -9 (YU et al., 2006; ŠEGVIĆ KLARIĆ et al., 2012). Em vários estudos, demonstrou-se que a CIT (108, 324 e 970 ppm) induz efeitos tóxicos em diferentes tipos de células de levedura, desencadeando o processo de estresse oxidativo, associado com a regulação positiva de genes de resposta ao estresse oxidativo, AADs, FLR1, OYE3, GRE2 e MET17 (IWAHASHI et al., 2007; VANACLOIG-PEDROS et al., 2016).

Um fraco efeito genotóxico, também, foi observado em diferentes faixas de concentrações de CIT (discutidas mais detalhadamente abaixo). 25, 50 e 100 µg de CIT aplicadas em fêmeas de camundongos albinos *Swiss* (n = 5), aumentou significativamente a geração de EROs, causaram a parada do ciclo celular na fase G₀/G₁, sugerindo morte celular apoptótica (KUMAR et al., 2011). O acúmulo de EROs, induzida por CIT, e a regulação de enzimas oxidantes em testes de toxicidade aguda em *Schizosaccharomyces pombe* demonstrou 30% de acúmulo do composto a 1000 µM de CIT. A exposição de células (10⁷ ml) à CIT (1000 µM), por 60 min e pH 4,5, causou uma elevação significativa nos níveis totais de peróxidos e EROs e um aumento, de 3 vezes, na concentração de glutathiona (GSH), sem qualquer alteração nos níveis de radicais superóxido ou hidroxila (MÁTÉ et al., 2014). Contudo, tratamentos prolongados diminuíram GSH em diversos modelos de células eucarióticas, por exemplo, em células epiteliais alveolares humanas após 6 h testes agudos com 50 µg CIT. Diminuição do tempo (12-72 h) e dose-dependente (25-100 µM), no nível de GSH, também foi relatada em células da pele de roedores, após uma única exposição tópica de CIT. Tais observações, podem ser uma consequência dos processos de consumo de GSH relacionados à geração de EROs, na exposição prolongada à CIT (MÁTÉ et al., 2014).

Contudo, tratamentos prolongados diminuíram GSH em diversos modelos de células eucarióticas, por exemplo, em células epiteliais alveolares humanas, após 6 horas de testes agudos com 50 µg CIT. Diminuição do tempo (12-72 h) e dose-dependente (25-100 µM), no nível de GSH, também foi relatada em células da pele de roedores, após uma única exposição tópica de CIT. Tais observações, podem ser uma consequência dos processos de consumo de GSH, relacionados à geração de EROs, na exposição prolongada à CIT (MÁTÉ et al., 2014). Ribeiro et al. (1997) demonstraram, previamente, que a CIT é acumulada na mitocôndria de leveduras, em germinação, e a exposição à essa micotoxina resulta em disfunção da cadeia respiratória associada à inibição do complexo mitocondrial I. A disfunção mitocondrial, por inibição do complexo mitocondrial I, bloqueia a cadeia de transporte de elétrons, o que resulta no acúmulo do ânion radical-superóxido (O₂•⁻) (PELICANO et al., 2003). Na mesma linha, a exposição à CIT, por 60 min, aumentou o nível de EROs em células de hepatocarcinoma HepG2

(10-30 μM)(CHEN; CHAN, 2009) e em suspensões de células individuais da pele de roedores, a 50 μM por 12-72 h (KUMAR et al., 2011). Assim, parece que a produção de EROs, induzida por CIT, é essencial para a indução de apoptose, de modo que a ativação de fatores de transcrição, sensíveis à EROs, podem ser responsáveis pela ativação e adaptação do sistema antioxidante. Outro mecanismo que pode contribuir para a morte celular, na exposição à CIT, é um nível reduzido de GSH, devido à conjugação com patulina, e interações moleculares de patulina ou CIT, com os grupos sulfidrilas livres de proteínas integrais da membrana, causando fluidização da membrana plasmática pela modificação da estrutura 3D dessas proteínas, resultando em perturbações na membrana plasmática e vazamento de componentes celulares essenciais, incluindo K^+ (MÁTÉ et al., 2014). Os mecanismos celulares de toxicidade aguda discutidos, também, podem confirmar os efeitos tóxicos observados em testes crônicos, como a inibição de enzimas chave da síntese de colesterol (levando a uma concentração reduzida de testosterona sérica e hipocolesterolemia), modulação das funções imunológicas, indução de nefropatia, hepatotoxicidade, fetotoxicidade e formação de adenoma renal, observado em diversos exemplos de modelos animais (MÁTÉ et al., 2014).

3.6 Efeitos da CIT no sistema cardíaco, reprodutor e outros órgãos

CIT (20 ou 50 μM), em embriões de peixe-zebra, têm contribuído para a diminuição do batimento cardíaco e da taxa de fluxo sanguíneo, provavelmente através da modulação da expressão dos genes *tbx2a* e *jun B* – responsáveis por expressar os fatores de transcrição *tbx2a* e *jun B* envolvidos no controle do crescimento celular primário. Assim, os níveis aumentados de *aldh1a2* e *cspg2* – vias de regulação que controlam o desenvolvimento cardíaco –, relacionados à via do ácido retinóico, também são alvos dos micro RNA-138 (miR-138). (WU et al., 2013).

Um tratamento realizado com CIT (0,065 mg/100g, via oral), durante 60 dias, em machos e fêmeas de camundongos, resultou em alterações morfológicas, juntamente com uma diminuição significativa no peso corporal e dos órgãos. Além disso, alguns órgãos exibiram grânulos de hemossiderina. A infertilidade masculina foi detectada juntamente com uma alteração de parâmetros hematológicos (LURÁ et al., 2001). CIT, a 15 e 30 μM , tem sido responsável pelo aumento da indução de eventos apoptóticos e diminuição do número total de células em blastocistos de camundongos. Um estudo de Chan e Shiao (2007) relaciona o possível potencial teratogênico da CIT. Além disso, em ratos, CIT (2,5 e 5,0 μM) foi responsabilizada por reduzir a taxa de maturação de oócitos, fertilização e desenvolvimento

embrionário (CHAN, 2008). Em um estudo recente (QINGQING et al., 2012), CIT (0-6,25 mg/kg/dia, administração intraperitoneal) aplicada em um tratamento de sete dias, levou a várias mudanças significativas, incluindo aumento nos pesos relativos dos testículos, epidídimo, vesícula seminal, glândula prepucial, número de espermatozóides anormais, acompanhados pela diminuição do número de espermatozóides vivos, em camundongos machos da linhagem Kunming (n = 6). Além disso, uma redução na taxa de prenhez foi relatada quando as fêmeas foram acasaladas com machos expostos à CIT, sugerindo um efeito prejudicial no sistema reprodutor.

Thacker e Carlton (1977) relataram uma série de mudanças envolvendo perda de peso corporal, desidratação, anemia, danos ao fígado e nos rins – principalmente degeneração e necrose – em estudo realizado com 40 mg/kg/d de CIT (intubação gástrica), em machos e fêmeas de porquinho-da-índia com 14 dias de idade (n = 5 a 15). Por outro lado, Jordan e Carlton (1977) sugeriram que CIT, a 62 e 87 mg/kg (via oral), em camundongos fêmeas (n = 5 a 15), foi responsável por causar lesões renais, com dilatação tubular renal, ligeira a moderada necrose do epitélio tubular renal e um ligeiro aumento da atividade mitótica no epitélio tubular medular. Além disso, a CIT (33,5 ou 77 mg/kg/dia, administrada por sete dias) tem sido relatada como indutora de alterações renais, com degeneração tubular moderada e necrose, e regeneração tubular em coelhos (n = 6) (HANIKA et al., 1983).

Jordan et al. (1978) sugeriram que uma única dose intraperitoneal de CIT (50 mg/kg) poderia causar necrose em tecido renal de ratos Sprague-Dawley, uma vez que foi observado um aumento no nível de glicose e sangue na urina nas primeiras três horas. Por outro lado, CIT a 200 mg/kg, administrada na ração, pode causar lesões renais muito leves, após a exposição em camundongos machos (KANISAWA, 1984).

Um estudo realizado em coelhos machos demonstrou que a CIT, aplicada na dose de 120 mg/kg (via oral), leva ao desenvolvimento de azotemia (excesso de ureia no sangue), além de acidose metabólica com hemoconcentração e hipocalcemia, dentro de 4 a 12 horas (HANIKA et al., 1984), enquanto que as doses de 80 e 100 mg/kg (via oral) desencadearam a queda na liberação da creatinina, atingindo o pico dentro de dois a quatro dias e retornando ao normal, ou próximo ao normal, no 7º dia. Além disso, CIT, na dose de 15 mg/kg, administrada junto ao alimento, foi responsável por induzir lesões nas células de revestimento do túbulo contorcido proximal (KUMAR et al., 2007). A CIT (5 ou 50 mg/kg, via intraperitoneal) foi responsável por reduzir a depuração de PAH/inulina (um importante marcador da atividade glomerular), além da taxa de excreção de K⁺ em ratos (n = 3 a 5) (PHILLIPS et al., 1980). Em outro

estudo, Wichmann et al. (2002) afirmaram que CIT, a 0,1-100 µg/mL, reduziu significativamente o interferon IFN- γ (ID₅₀: 7,8–9,8 µg/mL), em vez da interleucina IL-4 (ID₅₀: 13,6–30,3 µg/mL), em células mononucleares de sangue periférico humano.

CIT (10 mg/kg), com ou sem o inseticida endossulfan (1 mg/kg; ração), em um experimento de 15 dias com ratos Wister, fêmeas grávidas, desencadeou a toxicidade materna induzindo alterações histopatológicas, como vasculatura ingurgitada, degeneração vacuolar e cariomegalia no fígado; congestão, degeneração tubular e formação de cilindros nos rins; alterações vasculares e hemossiderose no útero, além de depleção linfocitária e apoptose nos órgãos linfóides (SINGH et al., 2007). Em um estudo recente, Wu et al. (2012) relacionaram a CIT (7,5–30 µM) à causa de insuficiência renal (em IC₅₀: 25,5 > 100 µM), com a indução da expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo a ciclooxigenase 2 alfa (COX2 α), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina (IL-1 β) em embriões de peixe-zebra.

Um estudo anterior com ratas Wistar grávidas, CIT (10 mg/kg/dia, via oral), durante 15 dias de administração, provou causar cariomegalia e grave dilatação sinusoidal – que pode contribuir para a perda de sangue – degeneração tubular, necrose tubular medular, dilatação cística de túbulos, distorção capilar glomerular e proliferação fibroblástica intersticial (SINGH et al., 2008). Além disso, a CIT (15 mg/kg/dia) com ou sem ocratoxina A (0,75 mg/kg/dia, administrada na ração), durante 60 dias, em coelhos (n = 4), levou ao pleomorfismo mitocondrial, desintegração e distorção da atividade mitocondrial, crenação nuclear, perda de nucléolo, depleção de organelas citoplasmáticas, fragmentação nuclear, dobra uniforme da membrana celular, vacuolações citoplasmáticas, espessamento focal da membrana basal glomerular, bem como degeneração de células endoteliais (KUMAR et al., 2007).

Devido às suas propriedades tóxicas documentadas e para evitar a contaminação por CIT, recomenda-se que os recipientes, utilizados para armazenar alimentos, sejam apropriadamente fechados e guardados em locais bem ventilados. Equipamentos de proteção adequados, como luvas, materiais para olhos e face, dentre outros, devem ser usadas sempre que se estiver em contato com itens suscetíveis à contaminação por CIT. Um atendimento médico rápido, é sempre recomendável, em caso de contato com CIT (DOUGHARI, 2015).

3.7 Carcinogenicidade, efeitos genotóxicos e mutagênicos

O conhecimento sobre os potenciais efeitos carcinogênicos da CIT, em sistemas biológicos, ainda é muito obscuro. Um estudo realizado por Kanisawa (1984) com duas doses diferentes de CIT (100 e 200 mg/kg), administradas em camundongos através de sua dieta,

durante um tratamento de 70 dias, tem, fortemente, implicado em efeitos não carcinogênicos, associados com a exposição à CIT. Por outro lado, Arai e Hibino (1983) descobriram o início da formação de tumores nos rins, de 344 ratos *Fisher*, machos, após tratamento com CIT por 60 e 80 semanas.

O efeito genotóxico mediado pela CIT, ainda é, inequivocamente, estabelecido em vários sistemas de teste. Um desses mecanismos é o aumento do dano ao DNA, em linhagem de células Vero, expostas à CIT por 24h (BOUSLIMI et al., 2008b). CIT (10 - 100 μ M) tem sido responsável por acelerar a formação de micronúcleos (MN) em linfócitos de sangue periférico humano (PBMC) (DOMNEZ-ALTUNTAS et al., 2007). A indução de MN, mediada por uma concentração dependente de CIT, e danos ao DNA, também foram observados em células HepG2 por Knasmüller et al. (2004). Foi reconhecido que CIT exerce um efeito clastogênico em sistemas de teste *in vitro* e *in vivo*, induzindo aberrações cromossômicas (LIU et al., 2003). Em linhagem celular de hamster chinês (V79-E), CIT exerceu um efeito aneugênico, induzindo parada mitótica, independentemente do tempo de incubação, que foi reversível após a remoção da CIT (THUST; KNEIST, 1979). Uma possível via de ação citogenotóxica da CIT está ilustrada na Figura 4.

mg/kg de alimento, durante 60 dias) causou fragmentação de DNA – fragmentação nuclear em células epiteliais tubulares intersticiais e proximais contorcidas – além da formação de bolhas citoplasmáticas em coelhos (n = 8) (KUMAR et al., 2014). Algumas atividades importantes, com mecanismos sugeridos de ação da CIT em vários sistemas de teste são mostradas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Atividades farmacológicas da citrinina.

Sistema de teste	Tratamento com Citrinina	Resultados / mecanismo de ação	Referência
Porquinho-da-índia machos e fêmeas (n = 5 a 15)	40 mg/kg/dia (gavagem) 14 dias	Perda de peso corporal, desidratação, anemia, danos no fígado e no rim (principalmente degeneração enecrose).	Thacker; Carlton, 1977
Ratos fêmeas	62 e 87 mg/kg (via oral)	Insuficiência renal: dilatação tubular renal, lúmende túbulos renais mostrando proteína, necrose relativamente pequena das células epiteliais tubulares corticais renais, mitoses levemente aumentadas no epitélio tubular medular.	Jordan; Carlton, 1977
Ratos (n = 3 a 5)	5 ou 50 mg/kg (intraperitoneal)	Redução da liberação de PAH/inulina e na taxa de excreção de K ⁺ .	Phillips et al., 1980
Coelhos (n = 6)	33,5 ou 77 mg/kg/dia (7 dias)	Degeneração tubular renal e leve necrose, bem como regeneração tubular.	Hanika et al., 1983
Rim bovino Madin-Darby (MDBK)/Células primárias de rim fetal bovino (PFBK)	0,1-3,0 µM	Alongamento, achatamento, inchaço e arredondamento de células.	Yoneyama et al., 1986
Células renais de filhote de hamster (BHK-21)	0,1; 0,5 e 1,0 mM	Alterações severas de mitocôndrias com aumento e morte celular.	Chagas et al., 1994
Células hepáticas de rato	0,25 a 1,0 mM	Maior geração de EROs e produção do ânion superóxido na cadeia respiratória.	Ribeiro et al., 1997
Ratos machos e fêmeas (n = 5)	Ratos machos e fêmeas (n = 5) 0,065 mg/100 g (via oral) durante 60 dias	Uma diminuição significativa no peso, alterações morfológicas, detecção de grânulos de hemossiderina em alguns dos órgãos, com modificação hematológicos.	Lurá et al., 2001
<i>In vitro</i>	100 µM	Efeitos protetores na peroxidação lipídica induzido por ferro, possivelmente via formação do Fe ³⁺ - Complexo CIT.	Lozzo et al., 2002
<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i> , <i>Escherichia coli</i>	3, 5, 10, 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL.	Observação de atividade antimicrobiana (zona de inibição entre 6 e 15 mm).	Mazumder et al., 2002

<p>(ROW 7/12, AM 8/98, VC Sonawave 3,37C), <i>Salmonella typhimurium</i> (e ATCC 6539), <i>Vibrio cholerae</i>, <i>Proteus sp.</i>, <i>Pseudomonas sp.</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> (M1267, AM 8/98, NCTC 7447, 8531, ATCC 29737), <i>Bacillus pumilus</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>B. cereus var mycoides</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Lactobacillus arabinosa</i>, <i>Sarcina lutea</i></p>			
Células mononucleares de sangue periférico humano	0,1 a 100 µg / mL	Redução na expressão de IFN-γ (ID50: 7,8–9,8 µg / mL) em vez de IL-4 (ID50: 13,6–30,3 µg /mL).	Wichmann et al., 2002
Células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), PBMC humano e HEK293	20-140 µM	Falta de indução de genotoxicidade por CTI contraHEK293.	Liu et al., 2003
Linfócitos de porcos <i>Norwegian Landrace</i> machos castrados (n = 6)	5-35 mg /L	Inibição da proliferação celular (IC50: 9,6 mg / L).	Keblys et al., 2004
Linfócitos de porcos machos castrados (n = 6)	0,50 - 4,0 mg/l com ocratoxina A (0,90 a 0,72 mg/L), ácido ciclopiazônico (0,94-7,4 mg/l), patulina (0,038-0,19 mg/l), ácido penicílico (0,75-3,8 mg/L) e roquefortina C (6,0 a 30 mg/l)	Combinação de inibição dose-dependente da proliferação de linfócitos.	Bernhoft et al., 2004.
Células humanas derivadas de túbulos proximais (HKE)	0,25 a 7,5 µM com ocratoxina A (25 ou 50 nM)	Efeito antagonista na ocratoxina, indução de caspase 3-ativada até 5 µM/L.	Knecht et al., 2005
Blastocistos de ratinho	15 ou 30 µM	O aumento da apoptose e diminuição do número total de células, detecção	Chan; Shiao, 2007

		de possível atividade teratogênica da CIT.	
Células-tronco embrionárias de ratos (ESC-B5)	10, 20 e 30 µM	Geração de EROs e indução de mitocôndrias (Relação Bax / Bcl-2) via citocromo c, além da ativação de caspase-3, morte celular apoptótica; inibição da sinalização de sobrevivência Ras → ERK, via de inativação do complexo HSP-90/multichaperone, levando à lesão no desenvolvimento embrionário.	Chan, 2007
Ratas <i>Wister</i> grávidas	10 mg/kg com ou sem endossulfan (1 mg/kg), na alimentação, por 15 dias	Indução de toxicidade materna com alterações histopatológicas, como vasculatura ingurgitada, degeneração vacuolar e cariomegalia no fígado; congestionamento tubular, degeneração e formação de cálculo renal; modificações vasculares e hemossiderose no útero e depleção linfocitária e apoptose em os órgãos linfóides.	Singh et al., 2007
Teste MN em células mononucleares humanas (PBMC) (n = 6)	10-100 µM	Aumento de MN, diminuição na formação de células binucleadas/mononucleadas	Dönmez-Altuntaset al., 2007
Células de levedura (10 tipos)	108, 324 e 970 ppm	Indução de respostas de genes ao estresse oxidativo (AADs, FLR1, OYE3, GRE2 e MET17) e fraco efeito genotóxico.	Iwahashi et al., 2007
Células epiteliais alveolares humanas (A549)	0,2 a 50 µg / mL	Redução nos níveis epiteliais de GSH e TGFβ1 combinado com a elevação dos níveis de IL-6 e -8, resultando em um aumento na atividade pró-inflamatória.	Johannessen et al., 2007
Coelhos (n = 4)	5 mg /kg/dia com ou sem ocratoxina A (0,75 mg/kg/dia) (alimento), por 60 dias	Pleomorfismo mitocondrial, desintegração e distorção, núcleos crenados, perda de nucléolo, depleção de organelas citoplasmáticas, fragmentação nuclear, dobragem uniforme da membrana celular, vacuolações citoplasmáticas, espessamento focal da membrana glomerular basal e alterações proeminentes como degeneração de células endoteliais.	Kumar et al., 2007
Ratas Wistar prenhes	10 mg/kg/d (p.o.) por 15 dias	Cariomegalia e grave dilatação sinusoidal e degeneração vacuolar leve, degeneração tubular, necrose tubular medular, dilatação cística dos túbulos e proliferação de fibroblastos intersticiais.	Singh et al., 2008
Osteoblastos humanos	5, 10 e 20 µM	Estimulação da apoptose, via aumento dos níveis de EROs; ativação das vias dependentes de proteína quinase N-	Huang et al., 2008

		terminal (JNK), caspases e proteína quinase 2, ativadas por p21 (PAK2).	
Células Vero renais (verde) de macaco	25-275 μ M com ou sem ocratoxinaA (25 a 50 μ M)	Enfraquecimento da proliferação celular e quando combinado com ocratoxina A, aumento de citotoxicidade pela indução do nível de MDA e expressão de Hsp-70, fragmentação de DNA e aberrações cromossômicas.	Bouslimi et al., 2008b
Oócitos de camundongos ICR	2,5 e 5,0 μ M	Redução nas taxas de maturação e fertilização do oócito e desenvolvimento embrionário.	Chan, 2008
Células HepG2	10, 20 e 30 μ M	Diminuição da geração de EROs, ativação da via JNK, além da ativação da caspase-9, -3 e PAK2.	Chen; Chan, 2009
Células HEK293 e HeLa	25, 50, 75 e 100 μ M	Estimulação da atividade da caspase 3, além de significativa redução na presença de inibidores de MAPK, via ERK1/2 e JNK, sugerindo morte celular por apoptose.	Chang et al., 2009
Células HepG2	2,5 a 25 μ g / mL	Formação de MN e danos ao DNA, concentração-dependente.	Knasmüller et al., 2004
Células mesangiais glomerulares (MES-13)	3, 15 e 40 μ M	Supressão da produção de NO induzida por LPS/IFN- γ via inibição da JAK/STAT-1 α e vias de sinalização NF-kB.	Liu et al., 2010
Ratos <i>Wistar</i> machos (n = 8)	1, 2, 10, 20 e 200 ppm de CIT (Arroz de mofo vermelho) (100 mg/kg/dia) por 90 dias	Ausência de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, com 2 ppm CIT, sugerindo ser uma concentração segura.	Lee et al., 2010
Linhagens celulares MCF-7, LNCaP, LU1 e KB	2,5; 5; 10 e 20 μ g/disco	Deteção de fraca atividade inibitória em células cancerígenas (IC50 entre 65, 93 e 147,85 μ M/L).	Yao et al., 2011
Ratos <i>Swiss</i> (n = 5)	25, 50 e 100 μ g/Kg	Aumento na geração de EROs, repressão do ciclo celular na fase G ₀ /G ₁ , indução de morte por apoptose.	Kumar et al., 2011
Células HEK293	50-100 μ M	Ativação da parada de fase do ciclo G ₂ /M, além da inibição da polimerização da tubulina e formação de fuso mitótico. Perturbação na organização dos microtúbulos e indução de aberração cromossômica numérica.	Chang et al., 2011
17 células tumorais (786-O, BxPC3, Rh30, HL60, HCT-116, BEL-7402, MKN45, SMMC-7901, PC3, HeLa, KB, MCF-7, MDA-MB-468, SKOV-3, A549,	CIT e trimeros (tricitrinol A e B)	Indução de morte celular por apoptose em linhagem celular HL60. Tricitrinol B induzindo de apoptose em linhagem, via intercalação topoisomerase I α , levando à citotoxicidade com CI ₅₀ de 1–10 μ M.	Du et al., 2011

A431, HMEO) 17 células tumorais (786-O, BxPC3, Rh30, HL60, HCT- 116, BEL-7402, MKN45, SMMC- 7901, PC3, HeLa, KB, MCF-7, MDA-MB-468, SKOV-3, A549, A431, HMEO)			
Linhagem celular HL60, HCT116 e KB	Derivados da CIT	Derivados de CIT, nas linhagens (HL60, HCT116 e KB), produziram efeitos citotóxicos através da indução da morte celular por apoptose (3,87 a 10 μ M), interrompendo o ciclo celular na fase G ₂ /M, além da inibição da enzima topoisomerase-II.	Du et al., 2011
Embriões de peixe-zebra	7,5 a 30 μ M	Insuficiência renal (CI ₅₀ : 25,5 a 100 μ M) coma indução da expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo COX2 α , TNF- α , e IL-1 β .	Wu et al., 2012
Camundongos machos <i>Kunming</i> (n = 6)	0-6,25 mg/kg/dia (intraperitoneal) durante 7 dias	Pesos dos testículos relativamente aumentados, epidídimo, vesícula seminal, glândula prepucial, número de espermatozoides anormais e uma diminuição no número de espermatozoides vivos. Redução na taxa de prenhez em fêmeas acasaladas com machos expostos à CIT.	Qingqing et al., 2012
Embriões de peixe-zebra	20 ou 50 μ M	Diminuição do batimento cardíaco e do fluxo sanguíneo, modulado pela expressão dos genes <i>tbx2a</i> e <i>jun B</i> , além da elevação dos níveis de <i>aldh1a2</i> e <i>cspg2</i> RNAm; esses 2 genes relacionados ao coração são conhecidos por estarem envolvidos na via do ácido retinóico.	Wu et al., 2013
Ratos F344/NSlc-Tg (gpt delta) machos (n = 4/5)	20 e 40/30 mg/kg/dia (27 dias)	Aumento na expressão dos genes <i>Ccna2</i> , <i>Ccnb1</i> , <i>Ccne1</i> e seu fato de transcrição <i>E2f1</i> , sugerindo uma indução da progressão do ciclo celular em todas as doses testadas.	Kuroda et al., 2013
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	250, 500 ou 1000 μ M	Interação com os grupos sulfidrilas livres das proteínas integrais que causam a fluidização da membrana, levando a uma perturbação na homeostase iônica, mediando o efeito citotóxico.	Blasko et al., 2013
Células RAW264	0,625-40 μ M	Inibição da síntese de óxido nítrico induzida por lipopolissacarídeos, via não regulatória da expressão da iNOS.	Sugiyama et al., 2013

Coelhos (n = 8)	15 mg/kg de alimento (60 dias)	Aparecimento de mais células apoptóticas em grupos tratados em combinação (com ocratoxina A), além da fragmentação de DNA.	Kumar et al., 2014
Células HepG2	50-300 µM	Indução de danos ao DNA mediado por EROs (CI ₅₀ : 155 µM).	Gayathri et al., 2015
Neurônios corticais de ratos	0,1 a 1000 nM	Neuroprotetividade contra indução de glutamato neuro-excitotoxicidade.	Nakajima et al., 2016

3.8 Potencial de segurança e efeitos protetores demonstrados pela CIT

A micotoxina CIT é reconhecida por exercer efeitos mutagênicos em *Salmonella typhimurium* (SABATER-VILAR et al., 1999; KNASMULLER et al., 2004). Em princípio, a toxicidade da CIT depende da concentração ou dose em que é aplicada para tratamento. Por exemplo, CIT, quando administrada em ratos *Wistar*, machos (n = 8), nas concentrações de 1, 2, 10, 20 e 200 ppm, em arroz de fungo vermelho (100 mg/kg/dia, durante 90 dias), não revelou nefrotoxicidade ou hepatotoxicidade. Portanto, concluiu-se que a CIT 2 ppm pode ser considerada como uma concentração segura (LEE et al., 2010). CIT a 20, 30 e 40 mg/kg/dia, durante 27 dias, em ratos machos F344/NSIc-Tg (gpt delta), (n = 4/5), aumentou substancialmente os índices de marcação das células do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), além dos níveis de expressão de mRNA dos genes *Ccna2*, *Ccnb1*, *Ccne1*, bem como com o fator de regulação de transcrição E2f1. Em conjunto, estes resultados sugerem uma indução da progressão do ciclo celular em todas as doses testadas (KURODA et al., 2013).

CIT a 100 µM exerceu um efeito protetor na peroxidação lipídica induzida por ferro, possivelmente através da formação do complexo Fe³⁺-CIT (LOZZO et al., 2002). Em um estudo mais recente, Liu e colaboradores relataram que a CIT, na concentração de 20-140 µM não provocou efeito genotóxico na linhagem celular HEK293. Entretanto, aumentou o nível de mRNA da HSP-70 (LIU et al., 2003). Em 0,625-40 µM, CIT apresentou potencial antiinflamatório *in vitro*, inibindo a síntese de óxido nítrico (NO), induzida por lipopolissacarídeos, via regulação negativa da expressão indutível da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) em células RAW264 (SUGIYAMA et al., 2013). Em um estudo mais recente, foi relatado que o intervalo de concentração de CIT (0,1 a 1000 nM) exibe propriedades neuroprotetoras *in vitro*, ao eliminar os efeitos excitotóxicos induzidos pelo glutamato, em neurônios corticais de ratos (NAKAJIMA et al., 2016). Meng e colaboradores caracterizaram a citrifelina A e B, dois adutos de CIT, que exibiam atividades inibitórias contra vários patógenos humanos e aquáticos (MENG et al., 2015).

Em um relatório recente, um total de 1.195 amostras de cereais industriais, matérias-primas derivadas de plantas e alimentos, incluindo 92 amostras de suplementos alimentares de arroz vermelho fermentado, disponíveis no mercado europeu, foram analisadas para a presença de CIT. Foi detectada CIT em 8% (31 de 390) das amostras de cereais industriais e quantificada acima de 0,001 mg/kg em 6% (22 amostras). Níveis consideráveis de CIT foram detectados em amostras de trigo, cevada e centeio, sendo que, especialmente em grãos de centeio originários da Polônia, seus níveis foram maiores do que em outros países (LÓPEZ et al., 2017).

A Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) adaptou o parecer, sobre os riscos para a saúde pública e animal, relacionados com a presença de CIT na alimentação humana e animal (EFSA, 2012). O parecer decidiu caracterizar o risco de citrinina nos dados disponíveis sobre a nefrotoxicidade e determinou um nível de não-preocupação com a nefrotoxicidade. A aplicação de um fator de incerteza de 100 para o Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL), de 20 µg/kg de peso corporal, por dia, resulta em um nível sem preocupação com nefrotoxicidade em humanos de 0,2 µg/kg de peso corporal, por dia. O painel concluiu que os dados disponíveis sugerem a inclusão da preocupação com a genotoxicidade e carcinogenicidade devido ao alto nível de citrinina (EFSA, 2012). O arroz vermelho fermentado é um suplemento dietético comumente usado para o tratamento da dislipidemia. A *Food and Drug Administration* (FDA), emitiu um aviso ao consumidor em 2007, para evitar produtos arroz vermelho fermentado, porque eles podem conter drogas não autorizadas (lovastatina).

Um estudo de verificação de qualidade, realizado por Childress et al. (2013), relatou que nenhum produto poderia ter a confirmação de qualidade aprovada por qualquer teste de verificação laboratorial independente e, portanto, 42,6% de rótulos de produtos de arroz vermelho fermentado continham avisos relacionados à estatina (isto é, potencial para dor ou fraqueza muscular). Embora o arroz e os produtos do arroz vermelho fermentado possam ser benéficos para a saúde, existem relatórios sobre algumas espécies do gênero *Monascus* que produzem CIT durante a fermentação. Assim, a contaminação de produtos do arroz vermelho fermentado, com CIT, tem atraído a atenção, além de uma ampla e definitiva preocupação de saúde pública. Monacolina K é produzida por *Monascus purpureus*, que também produz CIT, assim, o fermento de arroz vermelho, contaminado com CIT, pode estar associado à preocupação com a nefrotoxicidade. A ingestão necessária de monacolina K pode ser obtida por 4-6 cápsulas de 600 mg de arroz vermelho fermentado. O nível máximo observado de CIT desse arroz é de 2 mg/kg e o nível de CIT que causa nefrotoxicidade continua a ser de 0,2

µg/kg/peso corporal, para um adulto (EFSA, 2012). No entanto, legislações e regulamentos diferentes devem ser considerados durante o uso de produtos que possam conter CIT.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os relatos da literatura sugerem que o conhecimento sobre a bioatividades da CIT, apesar da jornada de 86 anos, ainda é muito vago. Os potenciais genotóxicos e mutagênicos da CIT ainda são controversos em relação aos sistemas de dose e testes utilizados. Um desses exemplos é o estudo do efeito genotóxico induzido pela CIT em células Vero (BOUSLIMI et al., 2008b). No entanto, o mesmo método forneceu os resultados negativos em células HEK293 (LIU et al., 2003) e células HepG2 (KNASMULLER et al., 2004). Embora a CIT tenha exercido um efeito clastogênico em sistemas de teste *in vitro* e *in vivo*, esta não produziu diferenças significativas na frequência de trocas entre cromátides-irmãs ou quebras no DNA (LIU et. al., 2003).

A DL₅₀ geral de CIT, em roedores e outros animais, foi: 50-120 mg/kg (via oral), de 35-67 mg/kg (via subcutânea), 37-67 mg/kg (via intraperitoneal) e 19 mg/kg (via intravenosa). Em geral, as substâncias fenólicas ou ácidas possuem efeitos citotóxicos (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; SHAH et al., 2014). CIT possui grupo hidroxílico (OH, C8) bem como ácido carboxílico (COOH, C12) em sua estrutura. Segundo Islam et al. (2017), compostos contendo grupos OH ativos podem matar os microrganismos através de uma elevada atividade citotóxica. No entanto, este tipo de substância também pode atuar como antioxidante (ISLAM et al., 2016a). Em baixas concentrações, esses compostos podem atuar como agentes de proteção, ao mesmo tempo em que conferem um efeito pró-oxidativo, em altas concentrações. Assim, o estresse oxidativo induzido por CIT, efeitos inflamatórios e destruição de macromoléculas celulares, como carboidratos, proteínas, lipídios e materiais genéticos (DNA e RNA), podem estar relacionados à fenômenos cito-geno-toxicológicos em sistemas testes.

Geralmente, a natureza química da maioria das micotoxinas faz com que sejam compostos altamente lipossolúveis, que podem ser facilmente absorvidos, no local de exposição, e espalhados por todo o corpo, atingindo diferentes órgãos, como o fígado e os rins (AHMED ADAM et al., 2017). Assim, os efeitos tóxicos induzidos por CIT nos órgãos dos roedores, e em outros animais, podem estar ligados às propriedades farmacodinâmicas desta micotoxina.

A GSH é conhecida por contribuir na conversão de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Assim, a redução do conteúdo de GSH em células A549 (JOHANNESSEN et al., 2007) pode estar associada à produção de $O_2^{\bullet-}$ em células hepáticas de ratos (RIBEIRO et al., 1997). Possivelmente, os efeitos citotóxicos induzidos pela CIT podem estar ligados a seus efeitos pró-oxidativos mediados por altas concentrações/doses. Por outro lado, na faixa de concentração entre 0,1 a 1000 nM, CIT apresenta potencial para proteger o sistema nervoso da excitotoxicidade neuro-induzida por glutamato em neurônios corticais de ratos (NAKAJIMA et al., 2016). De outro modo, a 25-100 μ g e 3,87-10 μ M, CIT tem sido eficaz para deter o ciclo celular nas fases G_0/G_1 e G_2/M , respectivamente (DU et al., 2011; KUMAR et al., 2011). Portanto, para avançar ainda mais o conhecimento sobre os mecanismos de ação da CIT, é crucial verificar sua capacidade antioxidante em sistemas de teste adequados.

A expressão mais elevada da proteína chaperona HSP-90 liga-se à estabilização de proteínas mal dobradas, estruturalmente falando, enquanto que a HSP-70 reestrutura essas proteínas em proteínas maduras normais. As expressões superiores, mediadas por CIT, envolvendo as proteínas HSP-90 (CHAN, 2007) e HSP-70 (BOUSLIMI et al., 2008a,b) entre 10 e 250 μ M, em células eucarióticas, podem ser um mecanismo ligado ao seu papel protetor.

Lee et al. (2010) sugeriram que a CIT é segura até 2 ppm em fermento de arroz vermelho, independentemente dos seus efeitos não mutagênicos em *S. typhimurium* (SABATER-VILAR et al., 1999; KNASMULLER et al., 2004). Além disso, a 20, 30 e 40mg/kg/dia – durante 27 dias de tratamento – CIT não mostrou qualquer efeito sobre a progressão do ciclo celular em ratos, machos, F344/NSlc-Tg (gpt delta) (KURODA et al., 2013). Uma superprodução de EROs e NO pode levar à peroxidação lipídica e danificar os materiais genéticos (ISLAM et al., 2016b). Assim, a inibição da peroxidação lipídica induzida por CIT (LOZZO et al., 2002) e a atividade da iNOS (SUGIYAMA et al., 2013) em baixas concentrações podem estar ligadas a seus efeitos não genotóxicos ou mutagênicos em sistemas testes.

No entanto, a superprodução de malondialdeído (MDA), um marcador de estresse oxidativo, é uma causa evidente de quebras de fita simples no material genético (SAGE; HARRISON, 2011). Foi reconhecido que CIT, 0-250 μ M, em células Vero, induz aumento dos níveis de MDA (BOUSLIMI et al., 2008a, b), que pode estar relacionado ao seu efeito genotóxico sobre este sistema teste.

Levando em conta a tendência de penetrar nas células humanas e animais, as micotoxinas, em geral, têm o potencial de causar uma grande mudança mutagênica nas sequências nucleotídicas, resultando em fortes e irreversíveis defeitos ao genoma. Tais defeitos podem eventualmente gerar alterações no produto dos genes, dando origem ao câncer. Por exemplo, a aflatoxina B1 tem sido relatada como uma notória micotoxina carcinogênica, levando à absorção, imediata, através das membranas celulares e ligando-se ao DNA, no qual causa mutações irreversíveis.(AHMED ADAM et al., 2017).

A CIT demonstrou possuir algumas propriedades farmacológicas, potencialmente úteis, *in vitro*. No entanto, em geral, os dados científicos sobre a suas atividades biológicas e mecanismos de ação ainda são muito obscuros. Até hoje, a CIT e vários de seus derivados têm sido estudados, principalmente em relação à sua ação toxicológica. Isso relaciona-se ao desejo de controlar os efeitos potencialmente nocivos em seres humanos e outros organismos, às possíveis consequências de causar algumas doenças graves ou até letais. Em humanos, a CIT é conhecida por causar irritação nos olhos e na pele, e uma atenção especial tem sido recomendada para prevenir contaminações causadas por esta micotoxina. Por outro lado, em alguns estudos, descobriu-se que a CIT, bem como seus derivados, apresentam bioatividades potencialmente úteis, em baixas concentrações. Portanto, mais pesquisas são necessárias para esclarecer o mecanismo molecular dessa micotoxina e seus possíveis efeitos benéficos ou prejudiciais.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, D.; HULASARE, R.; YORK, R.K.; WHITE, N.D.G.; JAYAS, D.S. Mycotoxins, ergosterol and odor volatile in durum wheat during granary storage at 16% and 20% moisture content. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, p. 67-76, 2005.
- AHMED ADAM, M.A.; TABANA, Y. M.; MUSA, K. B.; SANDAI, D.A. Effects of different mycotoxins on humans, cell genome and their involvement in cancer (Review). **Oncology Reports**, v. 37, n. 3, p. 1321–1336, 2017.
- ALI, N.; BLASZKEWICZ, M.; ALIM, A.; HOSSAIN, K.; DEGEN, G. H. Urinary biomarkers of ochratoxin A and citrinin exposure in two Bangladeshi cohorts: follow-up study on regional and seasonal influences. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 11, p. 2683–2697, 2016.
- AMBROSE, A.M.; DeEDS, F. Acute and subacute toxicity of pure citrinin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 59, p. 289-291, 1945.
- AMBROSE, A.M.; DeEDS, F. Some toxicological and pharmacological properties of citrinin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 88, p. 173–186, 1946.

- ARAI, M.; HIBINO, T. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. **Cancer Letters**, v. 17, p. 281–287, 1983.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCHEK, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.
- BERNDT, W. O. Transport of citrinin by rat renal cortex. **Archives of Toxicology**, v. 54, p. 35–40, 1983.
- BERNHOF, A.; KEBLYS, M.; MORRISON, E.; LARSEN, H.J.S.; FLÅ ØYEN, A. Combined effects of selected *Penicillium* mycotoxins on In vitro proliferation of porcine lymphocytes. **Mycopathologia**, v. 158, p. 441–450, 2004.
- BLASKO, A.; MIKE, N.; GROF, P.; GAZDAG, Z.; CZIBULYA, Z.; NAGY, L.; KUNSAGI-MATE, S.; PESTI, M. Citrinin-induced fluidization of the plasma membrane of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 636–642, 2013.
- BOPANA, N.B.; KRAVEKA, J.M.; RAHMANYAN, M.; LI, L. I.; BIELAWSKA, A.; BIELAWSKI, J.; PIERCE, J. S.; DELOR, J. S.; ZHANG, K.; KORBELIK, M.; SEPAROVIC, D. Fumonisin B1 inhibits endoplasmic reticulum stress associated-apoptosis after Foscan PDT combined with C6-Pyridinium ceramide or fenretinide. **Anticancer Research**, v. 37, n. 2, p. 455–463, 2017.
- BOUSLIMI, A.; BOUAZIZ, C.; AYED-BOUSSEMA, I.; HASSEN, W.; BACHA, H. Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. **Toxicology**, v. 251, p. 1–7, 2008b.
- BOUSLIMI, A.; OUANNES, Z.; GOLLI, E. E.; BOUAZIZ, C.; HASSEN, W.; BACHA, H. Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxin A and citrinin: individual and combined effects. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 18, p. 341–349, 2008a.
- BOWER, A.; MARQUEZ, S.; DE MEJIA, E.G. The health benefits of selected culinary herbs and spices found in the traditional mediterranean diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 16, p. 2728–2746, 2016.
- CHAGAS, G. M.; KLIIPPEL, M. L. W.; CAMPELLO, A. P.; BUCHI, D. F.; OLIVEIRA, M. B. M. Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. **Cell Structure and Function**, v. 19, p. 103–108, 1994.
- CHAGAS, G. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; CAMPELLO, A. P.; KLUPPEL, M. L. W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. IV. Effect on Ca²⁺ transport. **Cell Biochemistry & Function**, v. 13, p. 53–59, 1995.

- CHAN, W. -H. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells and causes developmental injury in blastocysts. **Biochemical Journal**, v. 404, p. 317–326, 2007.
- CHAN, W.-H. 2008. Effects of citrinin on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development *in vitro* and *in vivo*. **Toxicology Letters**, v. 180, p. 28–32, 2008.
- CHAN, W.-H.; SHIAO, N.-H. Effect of citrinin on mouse embryonic development *in vitro* and *in vivo*. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 120–125, 2007.
- CHANG, C.-H.; YU, F.-Y.; WANG, L.-T.; LIN, Y.-S.; LIU, B.-H. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, p. 281–287, 2009.
- CHANG, X.-H.; YU, F.-Y.; WU, T.-S.; WANG, L.-W.; LIU, B.-H. Mycotoxin citrinin induced cell cycle G2/M arrest and numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule formation in human cells. **Toxicological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 84–92, 2011.
- CHEN, C.-C.; CHAN, W.-H. Inhibition of citrinin-induced apoptotic biochemical signaling in human hepatoma G2 cells by resveratrol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3338–3357, 2009.
- CHILDRESS, L.; GAY, A.; ZARGAR, A.; ITO, M. K. Review of red yeast rice content and current Food and Drug Administration oversight. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 7, n. 2, p. 117–122, 2013.
- DeCORTE, B. L. Underexplored opportunities for natural products in drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 9295–9304, 2016.
- DESHPANDE, S.S. **Handbook of Food Toxicology**. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, pp. 424, 2002.
- DÖNMEZ-ALTUNTAS, H.; DUMLUPINAR, G.; IMAMOGLU, N.; HAMURCU, Z.; LIMAN, B.C. Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 27, p. 337–341, 2007.
- DOUGHARI, J. H. The occurrence, properties and significance of citrinin mycotoxin. **Journal of Applied Toxicology**, v. 6, p. 321, 2015.
- DU, L.; LIU, H. C.; FU, W.; LI, D. H.; PAN, Q. M.; ZHU, T.J.; GENG, M. Y.; GU, Q. Q. Funções sem precedentes citrinina Trimer Tricitinol B como um Novel Topoisomerase II α inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5796–5810, 2011.
- DUNN, B. B.; STACK, M.E.; PARK, D. L.; JOSHI, A.; FRIEDMAN, L.; KING, R. L. Isolation and identification of dihydrocitrinone, a urinary metabolite of citrinin in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 12, p. 283–289, 1983.
- EFSA-PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM). Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. **European Food Safety Authority Journal**, v. 10, p. 2605, 2012.
- FINK-GREMMELS, J.; DRESEL, J.; LEISTNER, L. Use of *Monascus* extracts as an alternative to nitrate in meat products. **Fleischwirtschaft**, v. 71, p. 1184–1186, 1991.

- FLAJS, D.; PERAICA, M. Toxicological properties of citrinin. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, p. 457–464, 2009
- FRANCO, C. M.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B.; CEPEDA, A.; LALLAOUI, L. Simple and sensitive endemic nephropathy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2483–2488, 1996.
- GAYATHRI, L.; DHIVYA, R.; DHANASEKARAN, D.; PERIASAMY, V. S.; ALSHATWI, A. A.; AKBARSHA, M. A. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: *In vitro* study in HepG2 cell. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 151–163, 2015.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412–429, 2014.
- HACKBART, H. C. S.; PRIETTO, L.; PRIMEL, E. G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Simultaneous extraction and detection of ochratoxin A and citrinin in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1, 2012.
- HAJJAJ, H.; KLAÉBÉ, A.; LORET, M. O.; GOMA, G.; BLANC, P. J.; FRANÇOIS, J. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 311–314, 1999.
- HANIKA, C.; CARLTON, W.W.; BOON, G. D.; TUIITE, J. Citrinin mycotoxicosis in the rabbit: clinicopathological alterations. **Food and Chemical Toxicology**, v. 22, p. 999–1008, 1984.
- HANIKA, C.; CARLTON, W. W.; TUIITE, J. Citrinin mycotoxicosis in the rabbit. **Food and Chemical Toxicology**, v. 21, p. 487–493, 1983.
- HARAGUCHI, H.; HASHIMOTO, K.; SHIBATA, K.; TANIGUCHI, M.; OI, S. Mechanism of antifungal action of citrinin. **Agricultural and biological chemistry**, v. 51, p. 1373–1378, 1987.
- HIROYUKI, H.; KENSUKE, H.; KOZO, S. Mechanism of antifungal action of citrinin. **Agricultural and biological chemistry**, v. 5, p. 1373–1378, 1987.
- HUANG, Y.-T.; LAI, C.-Y.; LOU, S.-L.; YEH, J.-M.; CHAN, W.-H. Activation of JNK and PAK2 is essential for citrinin-induced apoptosis in a human osteoblast cell line. **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 343–356, 2008.
- HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n. 2, p. 101–134, 2001.
- ISLAM, M. T.; SANTOS, J. V. O.; FERREIRA, J. R. O.; SOUSA, J. M. C.; PAZ, M. F. C. J.; CARVALHO, R. M.; MATA, A. M. O. F.; SOUSA, L. R.; LIMA, R. M. T.; SILVA, M. B. S.; ALENCAR, M. V. O. B.; FERREIRA, P. M. P.; DANTAS, S. M. M. M.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. A possible phytol -cytoprotective trait through reactive species-induced oxidative stress ebbing pathway. **International Archives of Medicine**, v. 9, n. 188, p. 1-11, 2016a.
- ISLAM, M. T.; STRECK, L.; ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, S. W. C.; MACHADO, K. C.; MACHADO, K. C.; JÚNIOR, A. L. G.; PAZ, M. F. C. J.; MATA, A. M. O. F.; SOUSA, J. M. C.; JUNIOR, J. S. C.; ROLIM, H. M. L.; SILVA-JUNIOR, A. A.; MELO-

CAVALCANTE, A. A. C. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, v. 177, n. 2017, p. 93–101, 2017.

ISLAM, M. T.; STRECK, L.; PAZ, M. F. C. J.; SOUSA, J. M. C.; ALENCAR, M. V. O. B.; MATA, A. M. O. F.; CARVALHO, R. M.; JOSE SANTOS, J. V. O.; SILVA-JUNIOR, A. A.; FERREIRA, P. M. P.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. Preparation of phytol-loaded nanoemulsion and screening for antioxidant capacity. **International Archives of Medicine**, v. 9, n. 70, p. 1–15, 2016b.

IWAHASHI, H.; KITAGAWA, E.; SUZUKI, Y.; UEDA, Y.; ISHIZAWA, Y.; NOBUMASA, H.; KUBOKI, Y.; HOSODA, H.; IWAHASHI, Y. Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray. **BMC Genomics**, v. 8, p. 95–97, 2007.

JESWAL, P. Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of *Mus musculus*. **Cytobios**, v. 86, p. 29–33, 1996.

JESWAL, P.; KUMAR, D. Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxina, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

JHA, S. N. **Rapid Detection of Food Adulterants and Contaminants: Theory and Practice**. Academic Press, an Imprint of Elsevier, London, 2016.

JOHANNESSEN, L.N.; NILSEN, A.M.; LØVIK, M. Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. **Toxicology Letters**, v.168, p. 103–112, 2007.

JORDAN, W. H.; CARLTON, W.W. Citrinin mycotoxicosis in the mouse. **Food and Cosmetics Toxicology**, v.15, p. 29–34, 1977.

JORDAN, W. H.; CARLTON, W.W.; SANSING, G.A. Citrinin mycotoxicosis in the rat. II. Clinicopathological observations. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 16, p. 441–447, 1978.

KABAK, B.; DOBSON, A.D. Mycotoxins in spices and herbs-An update. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 18–34, 2017.

KANISAWA, M. Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. **Developments in Food Science**, v. 7, p. 245–254, 1984.

KEBLYS, M.; BERNHOFT, A.; HÖFER, C.C.; MORRISON, E.; LARSEN, H.J.S.; FLÅØYEN, A. The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on *In vitro* proliferation of porcine lymphocytes. **Mycopathologia**, v. 158, p. 317–324, 2004.

KNASMÜLLER, S.; CAVIN, C.; CHAKRABORTY, A.; DARROUDI, F.; MAJER, B. J.; HUBER, W.W.; EHRLICH, V.A. Structurally related mycotoxins ochratoxin a, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human-derived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. **Nutrition and Cancer**, v. 50, n. 2, p. 190–197, 2004.

KNECHT, A.; SCHWERDT, G.; GEKLE, M.; HUMPF, H.-U. Combinatory effects of citrinin and ochratoxin A in immortalized human proximal tubule cells. **Mycotoxin Research**, v. 21, n.3, p. 176–181, 2005.

KOVÁČ, S.; NEMEC, P.; BETINA, V.; BALAN, J. Chemical structure of citrinin. **Nature**, v. 190, p. 1104–1105, 1961.

KREJCI, M.E.; BRETZ, N.S.; KOECHEL, D.A. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]plasma. **Toxicology**, v. 106, p. 167–177, 1996.

KROGH, P. **Ochratoxin in foods. In: Krogh, P. (Ed.), Mycotoxins in Food.** Academic Press, London, United Kingdom, pp. 97–110, 1987.

KUMAR, M.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A.K.; SANKAR, M.; PATIL, R.D.; SINGH, N.D. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A- and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Toxicology & Industrial Health**, v. 30, p. 90–98, 2014.

KUMAR, M.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A.K.; SINGH, N.D.; PATIL, R.D. Ochratoxin A and citrinin nephrotoxicity in New Zealand White rabbits: an ultrastructural assessment. **Mycopathologia**, v. 163, p. 21–30, 2007.

KUMAR, R.; DWIVEDI, P.D.; DHAWAN, A.; DAS, M.; ANSARI, K.M. Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. **Toxicological sciences**, v. 122, n. 2, p. 557–566, 2011.

KURODA, K.; ISHII, Y.; TAKASU, S.; KIJIMA, A.; MATSUSHITA, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, H.; SUGITA-KONISHI, Y.; SAKAI, H.; YANAI, T.; NOHMI, T.; OGAWA, K.; UMEMURA, T. Cell cycle progression, but not genotoxic activity, mainly contributes to citrinin-induced renal carcinogenesis. **Toxicology**, v. 311, p. 216–224, 2013.

LEE, C.-H.; LEE, C.-L.; PAN, T.-M. A 90-D toxicity study of monascus-fermented products including high citrinin level. **Journal of Food Science**, v. 75, p. T91–T97, 2013.

LIU, B.-H.; CHI, J.-Y.; HSIAO, Y.-W.; TSAI, K.-D.; LEE, Y.-J.; LIN, C.-C.; HSU, S.-C.; YANG, S.-M.; LIN, T.-H. The fungal metabolite, citrinin, inhibits lipopolysaccharide/interferon- γ -induced nitric oxide production in glomerular mesangial cells. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 12, p. 1608–1615, 2010.

LIU, B.-H.; YU, F.-Y.; WU, T.-S.; LI, S.-Y.; SU, M.-C.; WANG, M.-C.; SHIH, S.-M. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, p. 255–263, 2003.

LÓPEZ, P.; DE NIJS, M.; SPANJER, M.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; STARSKI, A.; POSTUPOLSKI, J.; CASTELLARI, M.; HORTÓS, M. Generation of occurrence data on citrinin in food. **EFSA Supporting Publications**, v. 14, n. 2, p. 1–47, 2017.

LOZZO, E.J.; MANGRICH, A.S.; ROCHA, M.E.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; CARNIERI, E.G.S. Effects of citrinin on iron-redox cycle. **Cell Biochemistry and Function**, v. 20, p. 19–29, 2002.

LURÁ, M.C.; FUENTES, M.B.; CABAGNA, M.; GONZÁLEZ, A.M.; NEPOTE, A.F.; GIUGNI, M.C.; RICO, M.; LATORRE, M.G. Actividad de metabolitos de *Penicillium citrinum* sobre ratones *Mus musculus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, p. 183–186, 2001.

- MÁTÉ, G.; GAZDAG, Z.; MIKE, N.; PAPP, G. Pócsi I2, Pesti M. Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Toxicon**, v. 90, p. 155–166, 2014.
- MAZUMDER, P.M.; MAZUMDER, R.; MAZUMDER, A.; SASMAL, D.S. Antimicrobial activity of the mycotoxin citrinin obtained from the fungus *Penicillium citrinum*. **Ancient Science of Life**, v. XXI, p. 191–197, 2002.
- MEHDI, N.A.; CARLTON, W.W.; TUIE, J. Acute toxicity of citrinin in turkeys and ducklings. **Avian Pathology**, v.12, p. 221–233, 1983.
- MENG, L.-H.; LIU, Y.; LI, X.-M.; XU, G.-M.; JI, N.-Y.; WANG, B.-G. Citrifelins A and B, citrinin adducts with a tetracyclic framework from cocultures of marine-derived isolates of *Penicillium citrinum* and *Beauveria felina*. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 2301–2305, 2015.
- NAKAJIMA, Y.; IGUCHI, H.; KAMISUKI, S.; SUGAWARA, F.; FURUICHI, T.; SHINODA, Y. Low doses of the mycotoxin citrinin protect cortical neurons against glutamate-induced. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 41, n. 2, p. 311–319, 2016.
- NEJATI, P.; NOSRATI, A.C.; BAYAT, M.; AZAR, O.L. An investigation on measurement means of Citrinin toxin quantity by toxigenic *Aspergillus* species in biomass, using ELISA. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 2, p. 2466–2471, 2014.
- O'NEIL, M.J. **The Merck Index - an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and biologicals**. 13th Edition. Merck and Co., Inc, Whitehouse Station, NJ, p. 406, 2001.
- OSTRY, V.; MALIR, F.; RUPRICH, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. **Toxins (Basel)**, v. 5, p. 1574–1586, 2003.
- PELICANO, H.; FENG, L.; ZHOU, Y.; CAREW, J. S.; HILEMAN, E. O.; PLUNKETT, W.; KEATING, M.J.; HUANG, P. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species mediated mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 37832–37839, 2003.
- PHILLIPS, R.D.; BERNDT, W. O.; HAYES, A. W. Distribution and excretion of [¹⁴C] citrinin in rats. **Toxicology**, v. 12, p. 285–298, 1979.
- PHILLIPS, R.D.; HAYES, A. W.; BERNDT, W. O.; WILLIAMS, W. L. Effects of citrinin on renal function and structure. **Toxicology**, v. 16, p. 123–137, 1980.
- PISAREVA, E.; SAVOV, V.; KUJUMDZIEVA, A. Pigments and citrinin biosynthesis by fungi belonging to genus *Monascus*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, p. 116–120, 2005.
- POUPKO, R.; LUZ, Z.; DESTRO, R. Carbon-13 NMR of citrinin in the solid state and in solutions. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 101, p. 5097–5102, 1997.
- QINGQING, H.; LINBO, Y.; YUNQIAN, G.; SHUQIANG, L. Toxic effects of citrinin on the male reproductive system in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 465–469, 2012.
- REDDY, R.V.; MAYURA, K.; HAYES, A.W.; BERNDT, W. Embryocidal teratogenic and fetotoxic effects of citrinin in rats. **Toxicology**, v. 25, p. 150–160, 1982.

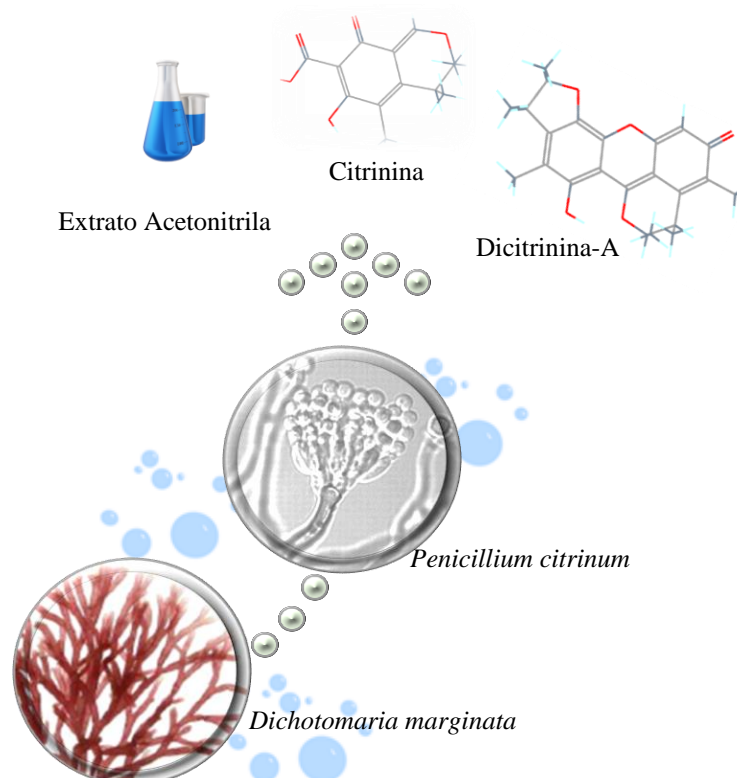
- RIBEIRO, S.M.R.; CHAGAS, G.M.; CAMPELLO, A.P.; KLUPPEL, L.W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. **Cell Biochemistry and Function**, v. 15, p. 203–209, 1997.
- SABATER-VILAR, M.; MAAS, R.F.M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. **Mutation Research**, v. 444, p. 7–16, 1999.
- SAGE, E.; HARRISON, L. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: relevance to mutagenesis and cell survival. **Mutation Research**, v. 711, p. 123–133, 2011.
- SAKAI, F. An experimental study on the toxic effect, especially on the kidney of “yellowed rice” polluted by *Penicillium citrinum* Thom, as well as of citrinin, a pigment isolated from the mould. **Folia Pharmacologica Japonica**, v. 51, p. 431–442, 1955.
- SAMSON, R.A.; YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; SEIFERT, K.A.; PETERSON, S.W.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 159–183, 2014.
- ŠEGVIĆ KLARIĆ, M.; ŽELJEŽIĆ, D.; RUMORA, L.; PERAICA, M.; PEPELJNJAK, S.; DOMIJAN, A.-M. A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 97–107, 2012.
- 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.
- SINGH, N.D.; SHARMA, A.K.; DWIVEDI, P.; PATIL, R.D.; KUMAR, M. Citrinin and endosulfan induced maternal toxicity in pregnant Wistar rats: pathomorphological study. **Journal of Applied Toxicology**, v. 27, p. 589–601, 2007.
- SINGH, N.D.; SHARMA, A.K.; DWIVEDI, P.; PATIL, R.D.; KUMAR, M. Experimentally induced citrinin and endosulfan toxicity in pregnant Wistar rats: histopathological alterations in liver and kidneys of fetuses. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 901–907, 2008.
- SRIANTA, I.; RISTIARINI, S.; NUGERAHANI, I.; SEN, S.K.; ZHANG, B.B.; XU, G.R.; BLANC, P.J. Recent research and development of *Monascus* fermentation products. **International Food Research Journal**, v. 21, p. 1–12, 2014.
- SUGIYAMA, K.-I.; YAMAZAKI, R.; KINOSHITA, M.; KAMATA, Y.; TANI, F.; MINAI, Y.; SUGITAKONISHI, Y. Inhibitory effect of citrinin on lipopolisaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. **Mycotoxin Research**, v. 29, n. 4, p. 229–234, 2013.
- SULAIMAN, M.R.; CHYE, F.Y.; HAMID, A.A.; YATIM, A.M. The occurrence of aflatoxins in raw shelled peanut samples from three districts of Perak. Malays. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 2045–2052, 2007.
- THACKER, H.L.; CARLTON, W.W. Citrinin mycotoxicosis in the Guinea-pig. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 15, n. 6, p. 553–561, 1977.

- THUST, R.; KNEIST, S. Activity of citrinin metabolized by rat and human microsome fractions in clastogenicity and SCE assay on Chinese hamster V79-E cells. **Mutation Research**, v. 67, p. 321–330, 1979.
- TRIVEDI, A.B.; HIROTA, M.; KITABATAKE, N. Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 1, p. 2167–2171, 1993.
- VANACLOIG-PEDROS, E.; PROFT, M.; PASCUAL-AHUIR, A. Different toxicity mechanisms for citrinin and ochratoxin a revealed by transcriptomic analysis in yeast. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 10, p. E273, 2016.
- VOGL, S.; PICKER, P.; MIHALY-BISON, J.; FAKHRUDIN, N.; ATANASOV, A.G.; HEISS, E.H.; WAWROSCH, C.; REZNICEK, G.; DIRSCH, V.M.; SAUKEL, J.; KOPP, B. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine—an unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 750–771, 2013.
- WANG, M.L.; LU, C.H.; XU, Q.Y.; SONG, S.Y.; HU, Z.Y.; ZHENG, Z.H. Four new citrinin derivatives from a marine-derived *Penicillium* sp. fungal strain. **Molecules**, v. 18, p. 5723–5735, 2013.
- WICHMANN, G.; HERBARTH, O.; LEHMANN, I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon- γ rather than interleukin-4 production in human blood cells. **Environmental Toxicology**, v. 17, p. 211–218, 2002.
- WU, T.-S.; YANG, J.-J.; YU, F.-Y.; LIU, B.-H. Cardiotoxicity of mycotoxin citrinin and involvement of microrna-138 in zebrafish embryos. **Toxicological Sciences**, v. 136, n. 2, p. 402–412, 2013.
- WU, T.-S.; YANG, J.-J.; YU, F.-Y.; LIU, B.-H. Evaluation of nephrotoxic effects of mycotoxins, citrinin and patulin, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 4398–4404, 2012.
- XU, B.J.; GU, L.J.; SUNG, C.K. HPLC analysis of citrinin in red yeast rice. **Food Science and Biotechnology**, v. 12, p. 376–380, 2013.
- XU, B.J.; JIA, X.Q.; GU, L.J.; SUNG, C.K. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food control**, v. 17, p. 271–285, 2006.
- YAO, G.; SEBISUBI, F.M.; VOO, L.Y.C.; HO, C.C.; TAN, G.T.; CHANG, L.C. Citrinin derivatives from the soil filamentous fungus *Penicillium* sp. H9318. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1125–1129, 2011.
- YONEYAMA, M.; SHARMA, R.P.; KLEINSCHUSTER, S.J. Cytotoxicity of citrinin in cultured kidney epithelial cell systems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 11, p. 100–111, 1986.
- YU, F.Y.; LIAO, Y.C.; CHANG, C.H.; LIU, B.H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. **Toxicology Letters**, v. 161, p. 143–151, 2006.

Capítulo 2

Avaliação tóxica / citotóxica e citogenética do extrato acetoneitrila, Citrinina e Dicitrinina-A do *Penicillium citrinum*

Avaliar os parâmetros tóxicos, citotóxicos e citogenéticos do extrato acetoneitrila do *Penicillium citrinum*, citrinina e dicitrinina-A por meio dos ensaios com *Artemia salina*, *Allium cepa* e *Saccharomyces cerevisiae*



OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

Avaliação tóxica /citotóxica e citogenética do extrato acetoneitrila, Citrinina e Dicitrinina-A do *Penicillium citrinum*

José Williams Gomes de Oliveira Filho, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Rosália Maria Tôres de Lima, Dulce Helena Siqueira Silva, Antonielli Campinho dos Reis, José Victor de Oliveira Santos, Ag-Anne Pereira Melo de Menezes, AntonioLima Braga, Ricardo Melo de Carvalho, Ana Maria da Mata, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Ana Carolina Soares Dias, Lina Clara Moreno, Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva, Muhammad Torequul Islam, João Marcelo de Castro e Sousa, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante

Artigo submetido ao periódico *Chemosphere* (ANEXO B)

QUALIS A2 – Biotecnologia

Resumo

Os fungos endofíticos são fontes promissoras de substâncias bioativas para a indústria farmacêutica e suas micotoxinas são geralmente tóxicas para plantas, animais e humanos. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar as atividades tóxicas/citotóxicas, mutagênicas e oxidativas/antioxidantes do extrato acetoneitrila e dos metabólitos secundários citrinina e dicitrinina-A do *Penicillium citrinum*. Para os testes, os náuplios de *Artemia salina* foram expostos por 24 e 48 horas e os bulbos de *Allium cepa* foram expostos por 48 horas às substâncias. O teste oxidante/antioxidante foi avaliado no pré, co e pós-tratamento pelo H₂O₂ em *Saccharomyces cerevisiae*. O extrato acetoneitrila e os metabólitos Citrinina e Dicitrinina-A em concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2 µg/mL apresentaram toxicidade em solução salina com CL₅₀ (24 horas) de 2,03 µg/mL, 1,71 µg/mL e 2,29 µg/mL, além de CL₅₀ (48 horas) de 0,51 µg/mL, 0,54 µg/mL e 0,54 µg/mL, respectivamente. A citotoxicidade verificada por baixo índice mitótico foi observada em *A. cepa*, além de mutagenicidade pelo aumento do número de micronúcleos e alterações cromossômicas. O extrato acetoneitrila, Citrinina e Dicitrinina-A, em concentrações mais baixas, modulam o dano induzido por H₂O₂ nas cepas proficientes e mutantes para a superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial, mas não foram capazes de eliminar o dano causado pelo H₂O₂ quando comparado ao controle negativo. No entanto, o extrato de acetoneitrila a 2 µg/mL e a citrinina nas duas concentrações mais altas não afetaram o dano ao DNA induzido por H₂O₂ nas cepas proficientes e mutadas para superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial, catalase e duplo mutante. As substâncias testadas, principalmente a citrina, apresentaram toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade, além de atividade oxidante.

Palavras-chave: Fungos endofíticos. *Penicillium citrinum*. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Mutagenicidade.

1. INTRODUÇÃO

Fungos derivados de algas marinhas continuam sendo uma fonte importante para a descoberta de vários metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (BLUNT et al., 2008; BLUNT et al., 2009). Os metabólitos secundários de fungos, ou produtos naturais, são conhecidos por possuírem propriedades farmacológicas potentes e têm sido amplamente utilizados em medicamentos para uso humano (GERWICK; FENNER, 2013). Vários estudos sugerem que estes fungos têm uma variedade de potencial biotecnológico, tais como produção de enzimas, agentes de biorremediação, biodegradação, biotransformação, biocontrole e agentes anticancerígenos para a indústria farmacêutica (ARORA; CHANDRA, 2011; YAO et al., 2011; WHEN; GUO; CHEN, 2014; BLUNT et al., 2015; ZHENG et al., 2016).

Entre as várias micotoxinas derivadas de fungos, a citrinina (CIT) é um policetídeo, que foi isolado pela primeira vez por Hetherington e Raistrick a partir de *Penicillium citrinum* (THACKER; CARLTON; SANSING, 1997). A CIT tem boas propriedades antibióticas e estudos têm sido feitos para avaliar sua toxicidade (XU et al., 2006), bem como suas propriedades antitumorais (DU et al., 2010; WANG et al., 2013). Entretanto, a CIT, assim como seu co-produto, um policetídeo conhecido como Dicitrinina-A (DIC-A) tem sido explorado por seus potenciais citotóxicos (YAO et al., 2011), atividade antibacteriana, genotóxico e indutor de apoptose (KUMAR et al., 2014). A CIT foi identificada como importante para terapias antitumorais, devido às suas propriedades antagônicas, como atividade antioxidante e citotoxicidade (LESGARDS et al., 2014). Além disso, devido à sua atividade antioxidante, a CIT tem sido relatado como neuroprotetor, prevenindo a excitotoxicidade do glutamato e morte neuronal (NAKAJIMA et al., 2016).

Para se compreender os efeitos de substâncias naturais obtidas de fungos endofíticos, em relação ao dano ao DNA nuclear, é necessária a aplicação de vários testes não clínicos em células eucarióticas, envolvendo estudos *in vitro* e *in vivo*, como *Artemia salina* e *Allium cepa* para a avaliação da toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade. *A. salina* é um microcrustáceo que fornece importante informação toxicológica (GAJARDO; BEARDMORE, 2012), fácil cultivo, tem baixos custos e está comercialmente disponível (NUNES et al., 2006; SHAALA et al., 2015). O ensaio *A. cepa* é capaz de avaliar diferentes danos no DNA, como efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos, que são analisados pelo número de células em mitose; formação de micronúcleos e alterações cromossômicas (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, o teste pode avaliar as atividades de reparo de DNA (SANTOS; POURRUT; OLIVEIRA, 2016)

e, mais importante, mostra resultados semelhantes em outros sistemas de teste com células procarióticas e eucarióticas (FISKESJÖ, 1985).

A resposta celular ao dano oxidativo/antioxidante ao DNA fúngico é semelhante à resposta de células de mamíferos e 30% dos genes relacionados às doenças humanas apresentam genes funcionais homólogos em leveduras (DE LA TORRE-RUIZ; PUJOL; SUNDARAN, 2015). Os testes com *Saccharomyces cerevisiae* são importantes para medir os mecanismos de alterações na fidelidade da replicação, sensibilidade a danos no DNA, bem como mecanismos de respostas celulares (SKONECZNA; KANIAK; SKONECZNY, 2015), incluindo estresse oxidativo e capacidade antioxidante (DE OLIVEIRA et al., 2014). Portanto, o objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar o extrato acetoneitrila (EACNPc), citrinina e Dicitrinina-A, bem como avaliar suas atividades tóxicas/citotóxicas, mutagênicas e oxidantes/antioxidantes em *Artemia salina*, *Allium cepa* e *Saccharomyces cerevisiae*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta da macroalga *Dichotomaria marginata*

A macroalga vermelha *Dichotomaria marginata* foi coletada em dezembro de 2009 na região norte do estado de São Paulo, na praia de Fortaleza, na cidade de Ubatuba, Brasil (23°24'93"S e 45°03'41"W), durante a maré baixa. A identificação da *D. marginata* foi realizada pelo Dra. Nair Yokoga (Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil) do Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, Brasil. As exsicatas foram depositadas neste herbário (n° SP 40126).

2.2 Procedimentos experimentais

Os solventes de grau analítico (PA) utilizados para extração e fracionamento foram Metanol (MeOH), etil, n-hexano e acetoneitrila (ACN) (Synth, Dynamics, Merck). A fase estacionária utilizada foi Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich para a separação cromatográfica em coluna aberta e os meios sólidos para isolamento e crescimento de microrganismos: arroz parbolizado (Marcon®) e BDA (Ágar Batata Dextrose - Sigma®). RMN de ¹H (500 MHz), RMN de ¹³C (126 MHz), HMBC, HMQC foram obtidos em um espectro Bruker Avance DRX-500 com os solventes CDCl₃, DMSO-d₆ (CIL e Isotec-INC) e o solvente não deuterado como referência interna. A espectrometria de massa de ionização por electropulverização foi obtida

no modo positivo usando Orbitrap XL Hybrid com Transformada de Fourier (Thermo Scientific Instruments), acoplada a um sistema Thermo Instruments CLAE (Accela PDA Detector, amostrador automático Accela e bomba Accela, Thermo Instruments Scientific). As seguintes condições foram utilizadas: tensão capilar de 4,5 kV; temperatura capilar de 260; caudal de gás auxiliar de 10-20 unidades arbitrárias, caudal de gás portador de 40-50 unidades arbitrárias; tensão de pulverização de 4,5 kV; faixa de massa de 100-1000 u.m.a (resolução máxima de 30.000).

2.3 Isolamento e identificação do fungo endofítico

O fungo endofítico *P. citrinum* foi isolado a partir do tecido interno da macroalga vermelha marinha *D. marginata* como descrito por GUBIANI et al (2014). Após o isolamento, a cultura pura de *P. citrinum* foi classificada pela Dr^a. Anil Sazak (Ondokuz Mays Universities Fen Edebiyaties Faculdades Biyoloji Bolumu Kurupelit/Samsun Turkey).

2.4 Obtenção do extrato acetoneitrila do *P. citrinum* (EACNPc) e isolamento dos metabólitos citrinina e dicitrinina-A

O fungo endofítico *P. citrinum* foi cultivado em 5 frascos tipo Erlenmeyer, cada um contendo 90g de arroz. O meio foi autoclavado quatro vezes (em quatro dias consecutivos) a 121° C durante 40 min. Após a esterilização, o meio foi inoculado e incubado a 25° C por 21 dias. No final do período de incubação, as culturas foram combinadas, moídas e extraídas com CH₃OH (5 x 250 mL). O solvente foi evaporado e obtido o extrato bruto de CH₃OH, que foi dissolvido em CH₃CN e hexano particionado para obter o extrato acetoneitrila (EACNPc).

A proporção (900 mg) do EACNPc foi fracionada pela coluna cromatográfica Sephadex LH-20 (70 cm x 3.0 cm) e eluída com MeOH: DCM (1: 1), produzindo 45 frações de aproximadamente 80 mL cada. A análise por CCD e CLAE-DAD/EM-IES [Coluna C18; MeOH: H₂O (5-100% MeOH), 254 nm] permitiu o seu agrupamento em 16 novos grupos de frações, através da similaridade dos cromatogramas (FDm1Se-FDm16Se). A fração FDm9Se (79 mg) após lavagem com metanol, forneceu a substância citrinina (30 mg) e a FDm11Se (198 mg) foi recromatografada em coluna de Sephadex LH-20 (70 cm x 3 cm) e eluída isocraticamente com sistema de solvente CHCl₃/MeOH (1/1). Do fracionamento foram coletadas 22 subfrações, que resultou no isolamento da dicitrinina-A (27 mg da subfração 3).

2.5 Bioensaio de letalidade do microcrustáceo marinho *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade por microcrustáceos foi conduzido de acordo com o método descrito por Meyer et al. (1982). Cistos de *A. salina* foram incubados em água salgada artificial (23 g de NaCl, 11 g de MgCl₂.6H₂O, 4 g de Na₂SO₄, 1,3 g de CaCl₂.2H₂O ou 1,3 g de CaCl₂.6H₂O e 0,7 g de KCl em 1000 mL de água) a 25-30° C. O bicarbonato de sódio (Na₂CO₃) foi utilizado como agente tampão para o ajuste do pH (9,0). Após 48 horas, dez náuplios de *Artemia salina* foram coletadas e transferidas para o tubo de ensaio. O volume final de cada amostra foi de 5 mL de solução salina e água mineral (1:1). Soluções de EACNPc, CIT e DIC-A foram preparadas em quadruplicata, nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL, concentrações obtidas a partir do ensaio de viabilidade celular MTT em cultura celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, sugerido por Andrade (2014). Após 24 h e 48 h, o número de náuplios vivos foi registrado. Salina artificial e dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL, foram utilizados como controle negativo (CN) e controle positivo (CP), respectivamente.

2.6 Avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade em *Allium cepa*

Bulbos médios de *A. cepa* foram obtidos da empresa Centro de Abastecimento - CEAPI em Teresina- Piauí, em 2017. O teste *A. cepa* foi realizado de acordo com Fiskesjö (1985). Resumidamente, as cebolas foram mantidas em contato direto com EACNPc, CIT e DIC-A por 48h, a uma temperatura de 25 ± 1°C, protegidas da luz e manutenção da solução a cada 24 horas. As concentrações testadas foram de 0,5; 1,0; 1,5 e 2µg/ml, concentrações obtidas a partir do ensaio de viabilidade celular MTT em cultura celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, sugerido por Andrade (2014). Os controles positivos (CP) e negativo (CN) foram compostos de sulfato de cobre (CuSO₄) a 6 µg / mL e água da torneira desclorada respectivamente. Após o tratamento, as raízes foram removidas e fixadas por 24 horas em Carnoy (3: 1). As raízes foram lavadas com água destilada (3 banhos de 5 minutos cada), a hidrólise da raiz foi realizada com 1NHCl a 60°C, durante 11 minutos e mais uma lavagem. As estruturas basofílicas foram coradas com reagente de Schiff, durante 2 horas, e depois enxaguadas com água corrente. Para a montagem das lâminas, a região meristemática da raiz foi removida com um bisturi e uma gota de carmim acético a 2% foi adicionada, para corar a região nuclear, e posteriormente coberta com lamínula. Uma rápida pressão foi exercida na lamínula para espalhar as células meristemáticas por toda a lâmina.

A citotoxicidade (índice mitótico, IM) e a mutagenicidade (alterações cromossômicas, AC) foram avaliadas pela contagem de 5.000 células meristemáticas (unidade experimental: 1000 células/lâmina, total de 5 lâminas por tratamento) sob microscópio de luz DM 500 (400x). A genotoxicidade inclui efeitos aneugênicos (metáfases C, metáfases com aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares e metáfases poliplóides) ou efeitos clastogênicos (fragmentos cromossômicos, pontes cromossômicas e outras alterações). Além disso, a presença ou ausência de MN, que pode resultar de efeitos aneugênicos ou clastogênicos, também foi avaliada juntamente com outras alterações cromossômicas (MAZZEO et al., 2011).

2.7 Avaliação oxidativa / antioxidante em *Saccharomyces cerevisiae*

As cepas de *S. cerevisiae* utilizadas para o teste antioxidante incluíram a superóxido dismutase citoplasmática proficiente (SodWT), três cepas deficientes simples (Sod1Δ, Sod2Δ e Cat1Δ) e duas cepas duplamente deficientes (Sod1Δ/Sod2Δ e Sod1Δ/Cat1Δ) (**Tabela 1**). Essas cepas foram proficientes e deficientes em Superóxido Dismutase (Sod) e Catalase (Cat). Foram gentilmente cedidas pelo Grupo de Pesquisa em Genética Toxicológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para o ensaio, as cepas de *S. cerevisiae* foram replicadas em meio sólido YEPD (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona e 2% de ágar) e armazenadas sob condições apropriadas de acordo com Andrade et al. (2011). Células em suspensão foram semeadas do centro para a borda de uma placa de petri em um ciclo contínuo, para ambos os lados da placa contendo, no centro, um disco de papel de filtro estéril, no qual foram adicionados 10 µL das substâncias de teste.

Tabela 1: Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

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

Fonte: Adaptado de ANDRADE et al., 2011 e OLIVEIRA et al., 2014.

As cepas de *S. cerevisiae* (Sodwt, Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1Δ/Sod2Δ, Cat1Δ, Sod1Δ/Cat1Δ) foram semeadas em placas de petri do centro até a margem, onde um disco de papel de filtro,

estéril, foi colocado no centro da placa e acrescido 10 µL de EACNPc, CIT e DIC-A (nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL e 2,0 µg/mL). Esses isolados foram submetidos a três diferentes condições de tratamento (pré-tratamento, cotratamento e pós-tratamento). No pré-tratamento, as concentrações das amostras testadas foram primeiro adicionadas a um disco de papel de filtro no centro da placa YEPD e, duas horas depois, o agente oxidante (peróxido de hidrogênio a 30%) foi adicionado. Em cotratamento, as amostras e 30% de peróxido de hidrogênio foram adicionados simultaneamente. No pós-tratamento, o peróxido de hidrogênio a 30% foi adicionado pela primeira vez e as concentrações da amostra foram adicionadas duas horas depois. Após 48 horas de incubação, em estufa a 30°C, o halo de inibição do crescimento foi medido em milímetros (mm) a partir da margem do disco de papel de filtro para a iniciação do crescimento celular. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O controle positivo utilizado foi de apenas 20 µL de peróxido de hidrogênio a 30%.

2.7 Análises estatísticas

Os dados de *Artemia salina* foram normalizados, transformados em logaritmo e submetidos à análise de regressão não linear, para determinar a concentração que causa a morte de 50% dos microcrustáceos (CL50). Os resultados de *Allium cepa* e *Saccharomyces cerevisiae* foram expressos como média ± DP. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 6.0). As análises foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey e do teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$, com nível de confiança de 95%.

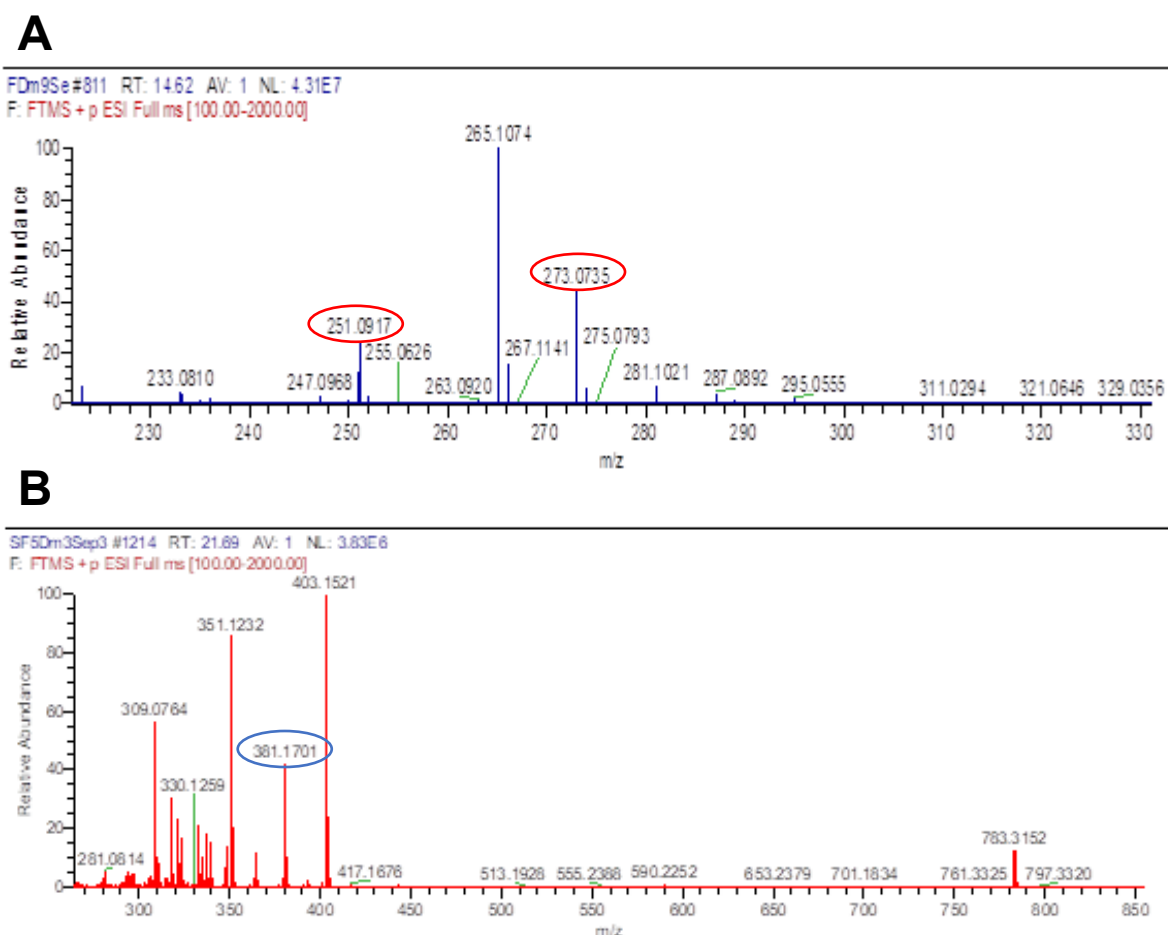
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos metabólitos CIT e DIC-A

A análise de RMN ¹H e ¹³C revelou a substância CIT, HRESIMS m/z [M + H]⁺ + 251,0917 (calculada para C₁₃H₁₄O₅) e m/z 273,0735 [M + Na]⁺ + (**Figura 1A**). ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) 8,23 (s, H-1), 4,76 (qd, $J = 6,8$, H-3), 2,97 (qd, H-4), 1,23 (d, $J = 6,8$, H-9), 1,35 (d, $J = 7,2$, H-10), 2,01 (s, H-11) e Dicitrinina-A, HRESIMS m/z [M + H]⁺ + 381,1701 [M + H]⁺, (calculado para C₂₃H₂₄O₅), incluindo m/z 403,1521 [M + Na]⁺ + m/z 783,3252 [2M + H]⁺ + (**Figura 1B**). ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) 6,39 (s, H-7), 4,98 (qd, $J = 8,5$, H-3), 4,62

(m, H-2'), 3,16 (m, H-3'), 3,12 (m, H-4), 2,11 (s, H-11), 1,33 (d, J = 9,0, H-9'), 1,41 (d, J = 8,0, H-8'), 1,43 (d, J = 8,5, H-9), 1,31 (d, J = 7,0, H-10), 2,20 (s, H-10'). As substâncias foram identificadas de acordo com Yao et al. (2011) e Wakana et al. (2006).

Figura 1. Espectro de massa (EM-IES (+)) da Citrinina (A) e Dicitrinina-A (B).



3.2 Bioletalidade do extrato acetonitrila (EACNPc) e os metabólitos CIT e DIC-A, isolados do *P. citrinum* em *Artemia salina*.

O EACNPc e metabólitos CIT e DIC-A mostraram toxicidade em *A. salina* com CL_{50} por 24 h de: 2,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (com IC 95% de 1,59 – 2,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 1,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC 95% de 1,41 – 2,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 2,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC 95% de 1,69 – 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente. Dentro de 48 horas, a CL_{50} foi de 0,51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC 95% de 0,39 – 0,69 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 0,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC 95% de 0,39 – 0,73 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 0,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC 95% de 0,34 – 0,85 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente. A CL_{50} para o controle positivo dicromato de potássio (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em 24h, foi de 1,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC 95% de 0,93 – 1,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e, em 48h, foi de 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC 95% de 0,59 – 0,85 $\mu\text{g}/\text{mL}$),

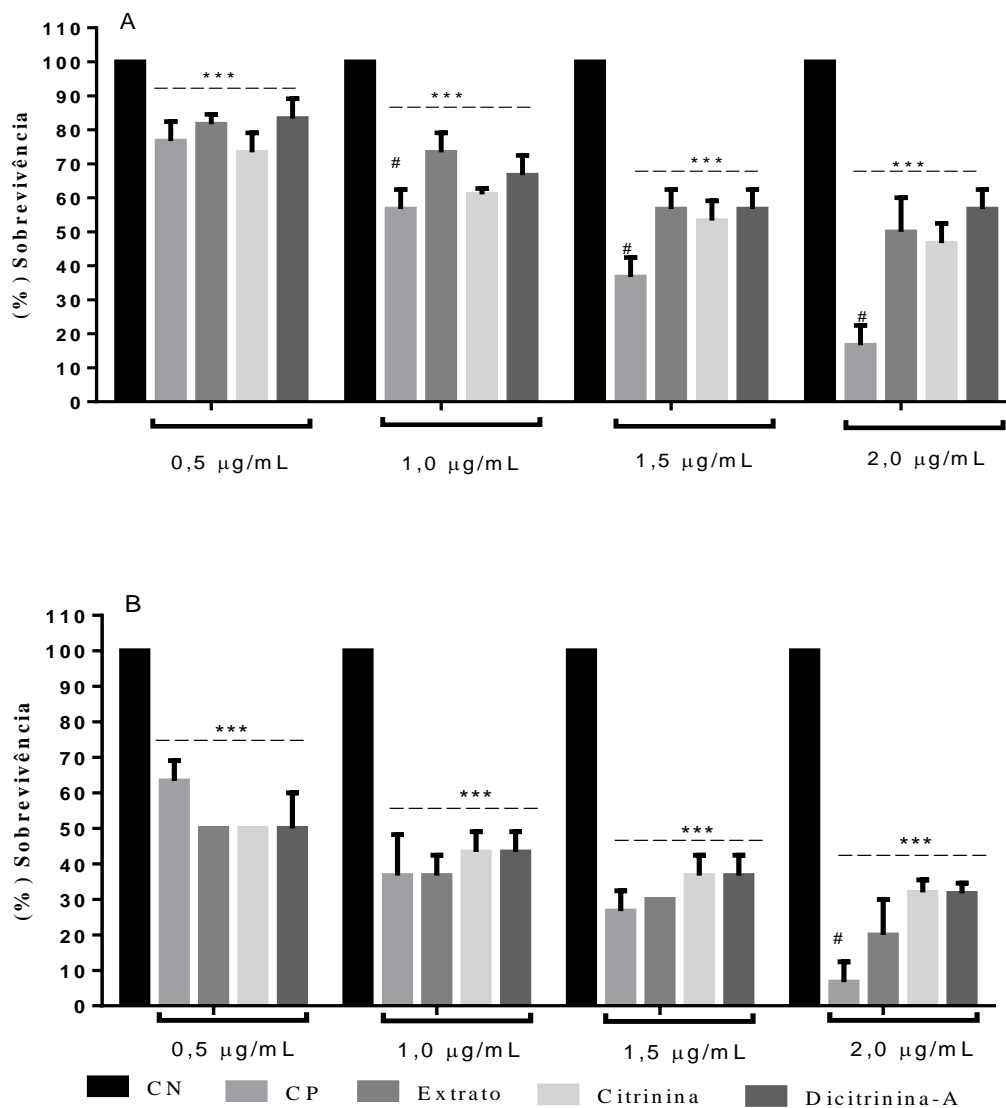
dados não apresentados. A avaliação da letalidade em *A. salina* foi sugerida como um teste toxicológico para várias substâncias, incluindo extratos e produtos naturais (SANGIAN et al., 2013, ISLAM et al., 2017). Os compostos com baixa CL_{50} podem ter potencial atividade antitumoral (NUNES et al., 2008; ARCANJO et al., 2012). Estudos indicam que a CIT induz toxicidade dérmica e apoptose na pele de ratos, como acontece com outras micotoxinas, possivelmente devido ao estresse oxidativo (FLAJS et al., 2008).

A DIC-A é um policetídeo, coproduto da citrinina (citrinina dimérica) (CLARK et al., 2006) e também denominada Penicitrinona-A (WAKANA et al., 2006). A DIC-A tem uma CI_{50} de $58,4 \pm 4,0 \mu\text{M}$ (NONG et al., 2013) e é conhecida por inibir a proteína tirosina fosfatase 2 (Shp2), que é uma proteína associada ao câncer de mama e outros tipos de neoplasias, como leucemia, pulmão, câncer de fígado e estômago. Além disso, o Shp2 está envolvido em vários processos relacionados ao câncer, incluindo metástase, apoptose, dano ao DNA, proliferação celular e resistência a drogas (ZHANG; ZHANG; NIU, 2015).

O EACNPc, CIT e DIC-A induziram toxicidade em *A. salina* (24h) em todas as concentrações testadas (0,5; 1,0; 1,5 e 2 $\mu\text{g/mL}$) conforme observado pela redução da taxa de sobrevivência em relação ao CN. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as substâncias e concentrações, assim como em relação ao CP. A exposição ao CP reduziu significativamente a sobrevivência em relação aos isolados, especialmente em concentrações mais altas (**Figura 2A**). Dados semelhantes foram observados na exposição de 48 horas, exceto Citrinina e Dicitrinina-A em concentração mais alta, na qual a taxa de sobrevivência dos náuplios foi estatisticamente diferente do CP (**Figura 2B**).

Na busca por novos fármacos, a CIT tem sido extensivamente estudada por suas propriedades tóxicas (BLASKÓ et al., 2013), incluindo nefrotoxicidade, hepatotoxicidade (BENNETT; KLICH, 2003; FLAJS; PERAICA, 2009 ; SHI; PAN, 2012; EFSA, 2012), citotoxicidade e genotoxicidade (CHANG et al., 2009), bem como atividades neuroprotetora e antioxidante (NAKAJIMA et al., 2016).

Figura 2. Percentual de sobrevivência dos náuplios de *A. salina* em exposição ao EACNPc e isolados do *P. citrinum*: CIT e DIC-A. Tempo de 24 h (A) e 48 h (B). Valores representam média \pm desvio-padrão. CN: células não tratadas. CP: Dicromato de potássio. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ em comparação com o grupo CN. O # comparado aos isolados. ANOVA two-way. Teste de Tukey com comparações múltiplas.



3.2 Danos citotóxicos e mutagênicos do EACNPc, CIT e DIC-A do *P. citrinum* em meristemas de raízes de *Allium cepa*

O EACNPc e isolados de *P. citrinum* (CIT e DIC-A) induziram citotoxicidade em todas as concentrações testadas em células meristemáticas de *A. cepa*, aumentando o número de interfases e reduzindo o número de células em divisão (**Tabela 2**).

As alterações tóxicas e citotóxicas estão relacionadas aos efeitos dos antineoplásicos, uma vez que induzem a apoptose (JORDAN; WILSON, 2004; XIAO et al., 2003). Nesse

sentido, a CIT, em concentrações de 20 a 100 μM , tem sido relatada como indutora de apoptose em várias linhagens celulares humanas, incluindo células leucêmicas (YU et al., 2006; CHAN, 2007). Em 50 μM , a CIT não foi citotóxica, mas afetou a organização dos microtúbulos, o que é um fator de risco para a carcinogênese (YU et al., 2015; GAYATHRI et al., 2015). A citotoxicidade da CIT pode estar associada a alterações mitocondriais e ao fluxo e permeabilidade dos íons cálcio, como observado nas membranas celulares renal e hepática e desta forma contribuindo para a indução de apoptose (CHAGAS et al., 1995; DALOZZO; OLIVEIRA; CARNIERI, 1998). O índice mitótico de células meristemáticas de *A. cepa* identifica, com segurança, efeitos citotóxicos, de modo que, quando o índice mitótico apresenta uma redução de 50% na comparação com o controle negativo, é considerado um efeito subletal (MESI; KOPLICU, 2013).

É válido salientar que a mutagenicidade dos isolados de *P. citrinum* foi avaliada por dano citogenético, incluindo formação de micronúcleos e aumento de aberrações cromossômicas da c-metáfase, pontes, cromossomos soltos e atrasos anafásicos, levando a um aumento significativo das aberrações cromossômicas. EACNPc, CIT, DIC-A, nas concentrações testadas, induziram alterações cromossômicas significativas (AC), no entanto, para EACNPc e DIC-A, o número aumentado de micronúcleos foi encontrado apenas nas duas concentrações mais altas e na maior concentração testada, respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 2. Citotoxicidade do EACNPc e isolados do *P. citrinum*: Citrinina e Dicitrinina-A, em células meristemáticas de *Allium cepa* após 48 horas de exposição.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Intérfase					Índice Mitótico (%)
			Prófase (P)	Metáfase (M)	Anáfase (A)	Telófase (T)	
Controle Negativo	-	439,4 ± 9,1	458,8 ± 18,9	43,4 ± 7,1	29,8 ± 3,1	28,6 ± 3,0	56,0 ± 0,9
Sulfato de cobre	6,0	876,8 ± 15,6***	62,6 ± 14,6***	29,0 ± 5,4*	18,8 ± 3,3*	13,6 ± 2,3*	12,4 ± 1,5***
EACNPc	0,5	585,2 ± 28,5***	357,6 ± 22,8***	24,4 ± 12,0**	15,6 ± 7,1*	16,8 ± 3,3*	41,3 ± 2,1***
	1,0	545,2 ± 23,1***	399,0 ± 18,2***	25,0 ± 7,5**	17,0 ± 3,7*	13,4 ± 1,9*	45,4 ± 1,8***
	1,5	561,2 ± 11,9***	361,4 ± 6,8***	29,0 ± 6,4*	23,4 ± 3,1	25,0 ± 1,2	43,8 ± 1,2***
	2,0	597,6 ± 12,2***	329,2 ± 8,8***	24,2 ± 2,9**	25,2 ± 2,1	23,8 ± 2,1	40,2 ± 1,2***
Citrinina	0,5	559,2 ± 28,0***	367,0 ± 24,8***	22,8 ± 5,9**	23,4 ± 8,5	27,2 ± 4,4	44 ± 2,4***
	1,0	613,2 ± 35,9***	332,2 ± 38,7***	27,5 ± 4,0**	14,8 ± 6,4*	13,2 ± 1,80**	38,7 ± 3,6***
	1,5	589,2 ± 56,6***	367,2 ± 38,3***	16,0 ± 5,5***	11,2 ± 1,8*	17,2 ± 7,1*	41,2 ± 4,1***
	2,0	623,0 ± 13,5***	326,4 ± 17,5***	22,6 ± 5,7**	10,6 ± 2,5**	17,4 ± 1,6*	37,7 ± 1,3***
Dicitrinina-A	0,5	569,8 ± 96,6***	359,2 ± 57,0***	21,4 ± 2,8**	23,6 ± 2,8	26,0 ± 2,1	43 ± 5,9***
	1,0	591,8 ± 19,6***	344,4 ± 21,8***	18,6 ± 1,7***	21,6 ± 1,3*	23,6 ± 1,5	40,8 ± 2,0***
	1,5	603,2 ± 14,3***	327,2 ± 13,9***	23,4 ± 2,0**	24,4 ± 2,3	21,8 ± 1,6*	39,7 ± 1,4***
	2,0	626,4 ± 19,3***	305,4 ± 19,0***	20,0 ± 2,5**	23,0 ± 3,1	25,2 ± 2,2	37,4 ± 1,9***

Média ± desvio padrão de 5000 células (n = 5 bulbos / grupo). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 comparado ao controle negativo. ANOVA com pós-teste Tukey por múltiplas comparações.

Tabela 3. Efeitos mutagênicos do EACNPc e isolados do *P. citrinum* (CIT, DIC-A) em células meristemáticas de *Allium cepa*, após 48 h de exposição por formação de micronúcleos e aberrações cromossômicas. AC (aberrações cromossômicas).

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Tipos de alterações cromossômicas (AC)					Total
		Micronúcleos	c-metáfase	Pontes	Perda de cromossomo	Atrasos	
Controle negativo	-	0,6 ± 0,4	0,8 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,4	3,4 ± 0,5
Sulfato de cobre	6,0	3,4 ± 1,1***	4,8 ± 0,8***	5,0 ± 2,3***	10,2 ± 0,8***	10,2 ± 0,8***	33,6 ± 3,7***
EACNPc	0,5	0,8 ± 0,0	3,4 ± 0,5*	2,8 ± 1,3*	1,8 ± 1,0	3,0 ± 2,2*	15,4 ± 2,9*
	1,0	2,2 ± 1,0	3,0 ± 0,7*	2,6 ± 1,0*	3,0 ± 1,4*	3,4 ± 0,7*	15,0 ± 1,3***
	1,5	3,0 ± 0,8*	4,6 ± 1,5*	3,6 ± 0,8*	3,6 ± 1,0*	3,8 ± 1,0*	17,8 ± 4,6***
	2,0	4,4 ± 1,1**	4,0 ± 1,0*	4,4 ± 2,6**	4,6 ± 1,5**	3,0 ± 0,8*	16,8 ± 1,8***
CIT	0,5	1,8 ± 1,1*	2,6 ± 1,9*	1,8 ± 1,4*	1,2 ± 0,7	4,2 ± 2,4**	12,6 ± 2,9*
	1,0	1,9 ± 1,1*	4,2 ± 1,1*	3,2 ± 2,1**	0,6 ± 0,4	7,6 ± 1,6**	19,2 ± 1,3***
	1,5	2,2 ± 1,2*	3,6 ± 1,5*	2,0 ± 1,0**	4,6 ± 1,6**	7,2 ± 2,3*	19,6 ± 4,6***
	2,0	3,6 ± 1,5*	4,2 ± 0,8**	4,2 ± 1,3***	5,6 ± 1,1***	5,8 ± 0,8***	21,6 ± 1,8***
DIC-A	0,5	0,6 ± 0,3	3,2 ± 0,8*	3,8 ± 0,8**	3,2 ± 1,1**	2,2 ± 1,3	13,8 ± 1,9*
	1,0	0,2 ± 0,4	2,8 ± 1,3*	3,8 ± 1,3**	4,0 ± 1,5**	1,2 ± 0,4	12,0 ± 3,2*
	1,5	0,2 ± 0,4	4,2 ± 1,3**	3,8 ± 0,8**	4,8 ± 1,3***	2,0 ± 0,7	15,0 ± 1,4*
	2,0	2,4 ± 0,5*	4,4 ± 1,1**	4,8 ± 1,4**	6,2 ± 1,6***	2,0 ± 1,0	18,0 ± 2,3***

Média ± desvio padrão de 5000 células (n = 5 bulbos/grupo) * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 comparadas ao controle negativo. ANOVA com Tukey Post-test, por múltiplas comparações.

A formação de micronúcleos é um processo de alteração nuclear irreversível e é resultado do processo final de alterações do DNA. Este parâmetro é comumente usado para detectar danos no DNA após a exposição a agentes mutagênicos (FERNANDES et al., 2007). Há relatos de citotoxicidade e genotoxicidade da CIT em células embrionárias, como observado pela indução de diferentes mecanismos, incluindo a formação de espécies reativas de oxigênio, produção de óxido nítrico, superexpressão de Bcl e Bcl-2, perda de membrana mitocondrial, liberação de citocromo-c, ativação de caspase-9 e ativação de caspase-3, p21, quinase 2 e c-JUN N-terminal. Além disso, a CIT também causa apoptose devido à inativação de HSP90, uma proteína chaperona, e à degradação das proteínas quinases Ras e Raf 1 (CHAN, 2008).

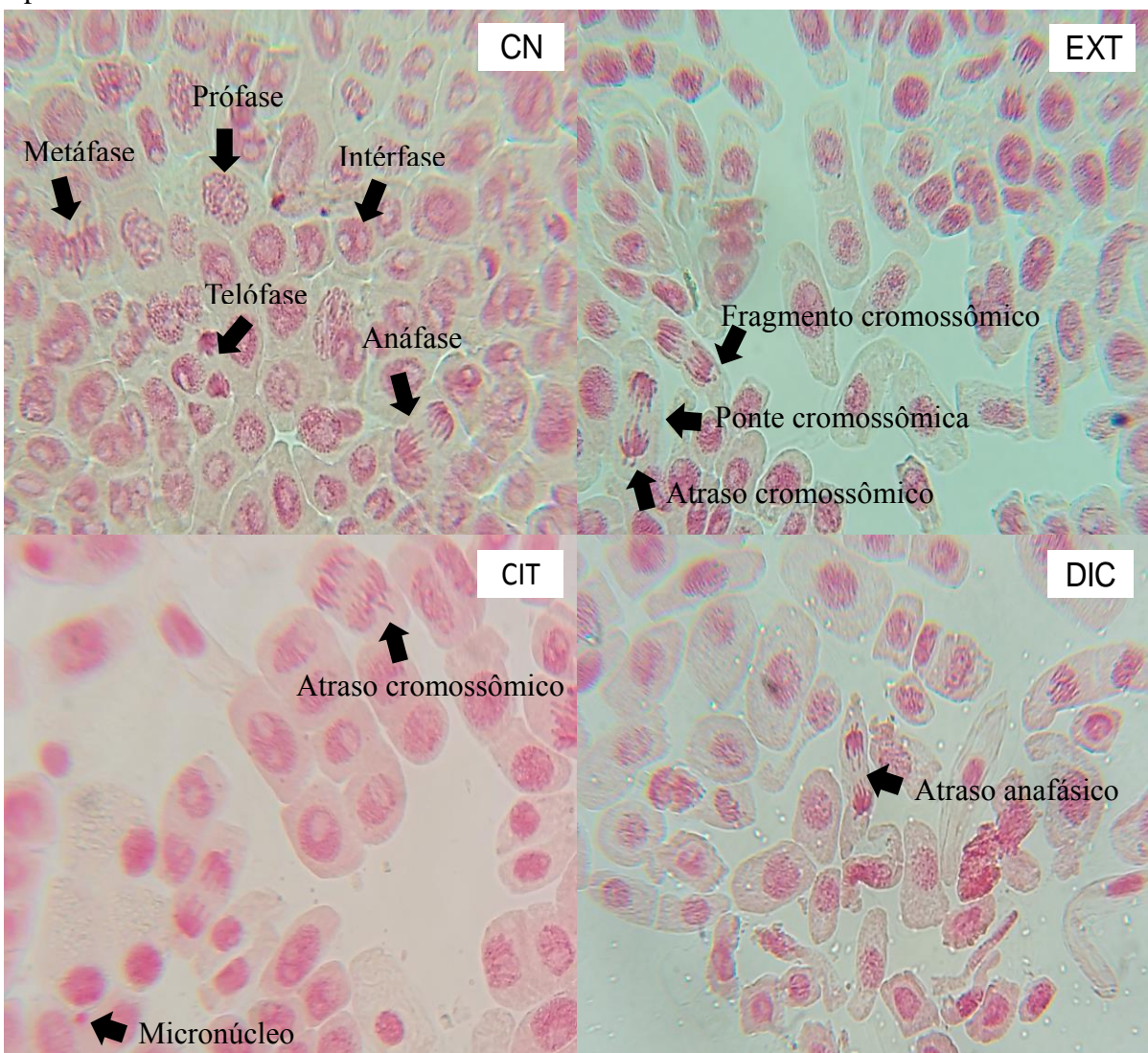
Há vários estudos mostrando que os policetídeos podem induzir apoptose e formação de micronúcleos (YU et al., 2006; CHAN, 2007; DÖNMEZ-ALTUNTAS et al., 2007). A CIT induz danos no DNA, devido à formação de EROs por meio da ativação do MAPK (CHAN; WU; SHIAO, 2007; FARRUGIA; BALZAN, 2012). Em ratos, altas doses de CIT aumentam a expressão de mRNA para os fatores de transcrição Ccna2, Ccnb1 e E2f1, levando a modificações do ciclo celular, aberrações cromossômicas e genotoxicidade (LIU et al., 2003; KNASMÜLLER et al., 2004; BOUSLIMI et al., 2008; FOLKMANN et al., 2009; CHANG et al., 2011; KURODA et al., 2013).

As aberrações cromossômicas, durante o ciclo celular induzidas por compostos químicos, são indicativas de mutagenicidade e citotoxicidade (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013). No entanto, as aberrações aumentadas encontradas, como c-metáfases e cromossomos soltos, não são, necessariamente, devido a efeitos clastogênicos diretos, mas sim a um efeito resultante da quebra do mecanismo de divisão celular durante a mitose, que é controlada pelo citoesqueleto celular e microtúbulos (ELEFThERIOU; ADAMAKIS; MELISSA, 2012).

Analisando os efeitos do EACNPc, CIT e DIC-A nas células de *A. cepa*, foi possível observar numerosas células em intérfase, bem como aberrações cromossômicas, como fragmentos cromossômicos, pontes de anáfase, cromossomos atrasados e formação de micronúcleos (**Figura 3**). Anormalidades cromossômicas podem levar à apoptose. A administração de 0,9 mg/kg ou 0,1 mg/kg de CIT em ratos induz aberrações cromossômicas e quebras de cadeia dupla, bem como aneuploidia devido à parada do ciclo celular (JESWAL, 1996; YU et al., 2006). Efeitos genotóxicos também foram observados com o ensaio cometa em células Vero (YU et al., 2006).

Há evidências de que a CIT induz nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em linhagens celulares, modelos animais (ALEO et al., 1991; KOGIKA, HAGIWARA; MIRANDA, 1993) e adenoma renal (ARAI; HIBINO, 1983). CIT induz nefrotoxicidade por mecanismos associados à parada do ciclo celular e formação de microtúbulos evidenciados nas células HEK293, mas também altera a expressão das proteínas p53 e p21 durante o ciclo celular, interferindo no processo de divisão celular (CHANG et al., 2009).

Figura 3. Divisão celular e aberração cromossômica em células meristemáticas em *A. cepa* CN: controle negativo. EXT: EACNPc. CIT: Citrinina. DIC-A: Dicitrinina - 400x microscópio óptico.



3.3 Efeitos de isolados de *P. citrinum* na prevenção, atividades antioxidantes e reparo de DNA em danos induzidos por H₂O₂ em *Saccharomyces cerevisiae*

O EACNPc e isolados de *P. citrinum* (CIT e DIC-A) modularam em todas as concentrações, os efeitos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ em *S. cerevisiae* proficiente e mutada. No entanto, os isolados não apresentaram efeitos preventivos para todos os danos induzidos pelo H₂O₂ quando comparados ao CN (**Tabela 4**).

Tabela 4. Pré-tratamento em linhagens de *S. cerevisiae* com extrato de acetatonitrila: EACNPc, Citrinina: CIT e Dicitrinina-A: DIC-A. Os valores correspondem a média \pm desvio padrão da medição dos halos de inibição (mm).

Grupos	SODWT	Sod1 Δ	Sod2 Δ	Sod1 Δ /Sod2 Δ	Cat1 Δ	Sod1 Δ /Cat1 Δ	
Salina 0,9%	0,50 \pm 0,58	0,50 \pm 0,61	0,37 \pm 0,39	0,41 \pm 0,45	0,52 \pm 0,49	0,50 \pm 0,55	
H ₂ O ₂	11,25 \pm 0,9 ^a	15,00 \pm 2,16 ^a	15,00 \pm 0,81 ^a	20,25 \pm 1,70 ^a	20,00 \pm 2,06 ^a	22,00 \pm 1,82 ^a	
EACNPc	0,5 μ g/mL	3,25 \pm 0,50 ^{ab}	4,50 \pm 0,58 ^{ab}	4,25 \pm 0,96 ^{ab}	3,5 \pm 0,58 ^{ab}	4,25 \pm 0,50 ^{ab}	6,75 \pm 0,96 ^{ab}
	1,0 μ g/mL	2,00 \pm 0,00 ^b	7,25 \pm 0,96 ^{ab}	7,75 \pm 0,96 ^{ab}	7,25 \pm 1,50 ^{ab}	7,00 \pm 0,82 ^{ab}	3,00 \pm 0,81 ^{ab}
	1,5 μ g/mL	5,50 \pm 0,58 ^{ab}	6,25 \pm 0,96 ^{ab}	7,75 \pm 0,50 ^{ab}	6,5 \pm 0,58 ^{ab}	8,25 \pm 0,50 ^{ab}	6,00 \pm 0,58 ^{ab}
	2,0 μ g/mL	6,75 \pm 0,50 ^{ab}	8,0 \pm 1,15 ^{ab}	7,25 \pm 0,96 ^{ab}	7,25 \pm 0,96 ^{ab}	5,25 \pm 0,50 ^{ab}	6,00 \pm 0,82 ^{ab}
CIT	0,5 μ g/mL	8,75 \pm 0,50 ^{ab}	7,50 \pm 0,58 ^{ab}	8,75 \pm 0,58 ^{ab}	6,00 \pm 0,82 ^{ab}	6,25 \pm 0,96 ^{ab}	3,80 \pm 1,00 ^{ab}
	1,0 μ g/mL	6,75 \pm 0,50 ^{ab}	7,25 \pm 0,96 ^{ab}	9,00 \pm 0,82 ^{ab}	6,00 \pm 0,00 ^{ab}	5,75 \pm 0,96 ^{ab}	6,50 \pm 0,57 ^{ab}
	1,5 μ g/mL	10,25 \pm 0,96 ^a	8,50 \pm 0,58 ^{ab}	8,75 \pm 0,50 ^{ab}	7,25 \pm 0,96 ^{ab}	7,75 \pm 0,96 ^{ab}	7,00 \pm 0,82 ^{ab}
	2,0 μ g/mL	9,75 \pm 1,25 ^{ab}	7,00 \pm 1,15 ^{ab}	9,75 \pm 0,96 ^{ab}	8,25 \pm 0,96 ^{ab}	8,75 \pm 0,96 ^{ab}	9,50 \pm 0,58 ^{ab}
DIC - A	0,5 μ g/mL	2,00 \pm 0,00 ^b	4,50 \pm 0,58 ^{ab}	7,00 \pm 0,82 ^{ab}	7,25 \pm 0,96 ^{ab}	4,50 \pm 0,58 ^{ab}	3,50 \pm 0,50 ^{ab}
	1,0 μ g/mL	8,00 \pm 0,82 ^{ab}	6,00 \pm 0,82 ^{ab}	6,25 \pm 0,50 ^{ab}	7,75 \pm 0,96 ^{ab}	7,25 \pm 1,00 ^{ab}	8,25 \pm 0,96 ^{ab}
	1,5 μ g/mL	6,50 \pm 0,58 ^{ab}	8,50 \pm 0,58 ^{ab}	8,25 \pm 0,50 ^{ab}	8,00 \pm 0,82 ^{ab}	6,75 \pm 0,96 ^{ab}	7,25 \pm 0,50 ^{ab}
	2,0 μ g/mL	6,70 \pm 0,50 ^{ab}	7,25 \pm 0,50 ^{ab}	8,0 \pm 1,15 ^{ab}	8,25 \pm 0,50 ^{ab}	9,25 \pm 0,96 ^{ab}	7,50 \pm 0,50 ^{ab}

Análise de variância - ANOVA, two-way, pós-teste de Bonferroni. p^a <0,01 comparado com o controle negativo (solução salina a 0,9%); p^b <0,01 comparado ao controle positivo (Peróxido de Hidrogênio - 30% H₂O₂).

O EACNPc e isolados (CIT e DIC-A) na maioria das concentrações modularam os efeitos do H₂O₂, mas não eliminaram seus danos oxidativos quando comparados ao CN. Efeitos antioxidantes foram observados nas duas concentrações mais baixas de EACNPc para todas as linhagens, e em todas as concentrações para o duplo mutante Sod1 Δ /Cat1 Δ , quando comparado ao CP. Por outro lado, CIT e DIC-A não induziram efeitos antioxidantes (protetores) na concentração de 2 μ g/mL (**Tabela 5**) devido aos seus efeitos oxidativos nesta concentração (dados não mostrados). Segundo Iwahashi et al. (2007), a CIT inibe o crescimento de *S.*

cerevisiae apenas em concentrações superiores a 100 µg / mL, mas, em nosso estudo, concentrações de apenas 2 µg/mL produziram danos oxidativos.

Tabela 5. Efeitos antioxidantes do extrato acetonitrila (EACNPc) e isolados do *P. citrinum* (Citrinina: CIT e Dicitrinina-A: DIC-A) em linhagens de *S. cerevisiae*.

Grupos	SODWT	Sod1A	Sod2A	Sod1A/Sod2A	Cat1A	Sod1A/Cat1A	
Salina 0,9%	0,50 ± 0,57	0,50 ± 0,57	0,50 ± 0,57	0,50 ± 0,57	0,50 ± 0,57	0,50 ± 0,57	
H ₂ O ₂	11,25 ± 0,95 ^a	15,00 ± 2,16 ^a	15,00±0,81 ^a	17,25 ± 1,7 ^a	15,00 ± 2,06 ^a	16,00 ± 1,82 ^a	
EACNPc	0,5 µg/mL	0,75±0,95 ^b	1,75±0,50 ^b	1,00 ± 1,15 ^b	1,75 ± 0,50 ^b	2,25 ± 1,70 ^b	0,25 ± 0,50 ^b
	1,0 µg/mL	1,25 ± 0,95 ^b	3,00 ± 0,82 ^b	2,25 ± 0,50 ^b	6,25 ± 0,50 ^{ab}	4,75 ± 0,95 ^{ab}	0,25 ± 0,50 ^b
	1,5 µg/mL	2,50 ± 1,29 ^{ab}	5,75 ± 0,96 ^{ab}	2,25 ± 0,96 ^b	7,25 ± 0,96 ^{ab}	6,25 ± 0,96 ^{ab}	0,25 ± 0,50 ^b
	2,0 µg/mL	2,75 ± 0,96 ^{ab}	4,5 ± 1,29 ^{ab}	1,25 ± 0,96 ^b	8,50 ± 0,58 ^{ab}	4,25 ± 0,96 ^{ab}	1,75 ± 1,26 ^b
CIT	0,5 µg/mL	3,75 ± 1,26 ^{ab}	8,75 ± 1,50 ^{ab}	6,25 ± 1,26 ^{ab}	6,00 ± 1,15 ^{ab}	6,75 ± 1,50 ^{ab}	5,25 ± 0,96 ^{ab}
	1,0 µg/mL	5,75 ± 0,96 ^{ab}	9,00 ± 0,82 ^{ab}	8,00 ± 0,82 ^{at}	7,75 ± 1,26 ^{ab}	6,00 ± 0,00 ^{ab}	6,75 ± 0,50 ^{ab}
	1,5 µg/mL	6,00 ± 1,15 ^{ab}	8,75 ± 0,96 ^{ab}	7,25 ± 0,96 ^{ab}	6,75 ± 0,96 ^{ab}	7,25 ± 0,96 ^{ab}	7,00 ± 0,82 ^{ab}
	2,0 µg/mL	8,25 ± 1,26 ^a	9,25 ± 1,26 ^a	8,00 ± 0,82 ^{ab}	8,00 ± 1,29 ^a	9,00 ± 0,58 ^{ab}	8,00 ± 1,41 ^a
DIC - A	0,5 µg/mL	5,50 ± 0,58 ^{ab}	5,75 ± 0,96 ^{ab}	5,00 ± 1,41 ^{ab}	7,25 ± 0,96 ^{ab}	5,50 ± 0,58 ^{ab}	3,75 ± 0,96 ^{ab}
	1,0 µg/mL	6,75 ± 0,96 ^{ab}	9,00 ± 0,82 ^{ab}	6,00 ± 0,82 ^{ab}	8,29 ± 0,96 ^{ab}	8,00 ± 0,82 ^{ab}	4,25 ± 0,50 ^{ab}
	1,5 µg/mL	6,25 ± 1,26 ^{ab}	9,25 ± 0,96 ^{ab}	7,75 ± 0,96 ^{ab}	7,00 ± 0,82 ^{ab}	7,50 ± 1,29 ^{ab}	5,75 ± 0,96 ^{ab}
	2,0 µg/mL	9,00 ± 1,29 ^a	9,00 ± 1,41 ^a	9,25 ± 0,96 ^a	8,25 ± 1,26 ^a	8,00 ± 1,41 ^a	9,00 ± 1,70 ^a

Os valores correspondem a média ± desvio padrão de medições de halos de inibição (mm). Análise de variância - ANOVA, two-way, pós-teste de Bonferroni. p^a <0,0001 comparado com o controle negativo (solução salina a 0,9%); p^b <0,0001 comparado ao controle positivo (peróxido de hidrogênio - 30% H₂O₂).

Segundo Arora e Chandra (2011), substâncias isoladas de *P. citrinum* demonstram potente atividade antioxidante *in vitro*. No entanto, outros estudos indicam que CIT induz dano oxidativo e peroxidação lipídica em concentrações acima de 15 mg/kg em ratos (KUMAR et al., 2014). Além disso, a genotoxicidade também foi observada por fragmentação de DNA e apoptose (KUMAR et al., 2014). Estudos prévios relataram que as EROs medeiam danos no DNA da pele de ratos com aumento da expressão de p53, p21/waf1 e Bax e parada do ciclo celular em G0/G1 e G2/M (KUMAR et al., 2011).

Os resultados demonstram que as substâncias testadas apresentam características semelhantes aos agentes antineoplásicos, porém nas menores concentrações, os compostos testados induziram respostas antioxidantes. Estudos relatam que compostos citotóxicos podem

induzir respostas antioxidantes em baixas concentrações (YÁÑEZ et al., 2004; KASHIF et al., 2015). A CIT inibe o crescimento de leveduras em altas concentrações (100 ppm), ativando genes de resposta ao estresse, como AADs, FLR1, OYE3, GRE2 e MET17 que são responsáveis pela síntese da glutatona. Por outro lado, a CIT não é capaz de induzir a expressão de genes de reparo de DNA (IWAHASHI et al., 2007), embora possa permitir a ativação de certos genes defensivos, promovendo adaptação e sobrevivência (SANTOS et al., 2012). Nesse contexto, a CIT é capaz de desencadear respostas ao estresse oxidativo por indução de genes e fatores de transcrição (Skn7 e Yap1) (PASCUAL-AHUIR; VANACLOIG-PEDROS; PROFT, 2014).

O EACNPc e isolados de *P. citrinum* (CIT e DIC-A), nas três concentrações mais baixas e em todas as linhagens participaram da modulação do dano induzido pelo H₂O₂, todavia, não eliminaram o dano oxidativo quando comparados à CP. No entanto, a CIT na concentração de 2,0 µg/mL não modulou o dano induzido pelo H₂O₂, como observado em todas as linhagens testadas (**Tabela 6**).

Tabela 6. Efeitos do extrato acetonitrila (EACNPc) e isolados de *P. citrinum* (Citrinina: CIT e Dicitrinina-A: DIC-A) sobre danos induzidos por H₂O₂ em linhagens de *S. cerevisiae*. Os valores correspondem a média ± desvio padrão da medição dos halos de inibição (mm).

Grupos	SODWT	Sod1A	Sod2A	Sod1A/Sod2A	Cat1A	Sod1A/Cat1A	
Salina 0,9%	0,50 ± 0,58	0,50 ± 0,58	0,50 ± 0,58	0,50 ± 0,58	0,50 ± 0,58	0,50 ± 0,58	
H ₂ O ₂	11,25 ± 0,95 ^a	15,00 ± 2,16 ^a	15,00 ± 0,81 ^a	16,25 ± 1,7 ^a	17,00 ± 2,06 ^a	15,00 ± 1,82 ^a	
EACNPc	0,5 µg/mL	5,75 ± 0,96 ^{ab}	6,00 ± 0,82 ^{ab}	6,0 ± 1,15 ^{ab}	5,50 ± 0,58 ^{ab}	4,00 ± 0,82 ^{ab}	4,50 ± 0,58 ^{ab}
	1,0 µg/mL	6,25 ± 0,5 ^{ab}	8,00 ± 1,15 ^{ab}	7,25 ± 0,96 ^{ab}	6,00 ± 1,15 ^{ab}	5,00 ± 0,0 ^{ab}	8,25 ± 0,96 ^{ab}
	1,5 µg/mL	8,50 ± 0,58 ^{ab}	8,75 ± 1,5 ^{ab}	7,75 ± 0,96 ^{ab}	8,00 ± 1,63 ^{ab}	6,75 ± 0,58 ^{ab}	5,75 ± 0,5 ^{ab}
	2,0 µg/mL	9,50 ± 0,58 ^a	12,50 ± 1,29 ^a	11,50 ± 1,29 ^a	9,00 ± 0,82 ^{ab}	9,00 ± 1,29 ^a	8,50 ± 0,5 ^a
CIT	0,5 µg/mL	6,50 ± 1,0 ^{ab}	7,00 ± 0,82 ^{ab}	7,50 ± 1,29 ^{ab}	6,50 ± 1,0 ^{ab}	7,00 ± 0,0 ^{ab}	4,50 ± 0,58 ^{ab}
	1,0 µg/mL	5,00 ± 0,82 ^{ab}	7,75 ± 0,96 ^{ab}	7,25 ± 0,96 ^{ab}	6,75 ± 0,96 ^{ab}	7,50 ± 0,58 ^{ab}	7,75 ± 0,50 ^{ab}
	1,5 µg/mL	7,00 ± 1,63 ^{ab}	9,50 ± 2,38 ^{ab}	7,75 ± 1,89 ^{ab}	6,50 ± 1,0 ^{ab}	7,25 ± 2,22 ^{ab}	5,50 ± 0,58 ^{ab}
	2,0 µg/mL	10,25 ± 0,96 ^a	13,25 ± 0,96 ^a	12,00 ± 0,58 ^a	10,00 ± 0,5 ^a	11,00 ± 0,96 ^{ab}	8,00 ± 0,82 ^{ab}
DIC - A	0,5 µg/mL	4,25 ± 0,5 ^{ab}	7,00 ± 0,82 ^{ab}	5,0 ± 0,82 ^{ab}	5,50 ± 1,0 ^{ab}	4,75 ± 0,96 ^{ab}	2,25 ± 0,96 ^{ab}
	1,0 µg/mL	6,00 ± 1,63 ^{ab}	7,75 ± 0,5 ^{ab}	5,50 ± 0,58 ^{ab}	5,50 ± 0,58 ^{ab}	5,75 ± 0,96 ^{ab}	5,00 ± 0,82 ^{ab}
	1,5 µg/mL	6,50 ± 1,29 ^{ab}	6,50 ± 0,58 ^{ab}	7,75 ± 0,5 ^{ab}	6,75 ± 0,5 ^{ab}	8,00 ± 0,82 ^{ab}	4,75 ± 0,96 ^{ab}
	2,0 µg/mL	8,00 ± 0,82 ^a	10,00 ± 0,82 ^a	11,00 ± 0,5 ^a	9,00 ± 0,82 ^a	9,25 ± 0,96 ^a	9,00 ± 0,58 ^a

Análise de variância - ANOVA, two-way, pós-teste de Bonferroni. p^a <0,0001 comparado com o controle negativo (solução salina a 0,9%); p^b <0,0001 comparado ao controle positivo (Peróxido de Hidrogênio - 30%). p^a <0,0001 comparado com controle negativo (0,9% salina); p^b <0,0001 comparado com o controle positivo (Peróxido de hidrogênio - 30%).

4. CONCLUSÃO

O EACNPc, obtido de *P. citrinum*, e seus isolados CIT e DIC-A induziram toxicidade em náuplios de *A. salina*, apresentando baixos níveis de CL₅₀, compatível com agentes citotóxicos. Os resultados encontrados foram semelhantes usando o ensaio *A. cepa*, onde a citotoxicidade foi revelada pelas baixas taxas de divisão celular. As substâncias também induziram mutagenicidade, especialmente em concentrações mais altas, nas quais as células meristemáticas do *A. cepa* apresentaram aumento das taxas de micronúcleos e aberrações cromossômicas, como fragmentos, pontes e cromossomos soltos. Para o pré-tratamento com *S. cerevisiae*, cotratamento e pós-tratamento com H₂O₂, EACNPc e os isolados (CIT e DIC-A) modularam os efeitos do peróxido para prevenção (pré-tratamento), para atividade antioxidante (cotratamento) e para reparação de danos oxidativos (pós-tratamento). Salienta-se que os efeitos observados para o CIT e seu coproduto (DIC-A) são promissores para novas formulações farmacêuticas antitumorais.

REFERÊNCIAS

- ALEO, M. D., WYATT, R. D. SCHNELLMANN, R. G. The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 109, p. 455-463, 1991.
- ANDRADE, T. J. A. S. Investigação Química e Biológica dos Metabólitos Secundários Derivados de Macroalgas Marinhas e Microrganismos Associados. Tese de doutorado em Química, Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2014. p.358.
- ANDRADE, T. J. A. S.; ARAÚJO, B. Q.; CITÓ, A. M. G. L.; SILVA, J.; SAFFI, J.; RICHTER, M. F.; FERRAZ, A. B. F. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1044-1048, 2011.
- ARAI, M.; HIBINO, T. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. **Cancer Letter**, v.17, p. 281–287, 1983.
- ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.
- ARORA, D. S.; CHANDRA, P. In Vitro Antioxidant Potential of Some Soil Fungi: Screening of Functional Compounds and their Purification from *Penicillium citrinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 639-651, 2011.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497-516, 2003.

BLASKÓ, Á.; MIKE, N.; GRÓF, P.; GAZDAG, Z.; CZIBULYA, Z.; NAGY, L.; KUNSÁGI-MÁTÉ, S.; PESTI, M. Citrinin-induced fluidization of the plasma membrane of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 636-642, 2013.

BLUNT, J. W.; COOP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 116-211, 2015.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W. P.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 26, n. 2, p. 170-244, 2009.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W. P.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 25, n. 1, p. 35-94, 2008.

BOUSLIMI, A.; OUANNES, Z.; GOLLI, E.E.; BOUAZIZ, C.; HASSEN, W.; BACHA, H. Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxin a and citrinin: individual and combined effects. **Toxicology Mechanisms Methods**, v. 18, p. 341-349, 2008.

CHAGAS, G. M.; OLIVEIRA, M. B.; CAMPELLO, A.P.; KLUPPEL, M.L. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III. Effects on renal cortical and liver mitochondrial swelling. **Journal of Applied Toxicology**, v. 15, p. 91-95, 1995.

CHAN, W. H. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. **Biochemical Journal**, v. 404, p.317–326, 2007.

CHAN, W. H.; WU, H. J.; SHIAO, N. H. Apoptotic signaling in meth-ylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.100, p.1056–1069, 2007.

CHAN, W.H. Effects of Citrinin on Maturation of Mouse Oocytes, Fertilization, and Fetal Development in Vitro and in Vivo. **Toxicology Letters**, v. 180, p. 28-32, 2008.

CHANG, C. H.; YU, F. Y.; WU, T. S.; WANG, L. T.; LIU, B. H. Mycotoxin citrinin induced cell cycle G2/M arrest and numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule formation in human cells. **Toxicological Sciences**, v. 119, p.84–92, 2011.

CHANG, C.H.; YU, F.Y.; WANG, L.T.; LIN, Y.S.; LIU, B.H. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, p. 281-287, 2009.

CLARK, B. R.; CAPON, R. J.; LACEY, E.; TENNANT, S.; GILL, J. H. Citrinin revisited: from monomers to dimers and beyond. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 1520-1528, 2006.

DALOZZO, E. J.; OLIVEIRA, M. B.; CARNIERI, E. G. Citrinin-induced mitochondrial permeability transition. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 12, p. 291-297, 1998.

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

DE OLIVEIRA, I. M.; DEGRANDI, T. H.; JORGE, P. M.; SAFFI, J.; ROSA, R. M.; GUECHEVA, T. N.; HENRIQUES, J. A. P. Dicholesteroylidisenide: Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and in Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutation Research**, v. 763, p. 1-11, 2014.

DÖNMEZ-ALTUNTAS, H.; DUMLUPINAR, G.; IMAMOGLU, N.; ZUHALHAMURCU, Z.; LIMAN, B.C. Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. **Journal of applied toxicology**, v. 27, p. 337-341, 2007.

DU, L.; LI, D.; ZHANG, G.; ZHU, T.; AI, J.; GU, Q. Novel carbon-bridged citrinin dimers from a volcano ash-derived fungus *Penicillium citrinum* and their cytotoxic and cell cycle arrest activities. **Journal Tetrahedron - London**, v. 66, n. 47, p. 9286-9290, 2010.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2012. Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. EFSA J. 10, 2605.

ELEFTHERIOU, E. P.; ADAMAKIS, I. D. S.; MELISSA, P. Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 401-416, 2012.

FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. 64, p. 1-21, 2012.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FISKESJÖ, G. The *Allium test* as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, 99-112, 1985.

FLAJS, D.; PERACIA, M. Toxicological properties of citrinin. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, p. 457-464. 2009.

FOLKMANN, J. K.; RISOM, L.; JACOBSEN, N. K.; WALLIN, H. K.; STEFFEN, L.; MOLLER, P. Oxidatively Damaged DNA in Rats Exposed by Oral Gavage to C60 Fullerenes and Single-Walled Carbon Nanotubes. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, p. 703-708, 2009.

GAJARDO, G. M.; BEARDMORE, J. A. The brine shrimp artemia: adapted to critical life conditions. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1-8, 2012.

GAYATHRI, L.; DHIVYA, R.; DHANASEKARAN, D.; PERIASAMY, V.S.; ALSHATWI, A.A.; AKBARSHA, M.A. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2 cell. **Food and Chemical Toxicology**, v.83, p.151-163, 2015.

GERWICK, W. H.; FENNER, A. M. Drug discovery from marine microbes. **Microbial ecology**, v. 65, n. 4, p. 800-806, 2013.

GUBIANI, J. R.; ZERAIK, M. L.; OLIVEIRA, C. M.; XIMENES, V. F.; NOGUEIRA, C. R.; FONSECA, L. M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Biologically Active Eremophilane-Type Sesquiterpenes from *Camarops* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Alibertia macrophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 668-672, 2014.

- ISLAM, M. T.; STRECK, L.; ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, S. W. C.; MACHADO, K. C.; MACHADO, K. C.; GOMES JÚNIOR, A. L.; PAZ, M. F. C. J.; MATA, A. M. O. F.; SOUSA, J. M. C.; COSTA JUNIOR, J. S.; ROLIM, H. M. L.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, 2017.
- IWAHASHI, H.; KITAGAWA, E.; SUZUKI, Y.; UEDA, Y.; ISHIZAWA, Y.; NOBUMASA, H.; KUBOKI, Y.; HOSODA, H.; IWAHASHI, Y. Evaluation of Toxicity of the Mycotoxin Citrinin Using Yeast ORF DNA Microarray and Oligo DNA Microarray. **BMC Genomics**, v. 8, n. 95, p. 1-13, 2007.
- JESWAL P. Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of *Mus musculus*. **Cytobios**, v.86, p. 29–33, 1996.
- JORDAN, M.A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v.4, p. 253-265, 2004.
- KASHIF, M.; BANO, S.; NAQVI, S.; FAIZI, S.; LUBNA; AHMED MESAİK, M.; AZEEMI, K. S.; FAROOQ, A. D. Cytotoxic and antioxidant properties of phenolic compounds from Tagetespatula flower. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 5, p. 672-681, 2015.
- KNASMÜLLER, S.; CAVIN, C.; CHAKRABORTY, A.; DARROUDI, F.; MAJER, B.J.; HUBER, W.W.; EHRLICH, V.A. Structurally related mycotoxins ochratoxin a ochratoxin b, and citrinin differ in their Genotoxic Activities and in Their Mode of Action in Human-Derived Liver (HepG2) Cells: Implications for Risk Assessment. **Nutrition and Cancer**, v.50, p. 190-197, 2004.
- KOGIKA, M. M.; HAGIWARA, M. K.; MIRANDOLA, R. M. Experimental citrinin nephrotoxicosis in dogs: renal function evaluation. **Veterinary & Human Toxicology**, v. 35, p.136–140, 1993.
- KUMAR, M.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A.K.; SANKAR, M.; PATIL, R.D.; SINGH, N.D. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A- and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Toxicology Industrial Health**, v. 30, p. 90-98, 2014.
- KUMAR, R.; DWIVEDI, P.D.; DHAWAN, A.; DAS, M.; ANSARI, K.M. Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. **Toxicological Sciences**, v. 122, p. 557-566, 2011.
- KURODA, K.; ISHII, Y.; TAKASU, S.; KIJIMA, A.; MATSUSHITA, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, H.; KONISHI, Y.S.; SAKAI, H.; YANAI, T.; NOHMI, T.; OGAWA, K.; UMEMURA, T. Cell cycle progression, but not genotoxic activity, mainly contributes to citrinin-induced renal carcinogenesis. **Toxicology**, v. 311, p. 216-224, 2013.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.
- 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, p. 1423–1446, 2014.
- LIU, B.H.; YU, F.Y.; WU, T.S.; LI, S.Y.; SU, M.C.; WANG, M.C.; SHIH, S.M. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, p. 255–263, 2003.

- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13-18, 2011.
- MESI, B. N.; KOPLICU, D. Cytotoxic and genotoxic potency screening of two pesticides on *Allium cepa* L. **Procedia Technology**, v. 8, p. 19-26, 2013.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.
- NAKAJIMA, Y.; IGUCHI, H.; KAMISUKI, S.; SUGAWARA, F.; FURUICHI, T.; SHINODA, Y. Low doses of the mycotoxin citrinin protect cortical neurons against glutamate-induced excitotoxicity. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 41, p. 311-319, 2016.
- NONG, X. H.; ZHENG, Z. H.; ZHANG, X. Y.; LU, X. H.; QI, S. H. Polyketides from a marine-derived fungus *Xylariaceae* sp. **Marine Drugs**, v. 11, n. 5, p. 1718-1727, 2013.
- NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; VAN STAPPEN, G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, n. 2, p. 453-62, 2006.
- NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C.; SILVA, M. V.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. D. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de Mimosa paraibana Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. (Suplemento), p. 718-723, 2008.
- OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; ALENCAR, M. V. O. B.; GOMES JUNIOR, A. L.; SOUZA, A. A.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; FREITAS, R. M. Evaluation of antioxidante capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) *in vitro* and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 136-147, 2014.
- PASCUAL-AHUIR, A.; VANACLOIG-PEDROS, E.; PROFT, M. Toxicity mechanisms of the food contaminant citrinin: Application of a quantitative yeast model. **Nutrients**, v. 6, n. 5, p. 2077-2087, 2014.
- SANGIAN, H.; FARAMARZI, H.; YAZDINEZHAD, A.; MOUSAVI, S.J.; ZAMANI, Z.; NOUBARANI, M.; RAMAZANI, A. Antiplasmodial activity of ethanolic extracts of some selected medicinal plants from the northwest of Iran. **Parasitology Research**, v. 112, n. 11, p. 3697-3701, 2013.
- SANTOS, C. L.; POURRUT, B.; OLIVEIRA, J. M. F. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1-18, 2016.
- SANTOS, S. C.; TEIXEIRA, M. C.; CABRITO, T. R.; SA-CORREIA, I. Yeast toxicogenomics: Genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. 63, p. 1-17, 2012.
- SHAALA, N. M. A.; ZULKIFLI, S. Z.; ISMAIL, A.; AZMAI, M. N. A. A.; YUSUFF, F. M. Lethal concentration 50 (LC₅₀) and effects of diuron on morphology of brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) Nauplii. **Procedia Environmental Sciences**, v. 30, p. 279-284, 2015.

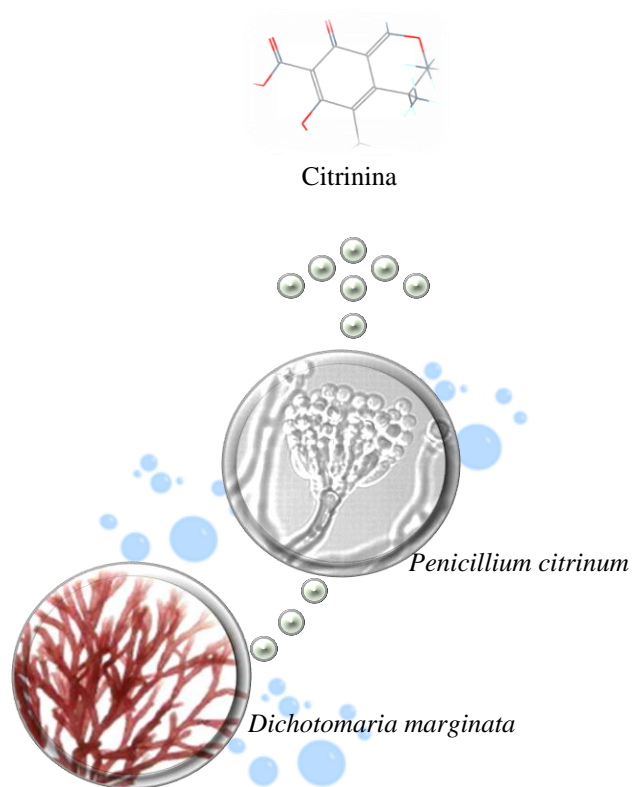
- SHI, Y. C.; PAN, T. M. Red mold, diabetes, and oxidative stress: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 47-55, 2012.
- SKONECZNA, A.; KANIAK, A.; SKONECZNY, M. Genetic instability in budding and fission yeast-sources and mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, p. 917-967, 2015.
- TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013.
- THACKER, H. L.; CARLTON, W. W.; SANSING, G. A. Citrinin mycotoxicosis in the Guinea-Pig. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 15, p. 553-561, 1977.
- WAKANA, D.; HOSEO, T.; ITABASHI, T.; OKADA, K.; TAKAKI, G. M. C.; YAGUCHI, T.; FUKUSHIMA, K.; KAWAI, K. I. New citrinin derivatives isolated from *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 60, p. 279-284, 2006.
- WANG, M. L.; LU, C. H.; XU, Q. Y.; SONG, S. Y.; HU, Z. Y.; ZHENG, Z. H. Four new Citrinin derivatives from a marine-derived *Penicillium* sp. Fungal strain. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5723-5735, 2013.
- WHEN, C.; GUO, W.; CHEN, X. Purification and Identification of a Novel Antifungal Protein Secreted by *Penicillium citrinum* from the Southwest Indian Ocean. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1337-1345, 2014.
- XIAO, D.; PINTO, J. T.; SOH, J. W.; DEGUCHI, A.; GUNDERSEN, G. G.; PALAZZO, A. F.; YOON, J. T.; SHIRIN, H.; WEINSTEIN, I. B. Induction of apoptosis by the garlic-derived compound S-allylmercaptocysteine (SAMC) is associated with microtubule depolymerization and c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 activation. **Cancer Research**, v. 63, p. 6825-6837, 2003.
- XU, B. J.; JIA, X. Q.; GU, L. J.; SUNG, C. K. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**, v. 17, n. 4, 271-285, 2006.
- YÁÑEZ, J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CANTERAS, M.; TERUEL, J. A. L. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. **Nutrition and cancer**, v. 49, n. 2, p. 191-199, 2004.
- YAO, G.; SEBISUBI, F. M.; VOO, L. Y. C.; HO, C. C.; TAN, G. T.; CHANG, L. C. Citrinin derivatives from the soil filamentous fungus *Penicillium* sp. H9318. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1125-1129, 2011.
- YU, F. Y.; LIAO, Y. C.; CHANG, C. H.; LIU, B. H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. **Toxicology Letters**, v. 161, n. 2, p. 143-151, 2006.
- 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, p. 119-126, 2015.
- ZHANG, J.; ZHANG, F.; NIU, R. Functions of Shp2 in cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 9, p. 2075-2083, 2015.

ZHENG, Y. K.; QIAO, X. G.; MIAO, C. P.; LIU, K.; CHEN, Y. W.; XU, L. H.; ZHAO, L. X.
Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals of
Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 529-542, 2016.

Capítulo 3

Efeitos antitumorais da citrinina em modelo animal de Sarcoma 180 por mecanismos citogenéticos

Avaliar os mecanismos citogenéticos induzidos pela citrinina em cultura primária de Sarcoma 180



OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

Efeitos antitumorais da citrinina em modelo animal de Sarcoma 180 por mecanismos citogenéticos

José Williams Gomes de Oliveira Filho, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Rosália Maria Tôres de Lima, Antonielli Campinho dos Reis, José Victor de Oliveira Santos, Ag-Anne Pereira Melo de Menezes, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, José Roberto de Oliveira Ferreira, Muhammad Torequul Islam, Hercília, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, João Marcelo de Castro e Sousa, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Artigo submetido ao periódico *Journal IUBMB Life* (ANEXO C)

QUALIS B1 – Biotecnologia

Resumo

A citrinina, metabólito do *Penicillium citrinum*, apresenta toxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e citotoxicidade. Este estudo avaliou os efeitos antitumorais da citrinina, com aplicação de biomarcadores citogenéticos de genotoxicidade em células do líquido ascítico de Sarcoma 180 (S-180) de camundongos, pela aplicação dos testes cometa e de micronúcleos, além da investigação da viabilidade celular pelo método de MTT. A citrinina, extraída do extrato acetônitrila do *P. citrinum*, foi caracterizada por cromatografia líquida, acoplada a espectro de massa. Na avaliação citotóxica, a citrinina e controles foram incubados durante 68 horas, juntamente com as células S-180. Após o período de incubação, foram adicionados à suspensão de células, 20 µL da solução de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (5 mg/mL) e reincubadas durante 4h em estufa a 37°C e a 5% CO₂. A Suspensão celular de S180 (0,5 x 10⁶ células/mL) foi submetida aos testes cometa (versão alcalina) e de micronúcleos. A CI₅₀ da citrinina em células de S-180 foi de 3,77 µg/mL (com intervalo de confiança de 2,57 – 5,54 µg/mL), e nas concentrações 12,5 e 100 µg/mL, citrinina foi tão citotóxica quanto a doxorubicina (2 µg/mL). Em 0,5; 1,0 e 2 µg/mL citrinina induziu genotoxicidade em células de S-180, especialmente em 2 µg/mL por danos oxidativos similares ao peróxido de hidrogênio (10 mM). Efeitos antitumorais foram evidenciados pelos significantes aumentos de apoptoses e de necroses, em células de S-180, por efeitos citogenéticos clastogênicos e/ou aneugênicos (formação de micronúcleos), como por indução de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, que culminaram com apoptoses e necroses em S-180. A citrinina tem potencial para formulações antitumorais, com envolvimento de mecanismos citogenéticos.

Palavras-chave: Sarcoma 180. Citrinina. Citogenética. Apoptoses.

1. INTRODUÇÃO

O câncer consiste no processo patológico que promove o crescimento celular anormal, sem controle com crescimento de tecido, mediante proliferação celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Nos Estados Unidos, em 2016, 1.685.210 novos casos de diferentes tipos de câncer foram detectados. Entre eles, 595.690 óbitos por câncer (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016) e, em países menos desenvolvidos, representam cerca de 57% dos casos e 65% das mortes (TORRE et al., 2015). Os sarcomas são neoplasias malignas que atingem os tecidos de sustentação do corpo, caracterizando uma origem mesenquimatoso (ALENCAR et al., 2016). No que se refere às terapias, Post (2012), defende que o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na doença, investigados em modelo confiável, contribui para o avanço das terapias dessas neoplasias. De fato, a maioria dos subtipos de sarcoma ainda é tratada com modalidades terapêuticas tradicionais e, em muitos casos, os sarcomas são resistentes a terapias adjuvantes (TAYLOR et al., 2011; LI et al., 2017).

Abordagens multidisciplinares (cirurgia, terapia citotóxica e imunoterapia) são necessárias e cuidadosamente combinadas para o tratamento do câncer (SILBERMANN et al., 2013; MALVEZZI et al., 2018). Mas, ainda é necessário aprimorar os conhecimentos sobre os mecanismos celulares intrínsecos e extrínsecos implícitos ao desenvolvimento do tumor, além da capacidade de resposta terapêutica (WU; HANNUN, 2016). Na procura do tratamento mais eficiente, considerando os diferentes tipos de cânceres, a ciência acredita esperança na pesquisa não clínica, em modelos animais e abordagens *in vitro* (CHEON; ORSULIC, 2011).

Os fungos endofíticos de origem marinha e seus metabólitos ocupam o centro das atenções na descoberta e exploração de medicamentos por apresentar prováveis potenciais terapêuticos (DESHMUKH; PRAKASH; RANJAN, 2017), como candidatos a drogas anticâncer (KINGHORN et al., 2009), pois diversos estudos relatam atividades antitumorais por indução de apoptoses e inibição de proliferação celular (HUANG; CHAN, 2017; SALAH et al., 2017; WU et al., 2017). O gênero *Penicillium* apresenta atividade citotóxica e anticâncer (CHEN et al., 2011; CHEN et al., 2012; CHEN et al., 2014; LIU et al., 2015), como observado para a citrinina (CIT) obtida do *Penicillium citrinum* que apresenta atividades citotóxicas (CHAN, 2007, CHAN, 2008; HUANG et al., 2009; HUANG; CHAN, 2017; SALAH et al., 2017), tóxicas (FLAJS; PERAICA, 2009), antitumoral (CHANG et al., 2009), como também neuroprotetora (NAKAJIMA et al., 2016). Por outro aspecto, as substâncias com propriedades antagônicas como antioxidantes e citotóxicas, como relatado para a citrinina, apontam boa opção para a terapia do câncer (LESGARDS et al., 2014).

Muitos agentes antitumorais são conhecidos por serem genotóxicos, além de apresentar grande potencial para induzir alterações genéticas em tecidos alvos (KESHAVA; ONG, 1999), a exemplo das alterações citogenéticas envolvem aneuploidias, deleções, inserções, quebras e perdas de cromossomos (SAMUELSON et al., 2012; GIAM; RANCATI, 2015). Assim, os biomarcadores citogenéticos que detectam danos ao DNA são relevantes e úteis na análise do risco genético, por proporcionarem informações essenciais sobre os efeitos biológicos necessários para a oncologia (GRUJIĆ et al., 2016), a exemplo do ensaio cometa que pode detectar níveis de danos ao DNA, como quebras de fitas simples e duplas (KAWAGUCHI et al., 2010; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015), bem como danos oxidativos (DAVISON, 2016) e do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN), que permite avaliar danos citogenéticos de vários agentes citotóxicos em células binucleadas (FENECH, 2007; FENECH et al., 2011; NAKAMURA et al., 2016; DEPUYDT et al., 2017).

A avaliação desses marcadores citogenéticos em células do líquido ascítico de Sarcomas 180 em camundongos é de suma importância, pois funciona como um controle da eficácia de terapias em saúde, por exemplo, na incorporação de novas substâncias em protocolos quimioterápicos (GHAZARYAN et al., 2015; PATRA et al., 2016). Assim, o estudo teve por objetivo a avaliação dos efeitos antitumorais da CIT com aplicação de biomarcadores citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose em culturas do líquido ascítico de Sarcoma 180 (S-180) em camundongos, por meio dos testes citogenéticos (cometa e CBMN).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Procedimentos experimentais gerais para isolamento da citrinina

Foram utilizados solventes padrões analíticos das marcas Synth, Dinâmica, Merck: metanol, etila, n-hexano, acetonitrila. Estes solventes foram usados para extração e fracionamento. Para a separação cromatográfica em coluna aberta foi utilizado a fase estacionária Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich e, para o isolamento e crescimento dos microrganismos, foram utilizados os meios sólidos: Arroz parboilizado (Marcon®) e BDA (Batata Dextrose Agar-Sigma®). Os experimentos de ¹H RMN (500 MHz), ¹³C RMN (126 MHz), HMBC, HMQC, foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance DRX-500 com os solventes CDC₁₃ e DMSO-d₆ (CIL e Isotec-INC), sendo o solvente residual não deuterado como

referência interna. O espectro de massas de ionização por eletrospray foi obtido no modo positivo usando um LTQ Orbitrap XL Hybrid com Transformada de Fourier (Thermo Scientific Instruments) acoplado a um sistema de CLAE Thermo Instruments (Detector Accela PDA, amostrador automático Accela e bomba Accela, Instrumentos Thermo Scientific). As seguintes condições foram usadas: tensão capilar 4,5 kV, temperatura capilar 260°C, taxa de fluxo de gás 10-20 unidades arbitrárias, taxa de fluxo de gás de arraste 40-50 unidades arbitrárias, tensão de pulverização 4,5 kV, intervalo de massa 100-1000 u.m.a (resolução máxima 30,000).

2.2 Coleta da macroalga *Dichotomaria marginata*

A macroalga vermelha *D. marginata* foi coletada em dezembro de 2009 na região norte de São Paulo, na praia de Fortaleza, na cidade de Ubatuba, Brasil (23°24'93 'e 45°03'41"W), durante o período de maré baixa. A Dra. Nair Yokoya (Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil) realizou a identificação de *D. marginata*. A exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, Brasil (N° SP400960).

2.3 Identificação do fungo endófito *Penicillium citrinum* e caracterização da citrinina

O fungo endofítico *P. citrinum* foi isolado por meio de um procedimento padrão previamente descrito (GUBIANI et al., 2014), a partir do tecido interno da macroalga vermelha marinha *D. marginata*. Após o isolamento, a cultura pura *P. citrinum* foi enviada e classificada pela Dra. Anil Sazak (Ondokuz Mays Universities Fen Edebiyaties Fakulties Biyoloji Bolumu Kurupelit/Samsun Turkey).

A cepa fúngica endofítica *P. citrinum* foi cultivada em cinco frascos de Erlenmeyer, cada um contendo 90 g de arroz. O meio foi autoclavado quatro vezes (em quatro dias consecutivos), a 121°C durante 40 min. Após a esterilização, o meio foi inoculado com o endófito e incubado a 25° C, durante 21 dias. No final do período de incubação, as culturas foram combinadas, moídas e extraídas com CH₃OH (5 x 250 mL). O solvente foi evaporado, produzindo um extrato bruto de CH₃OH, que foi dissolvido em CH₃CN e particionado com hexano obtendo o extrato acetonitrila (EACNPc). Uma porção (900 mg) do extrato acetonitrila de *P. citrinum* (EACNPc) foi fracionado por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (70 cm x 3,0 cm) eluída com MeOH:DCM (1:1), obtendo-se 45 frações de aproximadamente 80 mL cada. A análise por CCD e CLAE-DAD/EM-IES [Coluna C18; MeOH:H₂O (5-100% MeOH), 254 nm], permitiu seu agrupamento em 16 novos grupos de frações por similaridade

dos cromatogramas (FDm1Se-FDm16Se). A fração FDm9Se (79 mg) após lavagem com metanol, forneceu a substância CIT (30 mg).

A citrinina (CIT) foi solubilizada em DMSO a 10% e água destilada. Para os experimentos, CIT foi administrada nas seguintes concentrações 0,5; 1,0 e 2 µg/mL. Essas concentrações foram escolhidas a partir de testes preliminares de viabilidade celular com o ensaio de MTT em cultura celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, sugerido por Andrade (2014).

2.4 Cultura primária de Sarcoma 180

Os procedimentos de manutenção do tumor Sarcoma 180 (S180) em camundongos, linhagem *Swiss*, foram previamente aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFPI (nº 167/16, ANEXO D). As células tumorais foram mantidas nos camundongos através de transferências intraperitoneais semanais. Após 10 dias de inoculação o líquido ascítico, contendo células tumorais, foi removido por punção na cavidade abdominal de um animal e centrifugado (500 g, 5 min, 4° C) para obtenção do *pellet* celular. Em seguida, as células de S-180 foram contadas em câmara de Neubauer ($0,5 \times 10^6$ células/mL) e incubadas em meio de cultura RPMI 1640 (1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina), mantidas em estufa a 37°C, por 72h, concomitantemente com a substância teste e controles.

2.5 Viabilidade celular pelo método do MTT em cultura primária de Sarcoma 180

O ensaio do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} foi realizado de acordo com Mosmann (1983). As células foram distribuídas em placas com 96 cavidades, com densidade de $0,5 \times 10^6$ células/mL. A substância teste e controles foram incubadas durante 68 horas juntamente com as células S-180. Após o período de incubação de 68 horas, 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 centrifugado (2.500 – 3.000 rpm/10min) 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 de formazan reduzido pelas células vivas, as absorbâncias foram analisadas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm.

2.6 Estudo de mecanismo para a genotoxicidade pelo cotratamento com H₂O₂

Procurou-se avaliar, neste experimento, a atuação do estresse oxidativo como mecanismo para a indução de genotoxicidade de acordo com Luz et al. (2013). Alíquotas de 10 µL de suspensão celular de S180 ($0,5 \times 10^6$ células/mL) foram misturadas com uma fina camada de agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (90 µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal 1,5%. Em seguida, as lâminas foram expostas à CIT (2 µg/mL), 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. Depois as lâminas foram submetidas ao teste cometa.

2.7 Teste cometa

A versão alcalina do teste foi realizada conforme descrito por Speit e Rothfuss (2012). Amostras 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 20 minutos em cuba de eletroforese. Por fim, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M e pH 7,5) e coradas com solução de nitrato de prata. As lâminas foram analisadas quanto ao perfil fotomicrográfico das células (aumento de 400X em microscópio óptico) e os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD) de 100 células em duplicata. O ID foi calculado por meio da fórmula: $ID = \Sigma$ (número de células em determinada classe de dano X classe de dano), que variou de 0 a 400 e FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - n^\circ$ de células classe 0.

2.8 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese - CBMN

O teste de CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI 1640 (fitohemaglutinina A GIBCO®

[Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], 1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA] e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA]) foram adicionados 20 µL de suspensão celular de S180 ($0,5 \times 10^6$ células/mL). Em cada frasco de cultura foram acrescentadas as soluções teste e controles. As células foram incubadas por 44h a $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. Após este período, foram adicionados às culturas 6 µg/mL de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando os frascos à incubação por mais 28h. Ao final de 72h, a cultura foi transferida para tubos falcon e centrifugada 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 em cada tubo. 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: $\text{IDN} = (\text{M1} + 2\text{M2} + 3\text{M3} + 4\text{M4})/\text{N}^*$, 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: $\text{IDNC} = (\text{Ap} + \text{Nec} + \text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4}))/\text{N}^*$, 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).

2.9 Análise estatística

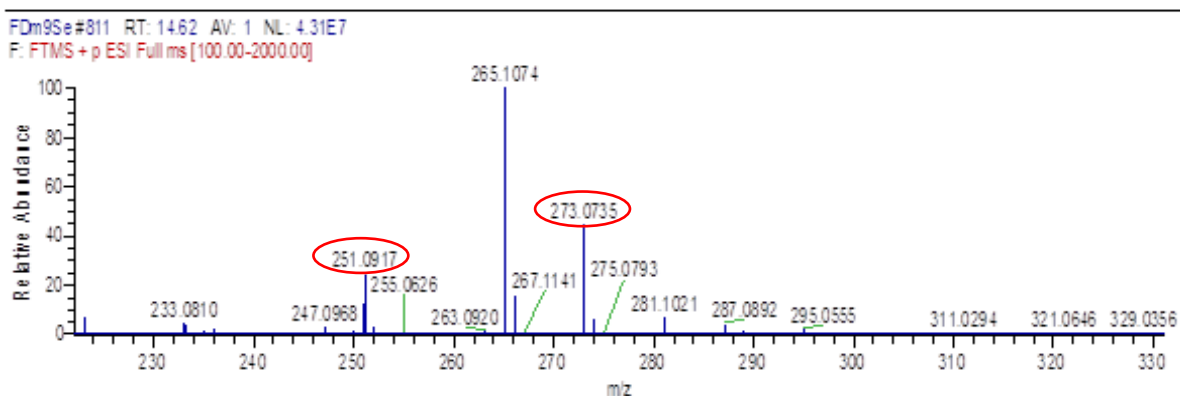
Os dados de absorbância obtidos a partir do ensaio MTT, foram normalizados e transformados em logaritmo e submetidos a uma regressão não linear afim de ser encontrado a CL50. Para definir as diferenças entre os tratamentos, dados expressos como a média \pm desvio padrão foram comparados por análise de variância (ANOVA), de duas vias e pós-teste de Bonferroni, considerando valores de $p < 0,05$ significantes, por meio do programa *Graphpad Prism* (v. 6.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphPad.com). Todos os estudos foram realizados em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da citrinina isolada do extrato acetonitrila oriundo do *Penicillium citrinum*

As análises de RMN ^1H e ^{13}C levaram à identificação da substância citrinina, HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 251.0917 (calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$) e m/z 273.0735 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (**Figura 1**). A estrutura da substância foi elucidada com base em dados de MS e ^1H e ^{13}C RMN, bem como por comparação com dados da literatura (CLARK et al., 2006; YAO et al., 2011). CIT foi obtida como cristais agulhas de cor alaranjado, UV λ_{max} (MeOH) 318 nm. ^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) 8.23 (s, H-1), 4.76 (qd, $J=6.8$, H-3), 2.97 (qd, H-4), 1.23 (d, $J=6.8$, H-9), 1.35 (d, $J=7.2$, H-10), 2.01 (s, H-11).

Figura 1. Espectro de massa (EM-IES (+)) da Citrinina.



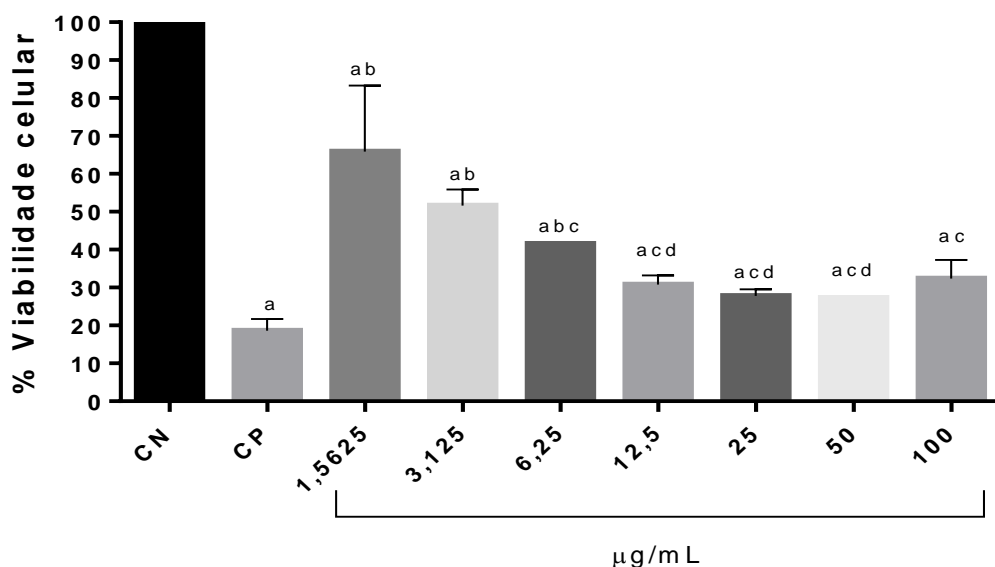
3.2 Efeitos citotóxicos da citrinina (CIT) na cultura primária de S180 de camundongos

Produtos naturais extraídos de fungos endofíticos são fontes promissora de agentes terapêuticos (BUGNI; IRELAND, 2004; DESHMUKH; PRAKASH; RANJAN, 2017). A CIT obtida do extrato acetonitrila do *P. citrinum* no método brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) apresentou CI_{50} de 3,77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (com intervalo de confiança de 2,57 – 5,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $R^2 = 0,9066$). Os policetídeos constituem uma das principais classes de produtos naturais citotóxicos para células tumorais e, nesse contexto, podem ser estudados de forma aprofundada como candidatos a quimioterápicos (DU et al., 2008; HERTWECK, 2009; EL-NEKETI et al., 2013; NASKAR; CHAKRAVERTY; GHOSH, 2015). Estudos apontam

citotoxicidade da CIT pela indução de estresse oxidativo e apoptose, por meio das vias ERK1 e ERK2, além da indução da parada do ciclo celular pelas vias de sinalização p53 e p21 (IWAHASHI et al., 2007; CHANG et al., 2009; CHANG et al., 2011), como também por modificações nas defesas enzimáticas antioxidantes (BOUSLIMI et al., 2008; OLIVEIRA FILHO et al., 2017).

A viabilidade celular em S-180 foi analisada pelo método MTT, após 72h de exposição. Tanto a doxorrubicina (CP-controle positivo) quanto as demais concentrações de CIT, reduziram de forma significativa a viabilidade celular em relação ao CN (células não tratadas). As concentrações de CIT entre 12,5 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foram tão citotóxicas quanto o CP (**Figura 3**). É válido registrar que a citotoxicidade da CIT também foi evidenciada em outros estudos (KNECHT et al., 2005; KUMAR et al., 2014). Atividades citotóxica e antitumoral relatadas para CIT foram investigadas na linhagem de câncer cervical (HeLa), linhagem de carcinoma oral (KB), de próstata (LNCap), hepático humano (HepG2), de pulmão (LU-1) e adenocarcinoma de mama (MCF-7) (CHANG et al., 2009; CHEN; CHAN, 2009; YAO et al., 2011).

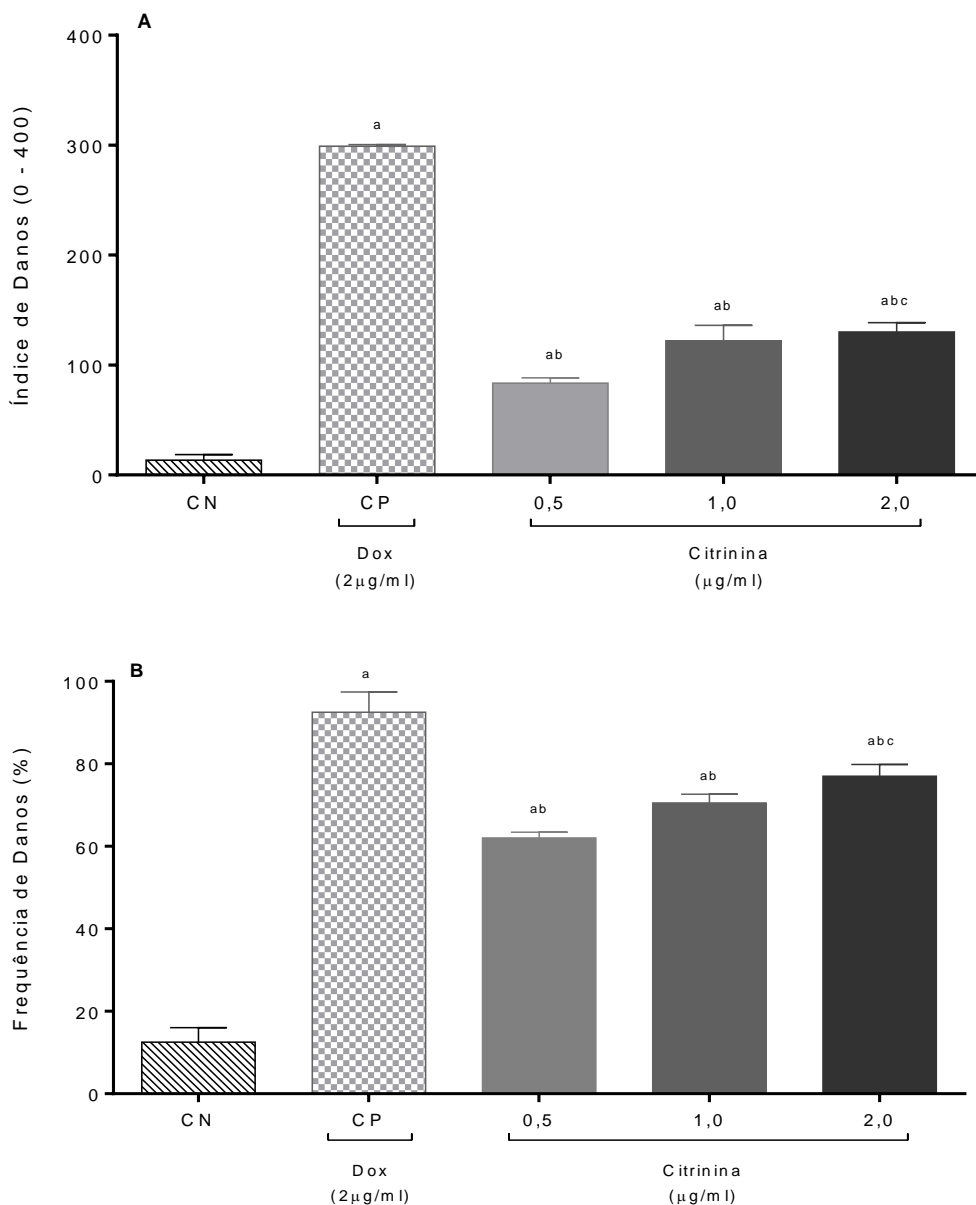
Figura 2. Ação da citrinina (CIT) na viabilidade celular em cultura primária de Sarcoma 180, avaliada pelo ensaio MTT após 72 h de exposição a CIT. Valores representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. CP: doxorrubicina (2 $\mu\text{g/mL}$). CIT: citrinina. Log: logaritmo. ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Bonferroni. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CN, ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo CP, ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo 1,56, ^d $p < 0,05$ comparado a concentração de 3,12 $\mu\text{g/mL}$.



3.3 Efeitos genotóxicos da CIT em células do líquido ascítico de S180 em camundongos, através do ensaio cometa

Investigações sobre a genotoxicidade podem ocorrer por meio do ensaio cometa *in vitro* e *ex vivo* pela avaliação de danos ao DNA, além da capacidade de reparo (JHA, 2008; POURRUT et al., 2015), que em sua versão alcalina, pode detectar quebras de fita simples e/ou duplas no DNA e danos oxidativos (AZQUETA et al., 2014; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015; IMANIKIA et al., 2016). A CIT, em todas as concentrações testadas, especialmente em 2 µg/mL, induziu efeitos genotóxicos em células de S180, pelo aumento do índice de dano e frequência de dano ao DNA, quando comparado ao CN. A maior concentração testada induziu significantes danos genotóxicos em relação à menor concentração (**Figura 3**). Estudos apontam que a CIT pode induzir danos ao DNA mediados por EROs (MÁTÉ et al., 2014; GAYATHRI et al., 2015). Danos genotóxicos podem desencadear instabilidade genômica e provocar alterações no DNA (BAUMSTARK-KHAN; HELLWEG; REITZ, 2010; LAN et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

Figura 3. Genotoxicidade em cultura primária de S180 de camundongos 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. CP: Doxorubicina (Dox) 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. CIT: Citrinina (0,5; 1,0 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). ANOVA, one-way seguido de Bonferroni. Significância de ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CN; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo CP; ^c $p < 0,05$ comparado a concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

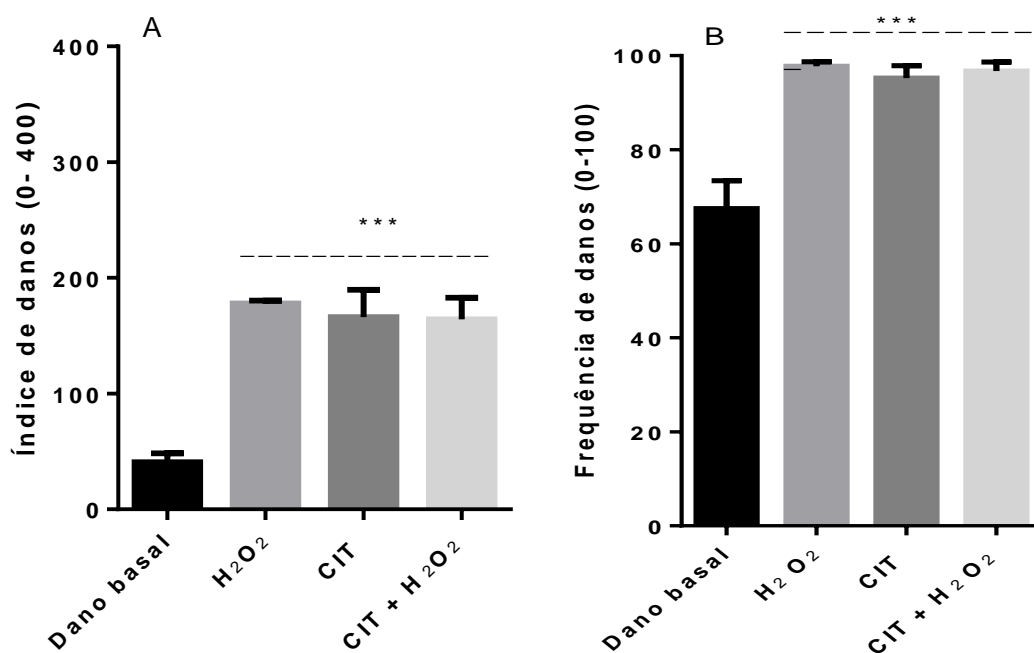


3.4 Avaliação da indução de danos oxidativos como mecanismos para genotoxicidade da CIT em células de S180 em camundongos

Em análise de efeitos genotóxicos, por meio do ensaio cometa, CIT induziu, nas concentrações testadas, aumento do índice de danos e frequência de danos ao DNA em células de S180. Além do mais, na investigação dos mecanismos de genotoxicidade em células do

líquido ascítico de S180, no ensaio desafio com peróxido de hidrogênio não foram observadas diferenças estatísticas entre CIT e o H₂O₂, como também entre CIT e CIT, em cotratamento com o peróxido. Entretanto, diferenças estatísticas foram observadas em relação ao dano basal de células tumorais do líquido ascítico de S180 (**Figura 4**). O agente estressor (H₂O₂) é um marcador de danos oxidativos (AU; GIRI; RUCHIRAWAT, 2010). Cabe relatar que a CIT possui grupo OH livre em seus carbonos (C8 e C12) e é capaz de induzir danos ao DNA via formação de radical •OH, gerando danos oxidativos (GAYATHRI et al., 2015), como também acontece no mecanismo de indução oxidativa do H₂O₂ (SIES, 2017).

Figura 4. Genotoxicidade da citrinina, por mecanismos associados a danos oxidativos, em células do líquido ascítico de S180 cotratada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Em **A** índice de danos ao DNA e em **B** frequência de danos. Valores representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. Dano basal: células não tratadas. H₂O₂ (10 mM): CIT: citrinina (2 µg/mL). ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao grupo CN, ^b p<0,05 comparado ao grupo H₂O₂ 10 e ^c p<0,05 comparado ao grupo CIT.



3.5 Efeitos antitumorais da citrinina (CIT) por danos citogenéticos em células do líquido ascítico de S180 em camundongos avaliados pelo teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN)

A CIT induziu efeitos mutagênicos em células de S180 em todas as concentrações testadas, por meio da indução de alterações nucleares como aumento significativo de micronúcleos (MN), bem como aumento significativo do número de pontes nucleoplasmáticas

e brotos nucleares, quando comparadas às células não tratadas (CN) (**Tabela 1**). Como observado em outros estudos, a CIT induziu a formação de micronúcleos em linhagem celular HepG2 (KNASMÜLLER et al., 2004). Essas alterações caracterizam as mutações, que decorrem da instalação de lesões nos cromossomos, não disjunção durante anáfase, amplificação gênica, o que resulta na formação de micronúcleos - principalmente a partir de quebras de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, não segregados durante o fuso mitótico, durante a divisão celular - (LARMARCOVAI et al., 2008; BHATIA; KUMAR, 2013). Cabe enfatizar que as alterações cromossômicas contribuem para a formação de micronúcleos e estes são considerados como um importante marcador biológico do câncer (BAKHOUM; COMPTON, 2012; BAKHOUM et al., 2018).

Tabela 1. Avaliação da mutagenicidade sobre células de S-180 induzida por Citrinina, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 µg/ml avaliados por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN).

Danos Mutagênicos e Alterações Citogenéticas			
Tratamentos	Micronúcleos	Pontes Nucleoplasmáticas	Brotos nucleares
CN	6,00 ± 2,10	4,67 ± 2,52	7,00 ± 2,00
CP	27,67 ± 1,15 ^{***a}	39,67 ± 2,08 ^{***a}	26,67 ± 1,15 ^{***a}
CIT 0.5 µg/ml	11,00 ± 1,10 ^{***b}	9,00 ± 1,73 ^{***b}	11,00 ± 5,29 ^{***b}
CIT 1.0 µg/ml	15,33 ± 5,50 ^{**a***b}	11,33 ± 1,15 ^{***b}	28,67 ± 1,53 ^{***a}
CIT 2.0 µg/ml	24,67 ± 3,06 ^{***a}	14,00 ± 4,10 ^{*a***b}	27,33 ± 1,15 ^{***a}

ANOVA-One-way e pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (MD±DP) de p<0.05*, p<0.01** e p<0.001*** para ^a comparado ao Controle negativo (CN), ^b ao Controle positivo (CP).

Os MN são encontrados em células em divisão que apresentam quebras cromossômicas sem centrômeros (fragmentos acêntricos) e/ou cromossomos inteiros que são incapazes de se deslocar para os pólos opostos da célula durante o ciclo celular e tornam-se encapsulados por envoltório nuclear durante a telófase (SINITSKY; DRUZHININ, 2014). Desta forma, o aumento da frequência de MN pode estar associado a deficiências nas respostas de lesões ao DNA. Pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares são importantes marcadores para avaliação de alterações citogenéticas. Desta forma, pontes nucleoplasmáticas são oriundas de cromossomos dicêntricos (fornecendo uma medida adicional de rearranjo cromossômico), enquanto que os brotos nucleares ou “*buds*” representam um mecanismo em que as células removem DNA amplificado, funcionando como um importante marcador de amplificação gênica (FENECH, 2000; FENECH, 2006; FENECH et al., 2011).

Várias manifestações de amplificação gênica estão associadas com fenótipo maligno e podem aparecer durante o ciclo celular (SHIMIZU, 2009). A instabilidade cromossômica contribui para as neoplasias humanas, através da má disjunção cromossômica e aneuploidia, além das lesões ao DNA, mutações e translocações cromossômicas (MALUMBRES; BARBACID, 2009), que podem culminar em efeitos apoptóticos.

A apoptose é um tipo de morte celular programada que se caracteriza pela fragmentação do núcleo, condensação da cromatina e desintegração do DNA cromossômico (SU et al., 2015). CIT também foi capaz de induzir citotoxicidade nas concentrações de 1 e 2 µg/mL, pela redução do índice de divisão nuclear (IDN) e pelo índice de danos nucleares indicativos de citotoxicidade (IDNC), quando comparado ao CN. Esses dados apontam que os efeitos citotóxicos da CIT ocorrem por danos citogenéticos observados por indução de alterações nucleares mutagênicas, que podem levar a instabilidade genética e indução da morte celular. Cabe enfatizar que a CIT induziu efeitos similares para IDNC, micronúcleos e brotos nucleares às células tratadas com Dox, na maior concentração (**Tabela 2**).

A CIT, em altas doses (140 mg/kg e 420 mg/kg), induz EROs e perda mitocondrial, por meio da liberação do complexo citocromo-*c*, levando à apoptose, além de peroxidação lipídica (BALDI et al., 2004) e pode estar relacionada ao aumento da razão *Bax- Bcl2*, perda do potencial de membrana, indução do citocromo-*c* e ativação de caspases (CHAN, 2007). Estudos têm relacionado a citotoxicidade da CIT com a indução de apoptose (YU et al., 2006; CHAN, 2007) e indução de necrose em células hepáticas (MEHDI; CARLTON; TUIE, 1982; 1983). Estudos apontam que a sinalização apoptótica, induzida pela CIT, é convergente à via dependente de mitocôndria (FLAJS; PERAICA, 2009; HUANG et al., 2009; KUMAR et al., 2011; MÁTÉ et al., 2014; BABU et al., 2017), pelo aumento de EROs, como o principal indutor da sinalização apoptótica (HUANG; CHAN, 2017).

A via apoptótica intrínseca (dependente de mitocôndria) é mediada por sinais intracelulares (como danos citogenéticos, altas concentrações de cálcio citosólico e estresse oxidativo) que convergem a nível mitocondrial em resposta a diferentes condições de estresse e funcionam como desencadeadores do início da via mitocondrial (GREEN; KROEMER, 2004; PISTRITTO et al., 2016). A ativação imediata de membros, pró-apoptóticos, da família Bcl-2 neutraliza as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL (ambas responsáveis por controlar a permeabilidade da membrana mitocondrial) viabilizando a ruptura da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, possibilitando que as proteínas do espaço intermembranoso se espalhem no citosol (SU et al., 2015). Essas proteínas incluem os chamados fatores

apoptogênicos, como o citocromo-*c*, que desempenham um importante papel na ativação da apoptose dependente de mitocôndria (DANIAL; KORSMEYER, 2004; PISTRITTO et al., 2016).

Tabela 2. Índice de divisão nuclear (IDN), índice de danos nucleares indicativos de citotoxicidade (IDNC), frequência de apoptose e necrose celular em células de S-180, induzidos por Citrinina (CIT), nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 µg/mL, avaliados por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN).

Tratamentos	Danos Toxicogênicos			
	IDN	IDNC	Apoptose	Necrose
CN	1,65 ± 0,02	1,60 ± 0,01	29,33 ± 2,31	16,33 ± 2,52
CP	1,19 ± 0,02***a	1,18 ± 0,02***a	302 ± 17,44	109 ± 11,53
CIT 0.5 µg/ml	1,55 ± 0,06***b	1,49 ± 0,02***b	29,67 ± 8,1***b	17,6 ± 2,08***b
CIT 1.0 µg/ml	1,34 ± 0,06**a**b	1,31 ± 0,05**a**b	60,67 ± 4,04**a***b	37 ± 2,65**a***b
CIT 2.0 µg/ml	1,27 ± 0,02**a**b	1,22 ± 0,07***a	67,33 ± 11,3***a***b	45,67 ± 3,21**a***b

ANOVA-One-way e pós-teste de Bonferroni. Valores significantes (MD±DP) de p<0.05*, p<0.01** e p<0.001*** para ^a comparado ao Controle negativo (CN), ^b ao CP (Doxorrubicina).

4. CONCLUSÕES

A CIT, nas concentrações testadas, especialmente, em 2,0 µg/mL, induziu citotoxicidade e efeito antitumoral em cultura primária de S180. O efeito antitumoral foi observado por meio de variados mecanismos citogênicos: que levam a: (1) Indução de citotoxicidade pela redução da viabilidade celular; (2) Indução de genotoxicidade por meio do estresse oxidativo; (3) Eventos clastogênicos e/ou aneugênicos pela indução de micronúcleos, como também a formação de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares; (4) Citotoxicidade por meio de anormalidades nucleares ao observar redução do IDN e IDNC, que levaram a indução de apoptose e necrose. O estudo também aponta que os mecanismos oxidativos podem implicar alterações citogênicas envolvidas em ações antitumorais da CIT.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, M. V. O. B.; ISLAM, M. T.; ROCHA, L. M. C.; QUEIROZ, J. L.; SILVA, M. B. S.; MATA, A. M. O. F.; CARVALHO, R. M.; GOMES JÚNIOR, A. L.; MORAES, G. P.; PAZ, M. F. C. J.; CERQUEIRA, G. S.; DANTAS, S. M. M. M.; SOUSA, I. J. O.;

FERREIRA, P. M. P.; CAVALCANTE, A. A. C. M. Ascorbic acid modulates doxorubicin and cyclophosphamide-induced cytogenetic damages in Sarcoma 180 Cells. **International Archives of Medicine**, v. 9, n. 181, p. 1-10, 2016.

ANDRADE, T. J. A. S. **Investigação Química e Biológica dos Metabólitos Secundários Derivados de Macroalgas Marinhas e Microrganismos Associados**. Tese de doutorado em Química, Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2014. p.358.

AU, W. W.; GIRI, A. K.; RUCHIRAWAT, M. Challenge assay: A functional biomarker for exposure-induced DNA repair deficiency and for risk of cancer. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, p. 32-39, 2010.

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.

BABU, G. R. S.; IIAIYARAJA, N.; KHANUM, F.; ANAND T. Cytoprotective propensity of green tea polyphenols against citrinin-induced skeletal-myotube damage in C2C12 cells. **Cytotechnology**, v. 69, n. 4, p. 681-697, 2017.

BAKHOUM, S. F.; NGO, B.; LAUGHNEY, A. M.; CARVALHO, J. A.; MURPHY, C. J.; LY, P.; SHAH, P.; SRIRAM, R. K.; WATKINS, T. B. K.; TAUNK, N. K.; DURAN, M.; PAULI, C.; SHAW, C.; CHADALAVADA, K.; RAJASEKHAR, V. K.; GENOVESE, G.; VENKATESAN, S.; BIRKBAK, N. J.; MCGRANAHAN, N.; LUNDQUIST, M.; LAPLANT, Q.; HEALEY, J. H.; ELEMENTO, O.; CHUNG, C. H.; LEE, N. Y.; IMIELENSKI, M.; NANJANGUD, G.; PE'ER, D.; CLEVELAND, B. W.; POWELL, S. N.; LAMMERDING, J.; SWANTON, C.; CANTLEY, L. C. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. **Nature**, v. 553, p. 467-472, 2018.

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.

BALDI, A.; LOSIO, M. N.; CHELI, F.; REBUCCI, R. SANGALLI, L.; FUSI, E.; BERTASI, B.; PAVONI, E.; CARLI, S.; POLITIS, I. Evaluation of the protective effects of α -tocopherol and retinol against ochratoxin A cytotoxicity. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 507-512, 2004.

BAMODU, O. A.; HUANG, W. -C.; TZENG, D. T. W.; WU, A.; WANG, L. S.; YEH, C. -T.; CHAO, T. -Y. Ovatodiolide sensitizes aggressive breast cancer cells to doxorubicin anticancer activity, eliminates their cancer stem cell-like phenotype, and reduces doxorubicin-associated toxicity. **Cancer Letters**, v. 364, n. 2, p. 125-134, 2015.

BAUMSTARK-KHAN, C.; HELLWEG, C. E.; REITZ, G. Cytotoxicity and genotoxicity reporter systems based on the use of mammalian cells. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 118, p. 113-151, 2010.

BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. **APMIS**, v. 121, n. 7, p. 569-81, 2013.

BOUSLIMI, A.; OUANNES, Z.; GOLLI, E. E.; BOUAZIZ, C.; HASSEN, W.; BACHA, H. Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxin A

- and citrinin: Individual and combined effects. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 18, p. 341-349, 2008.
- BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: A chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 143-163, 2004.
- CHAGAS, G. M.; KLIIPPEL, M. L. W.; CAMPELLO, A. P.; BUCHI, D. F.; OLIVEIRA, M. B. M. Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. **Cell Structure and Function**, v. 19, p. 103-108, 1994.
- CHAGAS, G. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; CAMPELLO, A. P.; KLUPPEL, M. L. W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. IV. Effect on Ca²⁺ transport. **Cell Biochemistry and Function**, v. 13, p. 53-59, 1995.
- CHAN, W. H. Citrinin induces apoptosis in mouse embryonic stem cells. **IUBMB Life**, V. 60, N. 3, P. 171-179, 2008.
- CHAN, W. H. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. **Biochemical Journal**, v. 404, n. 2, p. 317-326, p. 2007.
- CHANG, C. H.; YU, F. Y.; WANG, L. T.; LIN, Y. S.; LIU, B. H. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, n° 237, p. 281 – 287, 2009.
- CHANG, C.H.; YU, F.Y.; WU, T.S.; WANG, L.T.; LIU, B.H. Mycotoxin Citrinin Induced Cell Cycle G2/M Arrest and Numerical Chromosomal Aberration Associated with Disruption of Microtubule Formation in Human Cells. **Toxicological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 84-92, 2011.
- CHEN, C.C.; CHAN, W.H. Inhibition of Citrinin-Induced Apoptotic Biochemical Signaling in Human Hepatoma G2 Cells by Resveratrol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3338-3357, 2009.
- CHEN, L.; GONG, M. W.; PENG, Z. F.; ZHOU, T.; YING, M. G.; ZHENG, Q. H.; LIU, Q. Y.; ZHANG, Q. Q. The marine fungal metabolite, dicitrinone B, induces A375 cell apoptosis through the ROS-related caspase pathway. **Marine Drugs**, v. 12, n. 4, p. 1939-1958, 2014.
- CHEN, L.; HUANG, K.; ZHONG, P.; HU, X.; FANG, Z. X.; WU, J. L.; ZHANG, Q. Q. Tumonoic acids K and L, novel metabolites from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Heterocycles**, v. 85, n. 2, p. 413–419, 2012.
- CHEN, L.; LIU, W.; HUANG, K.; HU, X.; FANG, Z. X.; WU, J. L.; ZHANG, Q. Q. Penicitrinols F–I, new citrinin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 4, p. 515–517, 2011
- CHEON, D.J.; ORSULIC, S. Mouse models of cancer. **Annual Review of Pathology**, v. 6, n.1, pp. 95-119, 2011.
- CLARK, B. R.; CAPON, R. J.; LACEY, E.; TENNANT, S.; GILL, J. H. Citrinin revisited: from monomers to dimers and beyond. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 1520-1528, 2006.
- DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219, 2004.

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.

DEPUYDT, J.; BAEYENS, A.; BARNARD, S.; BEINKE, C.; BENEDK, A.; BEUKES, P.; BURACZEWSKA, I.; DARROUDI, F.; DE SANCTIS, S.; DOMINGUEZ, I.; GIL, O. M.; HADJIDEKOVA, V.; KIS, E.; KULKA, U.; LISTA, F.; LUMNICZKY, K.; M'KACHER, R.; MOQUET, J.; OBREJA, D.; OESTREICHER, U.; PAJIC, J.; PASTOR, N.; POPOVA, L.; REGALBUTO, E.; RICOULT, M.; SABATIER, L.; SLABBERT, J.; SOMMER, S.; TESTA, A.; THIERENS, H.; WOJCIK, A.; VRAL, A. RENEB intercomparisom exercises analyzing micronuclei (Cytokinesis-block micronucleus assay). **International Journal of Radiation Biology**, v. 93, n. 1, p. 36-47, 2017.

DESHMUKH, S. K.; PRAKASH, V.; RANJAN, N. Marine fungi: A source of potential anticancer compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, doi: 10.3389/fmicb.2017.02536, 2017.

DU, L.; ZHU, T.; LIU, H.; FANG, Y.; ZHU, W.; GU, Q. Cytotoxic polyketides from a marine-derived fungus *Aspergillus glaucus*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 11, p. 1837-1842, 2008.

EL-NEKETI, M.; EBRAHIM, W.; LIN, W.; GEDARA, S.; BADRIA, F.; SAAD, H. E. A.; LAI, D.; PROKSCH, P. Alkaloids and Polyketides from *Penicillium citrinum*, na Endophyte isolated from the Moroccan plant *Ceratonia siliqua*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1099-1104, 2013.

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. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

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.; SURRALLES, 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.

FLAJS, D.; PERAICA, M. Toxicological Properties of Citrinin. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, p. 457 – 464, 2009.

GAYATHRI, L.; DHIVYA, R.; DHANASEKARAN, D.; PERIASAMY, V. S.; ALSHATWI, A. A.; AKBARSHA, M. A. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: *In vitro* study in HepG2 cell. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 151 - 163, 2015.

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

- GIAM, M.; RANCATI, G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. **Cell Division**, v. 10, n. 3, 2015.
- GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626-629, 2004.
- GRUJIČIĆ, D.; RADOVIĆ, M.; ARSENIJEVIĆ, S.; MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ, O. Cytogenetic biomarkers in detection of genotoxic effects of gestagens in peripheral blood lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Medical Genetics**, v. 59, n. 12, p. 624-633, 2016.
- GUBIANI, J. R.; ZERAIK, M. L.; OLIVEIRA, C. M.; XIMENES, V. F.; NOGUEIRA, C. R.; FONSECA, L. M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Biologically active eremophilane-type sesquiterpenes from *Camarops* sp., an endophytic fungus isolated from *Alibertia macrophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 668-672, 2014.
- 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.
- HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, p. 4688-4716, 2009.
- HUANG, C. H.; CHAN, W. H. Protective effects of liquiritigenin against citrinin-triggered, oxidative-stress-mediated apoptosis and disruption of embryonic development in mouse blastocysts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2538-2556, 2017.
- HUANG, Y. T.; LAI, C. Y.; LOU, S. L.; YEH, J. M.; CHAN, W. H. Activation of JNK and PAK2 is essential for citrinin-induced apoptosis in a human osteoblast cell line. **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 343-356, 2009.
- IMANIKIA, S.; GALEA, F.; NAGY, E.; PHILLIPS, D. H.; STÜRZENBAUM, S. R.; ARLT, V. M. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 356-361, 2016.
- IWAHASHI, H.; KITAGAWA, E.; SUZUKI, Y.; UEDA, Y.; ISHIZAWA, Y.; NOBUMASA, H.; KUBOKI, Y.; HOSODA, H.; IWAHASHI, Y. Evaluation of Toxicity of the Mycotoxin Citrinin Using Yeast ORF DNA Microarray and Oligo DNA Microarray. **BMC Genomics**, v. 8, n. 95, 2007.
- JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-221, 2008.
- 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.
- KESHAVA, N.; ONG, T.-M. Occupational exposure to genotoxic agents. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 437, n. 2, p. 175-194, 1999.
- KINGHORN, A. D.; CARCACHE DE BLANCO, E. J.; CHAI, H. B.; ORJALA, J.; FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D.; OBERLIES, N. H.; WANI, M. C.; KROLL, D. J.; PEARCE, C. J.; SWANSON, S. M.; KRAMER, R. A.; ROSE, W. C.; FAIRCHILD, C. R.;

- VITE, G. D.; EMANUEL, S.; JARJOURA, D.; COPE, F. O. Discovery of anticancer agents of diverse natural origin. **Pure and Applied Chemistry**, v. 81, n. 6, p. 1051-1063, 2009.
- KNASMÜLLER, S.; CAVIN, C.; CHAKRABORTY, A.; DARROUDI, F.; MAJER, B. J.; HUBER, W. W.; EHRLICH, V. A. Structurally Related Mycotoxins Ochratoxin A, Ochratoxin B, and Citrinin Differ in Their Genotoxic Activities and in Their Mode of Action in Human-Derived Liver (HepG2) Cells: Implications for Risk Assessment. **Nutrition and Cancer**, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2004.
- KNECHT, A.; SCHWERDT, G.; GEKLE, M.; HUMPF, H. U. Combinatory effects of citrinin and ochratoxin A in immortalized human proximal tubule cells. **Mycotoxin Research**, v. 21, n. 3, p. 176-181, 2005.
- KUMAR, M.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A. K.; SANKAR, M.; PATIL, R. D.; SINGH N. D. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A- and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 1, p. 90-98, 2014.
- KUMAR, R.; DWIVEDI, P. D.; DHAWAN, A.; DAS, M.; ANSARI, K. M. Citrinin-Generated Reactive Oxygen Species Cause Cell Cycle Arrest Leading to Apoptosis via the Intrinsic Mitochondrial Pathway in Mouse Skin. **Toxicological Sciences**, v. 122, n. 2, p. 557-566, 2011.
- LAN, J.; GOU, N.; GAO, C.; HE, M.; GU, A. Z. Comparative and mechanistic genotoxicity assessment of nanomaterials via a quantitative toxicogenomics approach across multiple species. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 21, p. 12937-12945, 2014.
- LARMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R. A.; ORSIÈRE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 215-233, 2008.
- 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, J. L.; WANG, S. L.; HAN, J. X.; XU, H.; XU, X. B.; XUE, J. Y. Inhibition of Yuyihe Powder on tumor growth in mice models of Sarcoma 180. **Chinese Herbal Medicines**, v. 9, n. 2, p. 183-187, 2017.
- LI, T.; KON, N.; JIANG, L.; TAN, M.; LUDWIG, T.; ZHAO, Y.; BAER, R.; GU, W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1269-1283, 2012.
- LIU, Q. Y.; ZHOU, T.; ZHAO, Y. Y.; CHEN, L.; GONG, M. W.; XIA, Q. W.; YING, M. G.; ZHENG, Q. H.; ZHANG, Q. Q. Antitumor Effects and Related Mechanisms of Penicitrinine A, a Novel Alkaloid with a Unique Spiro Skeleton from the Marine Fungus *Penicillium citrinum*. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 4733-4753, 2015.
- LUZ, E. W. M.; VIEIRA, L. R.; SEMEDO, J. G.; BONA, S. R.; FORGIARINI, L. F.; PEREIRA, P.; CAVALCANTE, A. A. M.; MARRONI, N. A. P.; PICADA, J. N. Neurobehavioral effects of L-carnitine and its ability to modulate genotoxicity and oxidative stress biomarkers in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 110, p. 40-45, 2013.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 153-166, 2009.

MALVEZZI, M.; CARIOLI, G.; BERTUCCIO, P.; BOFFETTA, P.; LEVI, F.; La VECCHIA, C.; NEGUI, E. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. **Annals of Oncology**, v. 29, n. 4, p. 1016-1022, 2018.

MÁTÉ, G.; GAZDAG, Z.; MIKE, N.; PAPP, G.; PÓCSI, I.; PESTI, M. Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Toxicon**, v. 90, p. 155-166, 2014.

MEHDI, N. A. Q.; CARLTON, W. W.; TUIITE, J. Acute toxicity of citrinin in turkeys and ducklings. **Avian Pathology**, v. 12, n. 2, p. 221-233, 1983.

MEHDI, N. A. Q.; CARLTON, W. W.; TUIITE, J. Citrinin mycotoxicosis in broiler chickens. **Food and cosmetics toxicology**, v. 19, p. 723-733, 1981.

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.

NAKAJIMA, Y.; IGUCHI, H.; KAMISUKI, S.; SUGAWARA, F.; FURUICHI, T.; SHINODA, Y. Low doses of the mycotoxin citrinin protect cortical neurons against glutamate-induced. **Journal Toxicological Sciences**, v. 41, n. 2, p. 311-319, 2016.

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.

NASKAR, S.; CHAKRAVERTY, R.; GHOSH, A. Mycotoxin: An alternate source of anticancer drug. **International Research Journal of Phamaceutical and Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 31-41, 2015.

OLIVEIRA FILHO, J. W. G.; ISLAM, M. T.; ALI, E. S.; UDDIN, S. J.; SANTOS, J. V. O.; ALENCAR, M. V. O. B.; GOMES JÚNIOR, A. L.; PAZ, M. F. C. J.; BRITO, M. R. M.; SOUSA, J. M. C.; SHAW, S.; MEDEIROS, M. G. F.; DANTAS, S. M. M. M.; ROLIM, H. M. L.; FERREIRA, P. M. P.; KAMAL, M. A.; PIECZYNSKA, M. D.; DAS, N.; GUPTA, V. K.; MOCAN, A.; ANDRADE, T. J. A. S.; SINGH, B. N.; MISHRA, S. K.; ATANASOV, A. G.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. A comprehensive review on biological properties of citrinin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p.130-141, 2017.

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

PISTRITTO, G.; TRISCIUOGLIO, D.; CECI, C.; GARUFI, A.; D'ORAZI, G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Impact Journal on Aging**, v. 8, n. 4, p. 603-619, 2016.

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.

- SALAH, A.; BOUAZIZ, C.; PROLA, A.; SILVA, J. P.; J.; BACHA, H.; ABID-ESSEFI, S.; LEMAIRE, C. Citrinin induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells through endoplasmic reticulum stress. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 23-24, p. 1230-1241, 2017.
- 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.
- 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.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016.
- SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, p. 613-619, 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, p. 41-47, 2013.
- SINITSKY, M. Y.; DRUZHININ, V. G. The application of the cytokinesis-block micronucleus assay on peripheral blood lymphocytes for the assessment of genome damage in long-term residents of areas with high radon concentration. **Journal of Radiation Research**, v. 55, p. 61-66, 2014.
- 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.
- SU, Z.; YANG, Z.; XU, Y.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; YU, Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 48, 2015.
- TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASSA, C. R.; Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2012.
- 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, p. 541-557, 2011.
- TORRE, L. A.; BRAY, F. SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics, 2012. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, 2015.
- 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, Y.; ZHANG, N.; LI, Y. H.; ZHAO, L.; YANG, M.; JIN, Y.; XU, Y. N.; GUO, H. Citrinin exposure affects oocyte maturation and embryo development by inducing oxidative stress-mediated apoptosis. **Oncotarget**, v. 8, n. 21, p. 34525-34533, 2017.
- YAO, G.; SEBISUBI, F. M.; YUNG, L.; VOO, C.; HO, C. C.; TAN, G. T.; CHANG, L. C. Citrinin derivatives from the soil filamentous fungus *penicillium sp.* H9318. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1125-1129, 2011.

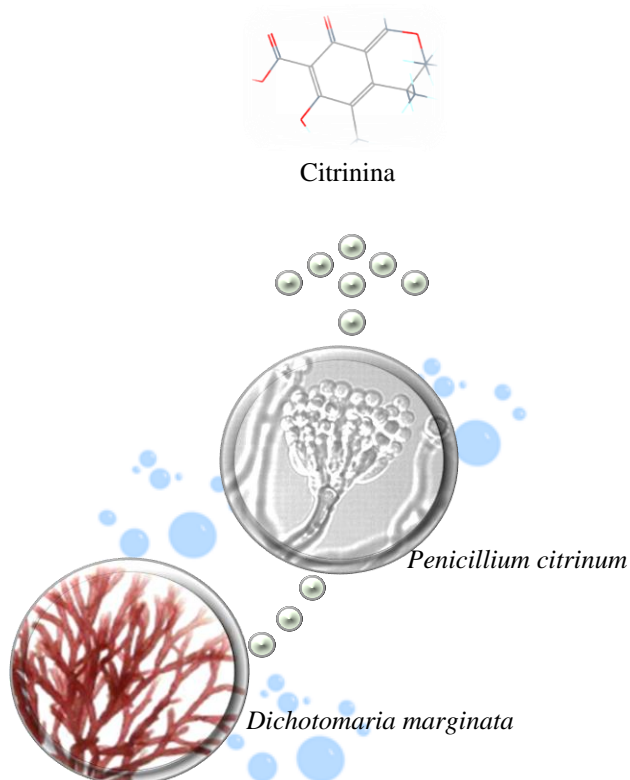
YU, F.Y.; LIAO, Y.C.; CHANG, C.H.; LIU, B.H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. **Toxicology Letters**, v. 161, p. 143-151, 2006.

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 4

Efeitos antitumorais da citrinina isolada do *Penicillium citrinum* em modelo animal para câncer de mama: monitoramento toxicológico e citogenético

Interpretar os efeitos antitumorais da citrinina, além de monitorar parâmetros comportamentais, bioquímicos, histopatológicos, imuno-histoquímicos e citogenéticos em modelo com camundongos fêmeas com câncer de mama em terapia com citrinina



OLIVEIRA FILHO, J. W. G.

Efeitos antitumorais da citrinina isolada do *Penicillium citrinum* em modelo animal para câncer de mama: monitoramento toxicológico e citogenético

José Williams Gomes de Oliveira Filho, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Rosália Maria Tôres de Lima, Antonielly Campinho dos Reis, Dulce Helena Siqueira Silva, José Victor de Oliveira Santos, Ag-Anne Pereira Melo de Menezes, Ana Maria Oliveira da Mata, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Muhammad Torequl Islam, João Marcelo de Castro e Sousa, Lina Clara Moreno, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Cellular Biochemistry* (ANEXO E)

QUALIS A2 – Biotecnologia

Resumo

Os fungos endofíticos são fontes de produtos naturais com atividades biológicas para formulações farmacêuticas. A citrinina, isolada do fungo endófito *Penicillium citrinum*, possui atividades tóxica, citotóxica, nefrotóxica, hepatotóxica, antioxidante e neuroprotetora. Este estudo avaliou os efeitos antitumorais da citrinina no carcinoma mamário induzido por 7,12-dimetilbenzantraceno com monitorização toxicogênica. Fêmeas virgens de *Mus musculus* foram divididas em quatro grupos tratados com: (1) azeite de oliva (10 mL / kg); (2) 7,12-dimetilbenzantraceno (6 mg/kg, v.o.); (3) citrinina (2 mg/kg, v.o) e (4) ciclofosfamida (25 mg/kg, i.p.). Testes metabólicos, comportamentais, hematológicos, bioquímicos, imunohistoquímicos, histopatológicos, genotóxicos e mutagênicos foram realizados. 7,12 dimetilbenzantraceno e ciclofosfamida induziram alterações comportamentais no rota rod e no teste de campo aberto, não observadas para a citrinina. Nenhuma alteração hematológica e bioquímica foi observada, exceto a redução de eosinófilos, monócitos e alterações hepáticas no grupo (3). Carcinoma mamário invasivo induzido por 7,12-dimetilbenzantraceno, observado em imuno-histoquímica e análise histopatológica. Este composto induziu efeitos genotóxicos nas células da mama, da medula óssea, dos linfócitos e do fígado, e mutagênico pela formação de micronúcleos, pontes, brotações e células binucleadas na medula óssea e no fígado. Observaram-se efeitos semelhantes de genotoxicidade para a citrinina e a ciclofosfamida após três semanas de tratamento, no entanto, observou-se a reparação do dano linfocitário, induzido pela citrinina. A citrinina induziu danos apoptóticos significativos, especialmente em células da mama e células binucleadas no fígado, mas não induziu aumentos significativos em outros marcadores citogenéticos na medula óssea e no fígado. Os dados indicam que marcadores citogenéticos estão envolvidos na indução de câncer de mama com 7,12 dimetilbenzantraceno, bem como mecanismos indicativos de apoptose durante a terapia com citrinina. Em nosso estudo, citrinina assume o papel de substância promissora para formulações farmacêuticas antitumorais.

Palavras-chave: 7,12-dimetilbenzantraceno. *Penicillium citrinum*. Citrinina. Ciclofosfamida. Câncer de mama.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma complexa doença que mais causa medo na sociedade, especialmente, devido ao envelhecimento (MAGALHÃES, 2013; CHO et al., 2017). Entre os tipos de câncer, o câncer de mama (CM) é a principal causa de morte no mundo, o que acarreta mais estudos relativos à quimioprevenção e quimioterapia (DONEPUDI et al., 2014). O CM evidencia-se através de um crescimento descontrolado, no tecido epitelial da mama, de células malignas (LUKONG, 2017), que afeta ambos os sexos, porém, mais frequentemente em mulheres com o avançar da idade (CUSTÓDIO-SANTOS; VIDEIRA; BRITO, 2017; ARRARAS et al., 2016). Os percentuais de ocorrência do CM, na maioria dos países, estão aumentando (DeSANTIS et al., 2015) em associação com as mudanças nos padrões reprodutivos: idade da primeira gravidez, quantidade de nascimentos/tempo de amamentação e idade da primeira menstruação (GONZÁLEZ-JIMÉNEZ et al., 2014; LUKONG, 2017). No entanto, as diversas terapias ainda apresentam limitações, como seletividade ao tecido neoplásico (RESTIFO; DUDLEY; ROSENBERG, 2012; VARGAS; HARRIS, 2016).

Para se avaliar o limiar de toxicidade em animais e humanos, agências reguladoras exigem estudos toxicológicos clínicos e não clínicos de pretendentes a fármacos (LI; LIN, 2015; VILLAIN et al., 2016). Os modelos animais apresentam relevância para a investigação de novos candidatos a agentes quimioterápicos (KEMP, 2015; KARNAM et al., 2017) e 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), que é um pró-carcinógeno químico que induz mutações em genes responsáveis pela ativação da carcinogênese mamária que, por ativação metabólica pelo conjunto enzimático citocromo P450 (CYP1A1 e CYP1B1), libera o metabólito carcinógeno dihidrodiolepóxido, que induz aduto ao DNA (BASKARAN et al., 2010; ALVARADO et al., 2017; XUE et al., 2017).

Produtos naturais extraídos de fungos endofíticos têm funcionado como importante alternativa para propostas de novas terapias oncológicas (SOUSA et al., 2013), especialmente os que atuam em mecanismos apoptóticos (YAACOB et al., 2015). A citrinina (CIT), um policetídeo extraído do fungo *Penicillium citrinum*, tem revelado propriedades antibacteriana (MAZUMDER et al., 2002), antifúngica (WAKANA et al., 2006), efeitos citotóxicos relacionados ao estresse oxidativo (IWAHASHI et al., 2007; CHEN; CHAN, 2009; BABU et al., 2017) e apoptóticos (FLAJS; PERAICA, 2009; HUANG et al., 2009; GAYATHRI et al., 2015). Os efeitos tóxicos da CIT relacionam-se ao estresse oxidativo, que promove um aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), estimula a produção de ânions superóxidos na cadeia respiratória (OLIVEIRA FILHO et al., 2017) e atua na ativação da parada

do ciclo celular G₂/M, devido à inibição da polimerização da tubulina interferindo na integridade do fuso mitótico durante a mitose, o que contribui para a indução de aberrações cromossômicas numéricas em células humanas (CHANG et al., 2011).

As drogas utilizadas nas terapias oncológicas apresentam alta atividade citotóxica em células neoplásicas, provocando também danos às células normais (ADÃO et al., 2013; RATTNER; BATHE, 2017), bem como riscos de danos ao material genético (STORNETTA et al., 2017). Assim, a avaliação dos riscos toxicogenéticos de candidatos a antineoplásico e a compreensão da biologia do câncer são importantes e têm promovido segurança na investigação e no uso de vários protocolos quimioterápicos (TRENDOWSKI, 2015; ABRAMCZYK; BROZEK-PLUSKA, 2016; RATTNER; BATHE, 2017; YOON et al., 2017). Para tanto, os biomarcadores citogenéticos são relevantes e úteis na análise do risco genético (RIM; KIM, 2015; GRUJIČIĆ et al., 2016).

Para a avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade, especialmente de forma associada, indicam-se os testes cometa e de micronúcleos (KANG et al., 2013). O teste cometa vem sendo aplicado na avaliação dos níveis de danos e mecanismos de reparo de DNA em células individualizadas (CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2011; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015) e, em sua versão alcalina, detecta quebras de fitas simples e/ou quebras de fitas duplas, sítios apurínicos e apirimidínicos, danos oxidativos, além da eficácia de reparo (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; OLIVE; BANÁTH, 2006; JHA, 2008; CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2011; GUNASEKARANAL; RAJ; CHAND, 2015).

Desse modo, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos antitumorais da CIT, isolada do extrato acetônitrila do *P. citrinum*, em modelo animal para o câncer de mama induzido pelo DMBA, por meio do monitoramento de alterações metabólicas, comportamentais, bioquímicas, hematológicas, histopatológicas e imuno-histoquímica, bem como identificação de alterações citogenéticas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes químicos

Todos os produtos químicos e reagentes necessários para realizar deste estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Chem. Co. St. Louis, Missouri, EUA).

2.2 Procedimentos experimentais gerais para isolamento da CIT

Foram utilizados solventes padrões analíticos das marcas Synth, Dinâmica, Merck: metanol, etila, n-hexano, acetonitrila. Estes solventes foram usados para extração e fracionamento. Para a separação cromatográfica em coluna aberta foi utilizado a fase estacionária Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich e, para o isolamento e crescimento dos microrganismos, foram utilizados os meios sólidos: Arroz parboilizado (Marcon®) e BDA (Batata Dextrose Agar-Sigma®). Os experimentos de ¹H RMN (500 MHz), ¹³C RMN (126 MHz), HMBC, HMQC, foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance DRX-500 com os solventes CDC₁₃ e DMSO-d₆ (CIL e Isotec-INC), sendo o solvente residual não deuterado como referência interna. O espectro de massas de ionização por eletrospray foi obtido no modo positivo usando um LTQ Orbitrap XL Hybrid com Transformada de Fourier (Thermo Scientific Instruments) acoplado a um sistema de CLAE Thermo Instruments (Detector Accela PDA, amostrador automático Accela e bomba Accela, Instrumentos Thermo Scientific). As seguintes condições foram usadas: tensão capilar 4,5 kV, temperatura capilar 260°C, taxa de fluxo de gás 10-20 unidades arbitrárias, taxa de fluxo de gás de arraste 40-50 unidades arbitrárias, tensão de pulverização 4,5 kV, intervalo de massa 100-1000 u.m.a (resolução máxima 30,000).

2.3 Coleta da macroalga *Dichotomaria marginata*

A macroalga vermelha *D. marginata* foi coletada em dezembro de 2009 na região norte de São Paulo, na praia de Fortaleza, na cidade de Ubatuba, Brasil (23°24'93 'e 45°03'41"W), durante o período de maré baixa. A Dra. Nair Yokoya (Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil) realizou a identificação de *D. marginata*. A exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, Brasil (N° SP400960).

2.4 Isolamento e identificação do fungo endófito *Penicillium citrinum*

O fungo endofítico *P. citrinum* foi isolado por meio de um procedimento padrão previamente descrito (GUBIANE et al., 2014), a partir do tecido interno da macroalga vermelha marinha *D. marginata*. Após o isolamento, a cultura pura *P. citrinum* foi enviada e classificada pela Dr^a. Anil Sazak (Ondokuz Mays Universities Fen Edebiyaties Fakulties Biyoloji Bolumu Kurupelit/Samsun Turkey).

2.5 Crescimento do fungo, Extração e Isolamento da CIT

A cepa fúngica endofítica *P. citrinum* foi cultivada em cinco frascos de Erlenmeyer, cada um contendo 90 g de arroz. O meio foi autoclavado quatro vezes (em quatro dias consecutivos), a 121°C durante 40 min. Após a esterilização, o meio foi inoculado com o endófito e incubado a 25° C, durante 21 dias. No final do período de incubação, as culturas foram combinadas, moídas e extraídas com CH₃OH (5 x 250 mL). O solvente foi evaporado, produzindo um extrato bruto de CH₃OH, que foi dissolvido em CH₃CN e particionado com hexano obtendo o extrato acetonitrila (EACNPc). Uma porção (900 mg) do extrato acetonitrila de *P. citrinum* (EACNPc) foi fracionado por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (70 cm x 3,0 cm) eluída com MeOH:DCM (1:1), obtendo-se 45 frações de aproximadamente 80 mL cada. A análise por CCD e CLAE-DAD/EM-IES [Coluna C18; MeOH:H₂O (5-100% MeOH), 254 nm], permitiu seu agrupamento em 16 novos grupos de frações por similaridade dos cromatogramas (FDm1Se-FDm16Se). A fração FDm9Se (79 mg) após lavagem com metanol, forneceu a substância CIT (30 mg). A estrutura da substância foi elucidada com base em dados de MS e ¹H e ¹³C RMN, bem como por comparação com dados da literatura (CLARK et al., 2006; YAO et al., 2011). CIT foi obtida como cristais agulhas de cor alaranjado, UV λ_{max} (MeOH) 318 nm. ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) 8,23 (s, H-1), 4,76 (qd, J 6,8, H-3), 2,97 (qd, H-4), 1,23 (d, 6,8, H-9), 1,35 (d, 7,2, H-10), 2,01 (s, H-11). O HRESIMS *m/z* [M+H]⁺ 251,0917 (calculado para C₁₃H₁₄O₅) e *m/z* 273,0735 [M+Na]⁺ (ANDRADE, 2014).

2.6 Animais

Os animais foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias – CCA, da Universidade Federal do Piauí. Para o monitoramento toxicogenético do DMBA, camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, virgens, da linhagem *Swiss*, albinos, com 6 a 7 semanas de idade e pesando entre 25 a 30 g, foram submetidas a aclimatação por uma semana, sob condições monitoradas de temperatura equivalente a 25 ± 1°C, e um ciclo de 12 horas claro/escuro, com livre acesso a ração tipo *pellets* (Purina®) e água. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) azeite (azeite de oliva 10 mL/kg, v.o.); 2) DMBA (6 mg/kg, v.o.); 3) CIT (2 µg/kg, v.o.) e 4) ciclofosfamida (25 mg/kg, i.p.). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (Nº 206/16, ANEXO F).

2.7 Modelo animal de câncer de mama induzido por DMBA

O ensaio de carcinogênese mamária foi conduzido de acordo com o protocolo descrito por Alencar et al. (2018), com adaptações. O DMBA foi dissolvido em azeite de oliva, e administrado por gavagem na dose semanal de 6 mg/kg. Os animais foram divididos em quatro grupos (n = 5/grupo). O grupo 1 foi tratado apenas com o veículo azeite de oliva (10 mL/kg, v.o.); os demais grupos foram tratados com DMBA (6 mg/kg, v.o.), por 11 semanas. Todos os animais utilizados foram pesados e a dose individual foi calculada baseada no peso (BARROS et al., 2004). A formação do tumor foi monitorada durante 11 semanas, por palpções físicas e mensuração do diâmetro com auxílio de paquímetro digital. Após a detecção do tumor mamário, 2 grupos (n=5/grupo), tiveram a administração com DMBA interrompida e passaram a receber terapia com CIT (2 µg/kg, v.o.) e ciclofosfamida (25 mg/kg, i.p.), respectivamente, por 3 semanas. A dose de 2 µg/kg de CIT foi estabelecida a partir dos estudos de viabilidade celular MTT em cultura celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, sugerido por Andrade (2014), bem como após estudos de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e viabilidade celular em linhagem sarcoma 180, descritos nos capítulos 02 e 03 desta tese. Após o tratamento dos animais, ambas as linhas mamárias foram dissecadas 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, coloração com hematoxilina e eosina e processamento histotécnico automático, para inclusão em parafina.

2.8 Monitoramento toxicológico

2.8.1 Análise metabólica e hipocrática

Para a investigação metabólica, os animais foram divididos nos seguintes grupos: azeite 10 mL/kg; DMBA 6 µg/kg; CPA 25 mg/kg; e CIT 2 µg/kg, alojados individualmente em gaiolas metabólicas durante 14 semanas. As gaiolas de aço inoxidável, apresentavam dimensões médias de: comprimento = 32 cm, largura = 25 cm e altura = 36,5 cm. Os animais foram mantidos à temperatura equivalente a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, e um ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais receberam ração e água filtrada em abundância. Para estimar a taxa metabólica, a quantidade de ração

ingerida, água consumida, micção e defecação foram medidos diariamente. Os animais também foram monitorados quanto às possíveis alterações da atividade geral (hipocrática), incluindo frênilo 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, após 30 minutos e 1h da administração semanal de DMBA e das terapias com CIT e CPA.

2.8.2 Campo aberto

O teste de campo aberto compreendeu 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, colocou-se cada animal no aparato, individualmente, 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, realizou-se a assepsia do equipamento com álcool 70%. A cada semana do tratamento, repetiu-se o campo. A CIT foi testada na dose de 2µg/Kg.

2.8.3 Rota rod

Testou-se a CIT na dose de 2µg/Kg. O teste de *rota rod* é aplicado para a avaliação da coordenação motora e relaxamento muscular produzido por drogas em animais. Após um intervalo de 5 minutos, os animais testados no campo aberto submeteram-se ao *rota rod*. Colocaram-se os camundongos 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. Mensuram-se o tempo de permanência na barra em segundos (TP) e o número de quedas (NQ) em triplicata (MACHADO et al., 2015). A cada semana de tratamento, repetiu-se o *rota rod*.

2.8.4 Análise bioquímica e hematológica

Na avaliação hematológica, o número de eritrócitos, o teor de hemoglobina, hematócrito, o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados como séries vermelhas, enquanto que o número de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos foram determinados em séries brancas, além das plaquetas. Realizou-se a análise em aparelho hematológico automático (*Advia 120/Hematology Siemens*). Para a análise bioquímica, colheu-se o sangue do coração, logo após eutanásia dos animais, e centrifugou-se a 4000 x g, durante 5 min (a 4°C). Submeteu-se o plasma 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).

2.8.5 Eutanásia e coleta dos órgãos

Após 11 semanas de tratamento com DMBA e 3 semanas (12^a, 13^a e 14^a) de terapia nos grupos com CIT e CP, sacrificaram-se os animais por sobredose de solução anestésica (pentobarbital sódico + xilazina [1:1], i.p.). Imediatamente, separaram-se, em caixa de gelo, o coração, o pulmão, o fígado, o baço e o rim. Os órgãos foram lavados com solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4), pesados e conservados em solução de formalina a 10%, por 24h e posterior manutenção em solução de álcool 70%.

2.8.6 Avaliação histopatológica

Os fragmentos de tecido mamário foram fixados em formaldeído a 3,5% em tampão fosfato (pH 7,6), juntamente com solução de sacarose a 1% e armazenados durante 12h a 4°C, até a sua utilização. Processou-se a fixação durante 20h, seguida por desidratação das peças em diluições crescentes de etanol/água (50, 70, 90 e 95%, v/v). O material seco foi imerso em xileno PA e lavado duas vezes em parafina e, posteriormente, emblocados (BEHMER; TOLOSA; NETO, 1976). Os blocos foram seccionados (4 µM), em micrótomo, e as secções distendidas em lâminas. Consequentemente, as secções distendidas foram desparafinizadas em

três banhos sucessivos de xileno PA e desidratadas em diluições decrescentes de etanol, conforme supracitado. Logo após, corou-se as lâminas com hematoxilina e eosina (ELGENGAIHI et al., 2016) e, finalmente, após lavagem e secagem, as lâminas foram cobertas por lamínulas com auxílio de bálsamo do Canadá.

2.8.7 Perfil imuno-histoquímico (Ki-67)

Dos blocos de tumores fabricados, prepararam-se secções de 3 μm . Após a desparafinação, realizou-se a recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0), por 20 minutos, a 95°C. Bloqueou-se a peroxidase endógena com 3% de H_2O_2 , durante 10 minutos, para reduzir a ligação não específica. Em seguida, incubaram-se, por 1h, as secções com anticorpo primário, Ki-67 (MIB-1, Dako), diluídos em diluente de anticorpo. Visualizaram-se os locais de ligação ao anticorpo pela incubação com solução de diaminobenzidina- H_2O_2 (DAB, Dako). Utilizou-se como controle uma secção de tecido normal (mama dos animais tratados com azeite). Analisou-se a imunorreacção 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 foi adotada como padrão para positividade da imunorreacção (LI et al., 2015).

2.9 Avaliação de danos genotóxicos, reparo de DNA e perfil mutagênico

2.9.1 Avaliação genotóxica e reparo de DNA

Realizou-se a versão alcalina do ensaio cometa, conforme descrito por Speit e Hartmann (2005), para análise do perfil genotóxico e capacidade de reparo de DNA. Alíquotas de 10 μL de sangue periférico caudal, fígado, medula óssea e rim foram coletadas e misturadas 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, incubaram-se as lâminas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH > 13), por 20 minutos e, logo em seguida,

foram expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0.90 V/cm), por 20 minutos em cuba de eletroforese. Ao final, neutralizaram-se as lâminas com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5, sendo coradas com solução de prata. Expressaram-se os resultados em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). Calculou-se o ID por meio da fórmula: $ID = \Sigma$ (número de células em determinada classe de dano X classe de dano), que variou de 0 a 400; e FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - n^{\circ}$ de células classe 0.

2.9.2 Avaliação mutagênica

A avaliação mutagênica utilizou-se o ensaio de CBMN, realizado de acordo com Moraes e colaboradores (2016). Resumidamente, a medula óssea colhida foi misturada com 0,3 mL de soro fetal bovino e espalhada em lâminas. O mesmo procedimento foi executado com porções coletadas e maceradas do fígado dos animais tratados. Além disso, amostra de sangue periférico e fígado foram espalhadas em lâminas por esfregaço. Os esfregaços foram secos durante 30 min à temperatura ambiente e fixados em metanol durante 10 min. Em seguida, coraram-se as lâminas com Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0,2 M/L (pH 5.8). Realizou-se a contagem de micronúcleos em 2000 células por fotomicrografia com aumento de 1000X.

2.10 Análise estatística

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

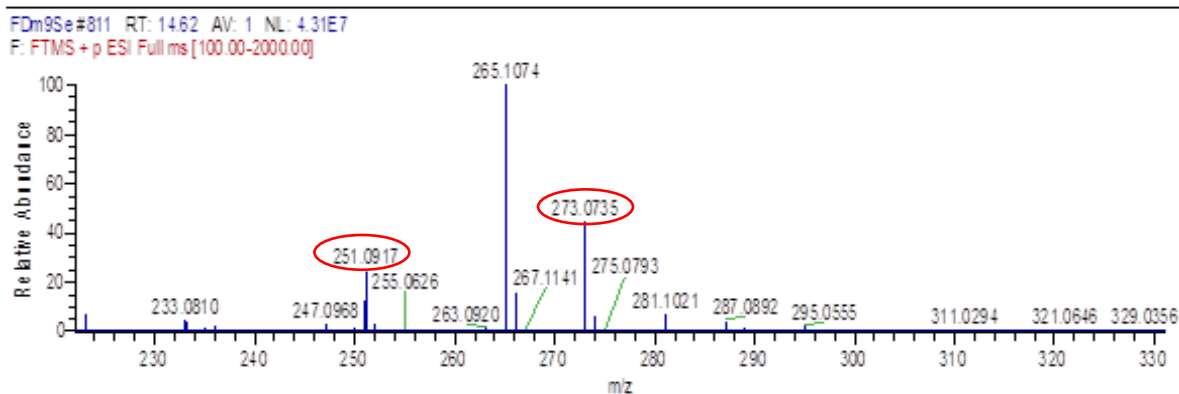
3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da citrinina (CIT) isolada do extrato acetonitrila oriundo do *Penicillium citrinum*

As análises de RMN 1H e ^{13}C levaram à identificação da substância CIT, HRESIMS m/z $[M+H]^+$ 251.0917 (calculado para $C_{13}H_{14}O_5$) e m/z 273.0735 $[M+Na]^+$ (**Figura 1**). 1H RMN

(CDCl₃, 500 MHz) 8.23 (s, H-1), 4.76 (qd, J=6.8, H-3), 2.97 (qd, H-4), 1.23 (d, J=6.8, H-9), 1.35 (d, J=7.2, H-10), 2.01 (s, H-11).

Figura 1. Espectro de massa (EM-IES (+)) da Citrinina.



3.2 Avaliação toxicológica, durante a indução do câncer de mama com DMBA e terapia com CIT, de carcinoma mamário

3.2.1 Monitoramento hipocrático, comportamental, metabólico e peso de órgãos

Durantes as 11 semanas de tratamento com DMBA e 3 semanas (12^a, 13^a e 14^a) de terapia, nos diferentes grupos, não foram evidenciadas alterações hipocráticas sugestivas de toxicidade. O azeite de oliva (10 mL/Kg), usado como veículo para o DMBA, não induziu alterações comportamentais de cruzamento, autolimpeza e levantamentos, bem como na atividade locomotora. Dados similares foram observados para a CIT. Entretanto, o DMBA apresentou alterações comportamentais no *rota rod*, quando comparado com o veículo pela redução do tempo de permanência na 1^a semana (169,00 ± 11,44 versus 180,00 ± 0,01); 5^a semana (1,69,40 ± 7,87 versus 180,00 ± 0,10); 6^a semana (168,87 ± 7,15 versus 180,00 ± 0,05); 7^a semana (168,57 ± 7,14 versus 180,00 ± 0,20) e 11^a semana (165,00 ± 8,03 versus 180,00 ± 0,03). Observaram-se também alterações induzidas pela DMBA, em comparação ao veículo pelo aumento do número de quedas para 11^a semana (1,85 ± 1,51 versus 0,00). A CPA, durante a 14^a semana, induziu aumento de levantamento quando comparado ao veículo (32,00 ± 6,32 versus 14,00 ± 4,55) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Avaliação comportamental e atividade locomotora de camundongos fêmeas, virgens, durante 14 semanas de tratamento com azeite, 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e terapias químicas com ciclofosfamida (CPA) e citrina a (CIT).

Grupos e semanas de tratamento		Parâmetros comportamentais e atividade locomotora				
		Campo aberto			Rota rod	
		<i>Cruzamento</i>	<i>Autolimpeza</i>	<i>Levantamento</i>	<i>TP (s)</i>	<i>NQ</i>
Azeite 10 mL/kg	S 01	83,20 ± 20,60	5,00 ± 2,14	12,00 ± 6,16	180,00 ± 0,01	0,40 ± 0,02
	S 02	81,00 ± 16,80	14,40 ± 3,05	24,00 ± 7,48	174,40 ± 7,43	1,40 ± 0,89
	S 03	83,60 ± 33,40	11,40 ± 5,12	24,00 ± 19,5	180,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	S 04	57,20 ± 9,44	14,00 ± 2,91	16,80 ± 2,16	176,80 ± 7,15	0,00 ± 0,00
	S 05	55,00 ± 14,80	12,60 ± 6,10	12,80 ± 6,26	180,00 ± 0,10	0,00 ± 0,00
	S 06	52,20 ± 21,40	9,80 ± 4,08	13,60 ± 8,05	180,00 ± 0,05	0,00 ± 0,00
	S 07	37,00 ± 26,40	8,40 ± 11,3	14,60 ± 4,55	180,00 ± 0,20	0,00 ± 0,00
	S 08	73,10 ± 15,00	7,70 ± 3,45	23,90 ± 5,46	180,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	S 09	80,00 ± 16,80	12,35 ± 5,23	27,74 ± 7,5	180,00 ± 0,03	0,00 ± 0,00
	S 10	82,30 ± 31,40	13,00 ± 4,42	22,41 ± 5,54	180,00 ± 0,02	0,00 ± 0,00
	S 11	56,50 ± 12,00	8,99 ± 2,34	23,60 ± 7,55	180,00 ± 0,03	0,00 ± 0,00
	S 12	55,00 ± 14,00	9,13 ± 3,51	21,80 ± 4,78	180,00 ± 0,10	0,00 ± 0,00
	S 13	55,20 ± 20,10	13,24 ± 5,1	18,59 ± 5,55	180,00 ± 0,10	0,00 ± 0,00
	S 14	39,00 ± 27,00	11,25 ± 5,12	14,00 ± 4,55	180,00 ± 0,02	0,00 ± 0,00
DMBA 6 mg/kg	S 01	68,20 ± 23,0	9,60 ± 4,82	20,60 ± 5,94	169,00 ± 11,44 ^a	1,40 ± 0,67
	S 02	82,00 ± 30,0	15,80 ± 6,14	27,20 ± 4,60	176,00 ± 6,92	0,40 ± 0,28
	S 03	65,00 ± 14,6	11,20 ± 1,30	19,60 ± 3,43	180,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	S 04	76,80 ± 11,3 ^a	15,80 ± 7,59	19,40 ± 10,6	176,60 ± 7,60	0,60 ± 0,12
	S 05	76,40 ± 18,9	15,40 ± 13,9	20,40 ± 4,03	169,40 ± 7,87 ^a	0,80 ± 0,32
	S 06	62,20 ± 24,3	11,40 ± 4,72	26,60 ± 12,1	168,87 ± 7,15 ^a	0,00 ± 0,00
	S 07	60,80 ± 7,19	14,70 ± 10,3	19,80 ± 7,08	168,57 ± 7,14	0,00 ± 0,00
	S 08	63,00 ± 5,80	10,30 ± 4,50	23,70 ± 7,30	180,00 ± 0,10	0,00 ± 0,00
	S 09	70,50 ± 6,20	12,34 ± 7,00	18,50 ± 5,20	180,00 ± 0,20	0,00 ± 0,00
	S 10	69,40 ± 3,90	13,43 ± 3,70	19,35 ± 4,30	180,00 ± 0,10	0,00 ± 0,00
	S 11	80,20 ± 14,00	15,37 ± 5,35	20,30 ± 5,34	165,00 ± 8,03 ^a	1,85 ± 1,51 ^a
CPA 25 mg/kg	S 12	54,67 ± 18,23	18,26 ± 6,24	22,6 ± 5,55	165,0 ± 15,00	4,30 ± 1,12
	S 13	78,00 ± 22,39	17,78 ± 4,78	21,8 ± 4,13	164,9 ± 13,50	1,80 ± 0,21
	S 14	68,28 ± 18,34	20,34 ± 9,73	32,00 ± 6,32 ^a	177,73 ± 12,24	1,80 ± 0,19
CIT 2 µg/kg	S 12	50,28 ± 15,51	14,0 ± 4,96	24,28 ± 6,77	175,57 ± 9,14	0,71 ± 1,46
	S 13	51,14 ± 13,65	15,14 ± 4,87	23,71 ± 6,52	179,14 ± 2,23	0,42 ± 1,11
	S 14	47,14 ± 31,60	13,42 ± 8,59	17,42 ± 10,81	178,14 ± 3,07	0,28 ± 0,47

Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). CIT = citrinina. 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. ^a p<0,05 comparado ao Azeite, na mesma semana.

Durante as três últimas semanas de tratamento (12^a, 13^a e 14^a), não se observaram alterações metabólicas significativas no grupo CIT quanto a peso corporal, consumo de ração, consumo de água, micção e defecação, quando comparadas ao grupo tratamento com o veículo (Tabela 2). O DMBA e a CPA não induziram alterações metabólicas (dados não mostrados).

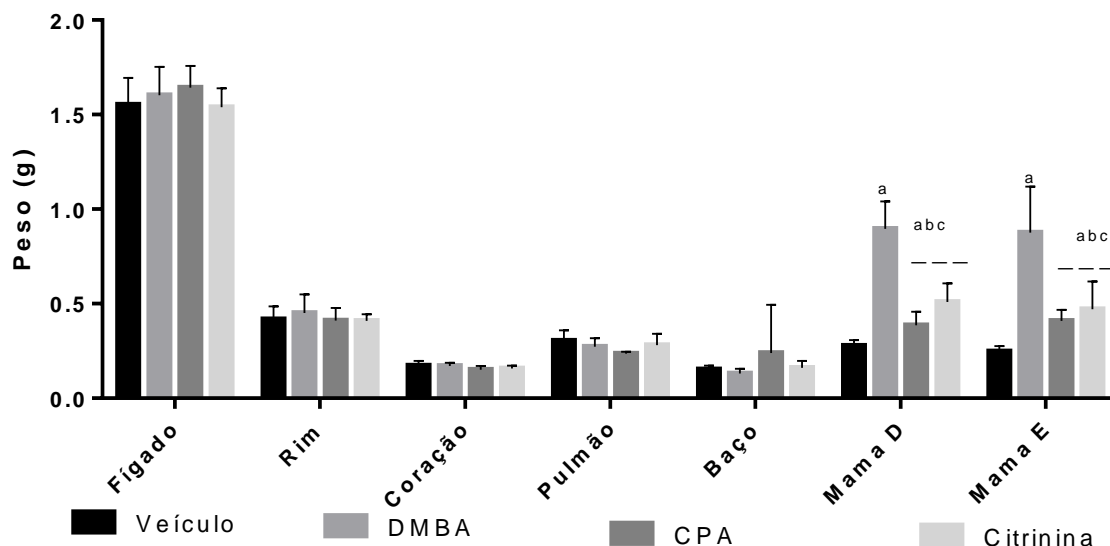
Tabela 2. Perfil metabólico durante terapia com citrinina (CIT) em camundongos *Swiss* fêmeas na 12^o, 13^o e 14^o semana de tratamento e veículo (azeite de oliva).

	Parâmetros	Grupos	
		Veículo	CIT 2 µg/kg
12 ^a semana	Peso corporal (g)	27,55 ± 3,30	27,86 ± 2,03
	Consumo de ração (g)	9,41 ± 3,56	12,00 ± 1,32
	Consumo de água (mL)	18,92 ± 7,66	25,11 ± 4,04
	Micção (mL)	1,85 ± 1,49	1,05 ± 0,73
	Defecação (g)	2,83 ± 0,88	2,52 ± 0,72
	Parâmetros	Grupos	
		Veículo	CIT 2 µg/kg
13 ^a semana	Peso corporal (g)	27,1 ± 3,99	29,61 ± 1,84
	Consumo de ração (g)	9,09 ± 2,52	11,07 ± 3,14
	Consumo de água (mL)	20,27 ± 7,68	23,77 ± 1,12
	Micção (mL)	1,36 ± 0,79	1,07 ± 0,70
	Defecação (g)	2,77 ± 1,02	3,27 ± 0,85
	Parâmetros	Grupos	
		Veículo	CIT 2 µg/kg
14 ^a semana	Peso corporal (g)	26,28 ± 0,45	29,67 ± 1,84
	Consumo de ração (g)	12,43 ± 1,58	10,11 ± 3,03
	Consumo de água (mL)	23,11 ± 1,45	18,88 ± 5,79
	Micção (mL)	1,44 ± 0,59	0,57 ± 0,47
	Defecação (g)	3,24 ± 1,23	2,92 ± 0,52

Os valores representam a média ± desvio padrão. ANOVA TWO WAY com pós teste de Bonferroni.

De forma similar ao observado para os perfis metabólicos, também não se observaram, durante a terapia com DMBA, CPA e CIT, alterações no peso dos seguintes órgãos: fígado, rins, coração, pulmão e baço, em relação ao veículo. No entanto, constataram-se significantes alterações no peso da mama direita, tratada com DMBA, em relação ao azeite. O tratamento com CIT e com CPA reduziu o peso de ambas as mamas, direita e esquerda (**Figura 2**).

Figura 2. Perfil do peso de órgãos de camundongos fêmeas, após 11 semanas de tratamento com DMBA e terapia com Citrinina (12^a, 13^a e 14^a semanas). Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5); citrinina 2 µg/kg. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno 6 mg/kg. CPA: ciclofosfamida 25 mg/kg. ^ap<0,05 comparado ao Veículo (azeite de oliva), ^bp<0,05 comparado ao grupo DMBA, ^cp<0,05 comparado ao grupo CPA (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).



3.2.2 Perfil bioquímico e hematológico após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com CIT

A CIT não induziu alterações hematológicas na série vermelha, como observado após 11 semanas de indução com DMBA e 03 semanas de terapia com CIT, como também para série branca, exceto para os percentuais de eosinófilos, basófilos, comparado aos dados obtidos para o veículo (**Tabela 3**). Entretanto, a terapia com CIT induziu alterações hepáticas, pelo significativo aumento da transaminase glutâmico-oxalacética (TGP), comparado ao grupo controle (**Tabela 4**). O DMBA e a CPA não induziram alterações hepáticas (dados não mostrados).

Tabela 3. Perfil hematológico após terapia com citrinina (CIT), em camundongos com câncer de mama induzido pelo DMBA.

Parâmetros	Veículo	CIT (2 µg/kg)
Série vermelha		
HEM (10 ⁶ /L)	9,30 ± 0,10	9,00 ± 0,70
HGB (g/dL)	16,18 ± 1,40	15,30 ± 1,40
HTC (%)	54,20 ± 1,40	51,56 ± 3,10
Série Branca		
Leucócitos (10 ³ /µL)	3328 ± 672,30	2834 ± 427,20
Neutrófilos (%)	11,90 ± 2,40	11,80 ± 0,70
Linfócitos (%)	78,20 ± 4,40	86,00 ± 5,90
Eosinófilos (%)	0,70 ± 0,10	0,10 ± 0,04 ^a
Monócitos (%)	9,80 ± 20,00	1,20 ± 2,20 ^a
Basófilos (%)	5,30 ± 0,10	6,00 ± 1,30
Outros		
Plaquetas (10 ³ /µL)	811,5 ± 130,6	853,1 ± 109,1

Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5); Veículo (azeite de oliva – 10 mL/Kg⁻¹). CIT: citrinina; HEM: hemácias; HGB: hemoglobina, HTC: hematócrito; ^a p<0,05 comparado ao grupo veículo (azeite de oliva) (Teste T de Student).

Tabela 4. Perfil bioquímico para enzimas renais e hepáticas após terapia com citrinina (CIT), em camundongos fêmeas, com câncer de mama induzido pelo DMBA.

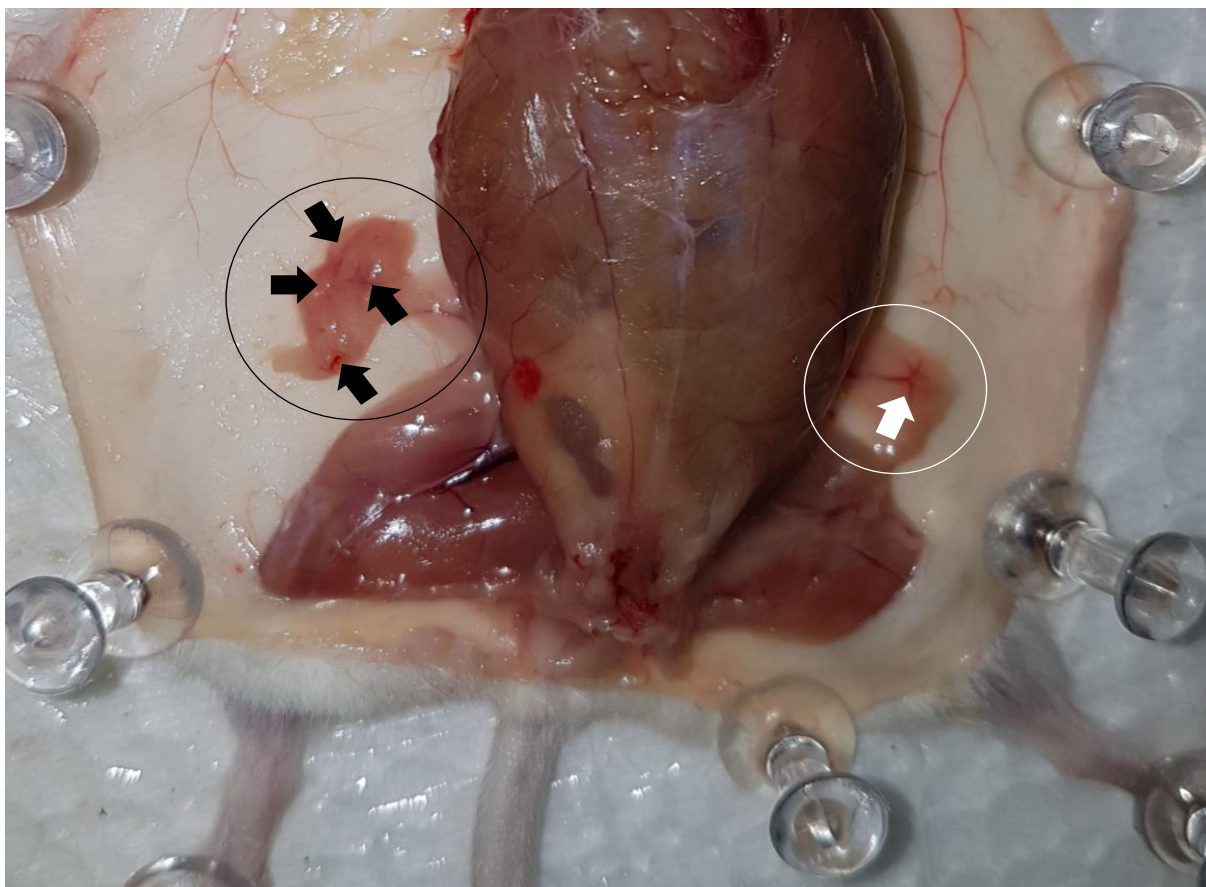
Parâmetros	Veículo	CIT 2 µg/kg
Renais		
Ureia (mg/dL)	48,70 ± 8,30	38,7 ± 9,40
Creatinina (mg/dL)	0,40 ± 0,05	0,50 ± 0,05
Hepáticos		
TGO (UL)	232,50 ± 80	231,5 ± 22,00
TGP (U/L)	143,00 ± 7,60	186,5 ± 24,60 ^a

Média ± desvio padrão (n = 4); CIT: citrinina; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica. ^ap<0,05 comparado ao grupo veículo (azeite de oliva) (Teste T de Student).

3.2.3 Análise macroscópica, histopatológica e imuno-histoquímica (Ki-67) da mama de animais por indução com DMBA e terapia com CIT

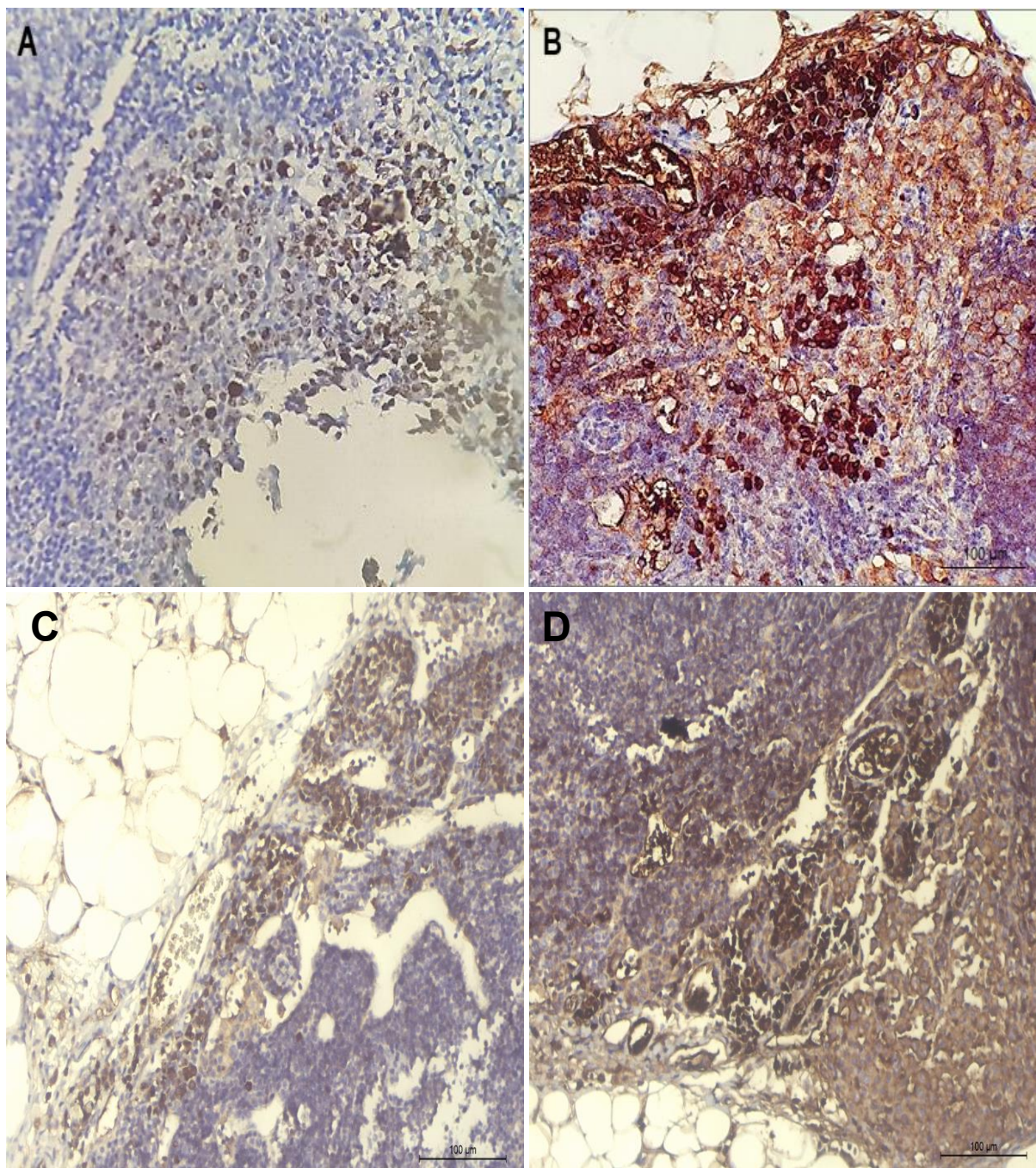
Observaram-se diferenças macroscópicas entre as mamas de camundongos fêmeas tratadas com CIT. A mama direita apresentava alterações características de processos inflamatórios, identificadas por áreas mais vascularizadas do que a mama esquerda (**Figura 3**).

Figura 3. Perfil macroscópico das mamas dos animais, após indução do câncer com DMBA e em terapia com CIT. Círculo preto: mama direita. Seta preta: indicação de uma maior vascularização da mama direita. Círculo branco: mama esquerda. Seta branca: indicação de uma menor vascularização da mama esquerda.



Para o DMBA, também se identificou uma moderada proliferação celular em percentuais de marcação para Ki-67 de $68,24 \pm 14,64^{***}$, e para CPA de $30,00 \pm 12,49^{***}$, considerando 400 (quatrocentas) marcações e com significância em relação ao veículo ($7,16 \pm 2,61$). No entanto, após a terapia com CIT, o percentual foi apenas de $14,64 \pm 4,04$. O percentual para Ki-67 do grupo com DMBA também foi significativo em relação a CIT, indicando mais proliferação celular para o indutor do câncer de mama (**Figura 4**).

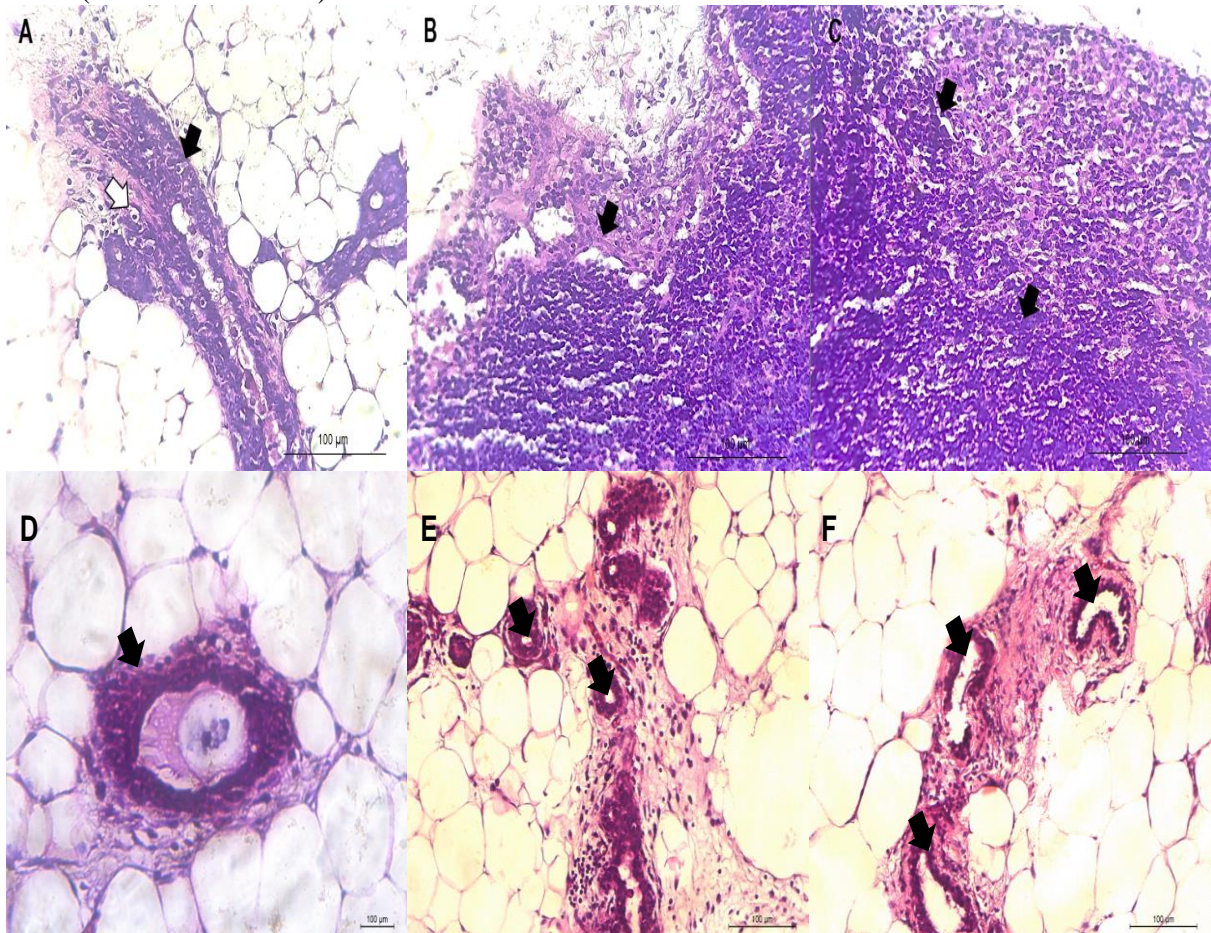
Figura 4. Perfil imuno-histoquímico de proliferação celular (Ki-67), analisado em mama direita de camundongos, após 11 semanas de indução do câncer com DMBA e 3 semanas (12^a, 13^a e 14^a) de terapia com citrinina (2 µg/kg). **A:** controle (azeite de oliva) – leve marcação (7,16 +). **B:** DMBA – moderada marcação (68,24, ++). **C:** CIT – marcação moderada (14,64, ++) e **D:** CPA com marcação moderada (30,00, ++). *Score* mensurado pela contagem individual de 400 células com citoplasma acastanhado (aumento de 200 X).



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 (**Figura 5A, B e C**). Também se observou que havia tecido conjuntivo misturado com a lesão – sugerindo carcinoma ductal

invasivo –, acompanhado de intensa proliferação celular, congestão vascular e hiperchromatismo nuclear. Quanto às mamas dos animais tratados com CIT (2 µg/kg), após indução do câncer com DMBA, não se observaram características indicativas de necrose. No entanto, as características do carcinoma ainda permaneciam tais como calcificação intraductal, tecido lesionado, fibrosado com hiperplasia ductal atípica, características histopatológicas indicativas de pré-neoplasia. Vale lembrar que o período de terapia com CIT (2 µg/kg) foi de apenas 3 semanas, período curto para uma terapia antineoplásica, mas suficiente para se identificar alterações significativas na redução das zonas de proliferação celular. Além disso, identificaram-se muitos osteócitos, células inflamatórias e proliferação celular atípica (**Figura 5 D, E e F**).

Figura 5. Perfil histopatológico da mama direita de camundongos fêmeas, após 11 semanas de tratamento com DMBA (A, B e C), e 3 semanas de terapia com citrulina (D, E e F). Em 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: calcificação intraductal. F: hiperplasia ductal atípica. Coloração H&E (aumento de 200X).



3.3 Mecanismos citogenéticos induzidos pelo DMBA, CPA e pela CIT

3.3.1 Genotoxicidade e apoptose induzidas pelo DMBA, CPA e CIT, em tecidos tumorais e não tumorais de camundongos fêmeas, e capacidade de reparo de DNA em linfócitos de sangue periférico

Durante a indução do CM (11 semanas), o DMBA (6 mg/kg por semana) induziu danos genotóxicos em células da mama e também em células não neoplásicas (medula óssea, fígado e linfócitos de sangue periférico), pelos significantes aumentos dos índices e frequências de danos, quando comparado ao veículo. A ciclofosfamida (CPA (25 mg/Kg), em três semanas de terapia, também causou efeitos similares ao DMBA. A CIT (2 µg/kg) assim como o antineoplásico CPA, induziu genotoxicidade após 3 semanas (12^a, 13 e 14^a semana) de terapia em carcinoma de mama de e em células não neoplásicas. Entretanto, tanto o DMBA (6 mg/kg) como também a CPA induziram significantes danos ao DNA em células mamárias, de fígado, medula óssea e em linfócitos de sangue periférico, quando comparados à CIT (**Figura 6**).

Como relatado, a CIT induziu genotoxicidade, pelos significantes aumentos dos índices e frequências de danos em linfócitos de sangue periférico. Entretanto, em estudos de reparo de DNA induzidos pelo DMBA, em linfócitos de sangue periférico, foi possível verificar que não houve reparo durante a indução do câncer. Entretanto, observaram-se efeitos de reparo na última semana da terapia com CIT, quando comparado ao dano basal (**Figura 7**).

Em relação aos níveis de apoptoses observados, por fragmentação nuclear, com o teste cometa, a CIT, na mama direita, induziu mais apoptoses que DMBA, bem como CPA. De forma contrária, nos demais tecidos analisados (fígado, medula e sangue periférico), o DMBA e a CPA induziram mais danos apoptóticos que a CIT (**Figura 8**).

Figura 6. Genotoxicidade da CIT em células neoplásicas (mama) e não neoplásicas (medula óssea, fígado e leucócitos de sangue periférico) de camundongos fêmeas, após 11 semanas de indução do câncer de mama com DMBA (6 mg/kg), seguidas de 3 semanas de terapia com o grupo citrinina (CIT, 2 µg/kg) e com o grupo ciclofosfamida (CPA, 25 mg/kg). Valores representam a média ± desvio padrão (n=5). CIT = citrinina. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. ^a p<0,0001 comparado ao grupo azeite, ^b p<0,0001 comparado a CIT (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

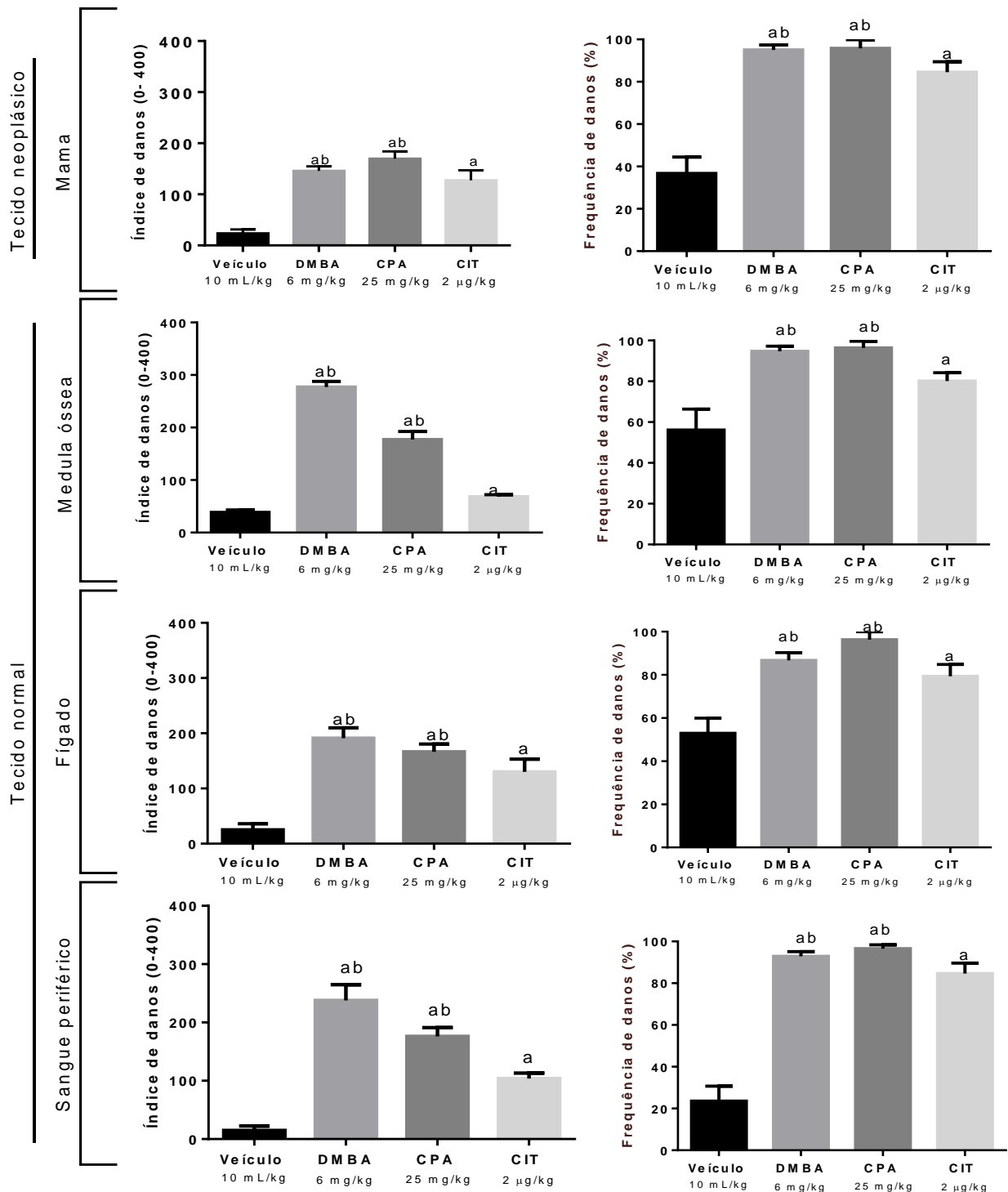


Figura 7. Estudo de reparo de danos ao DNA, em linfócitos de sangue periférico de camundongos fêmeas, durante a indução do câncer de mama com DMBA ($6 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) e terapia com CIT ($2\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$). A- ID = índice de danos e B - FD = frequência de danos. Realizaram-se cinco coletas de sangue da cauda, sendo a 1ª coleta a 0 h da indução do câncer com DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno a $6 \text{ mg}/\text{kg}$) e as 2ª, 3ª, 4ª e 5ª coletas durante a 8ª, 9ª, 10ª e 11ª semanas, respectivamente. A 11ª semana foi considerada dano basal para a terapia com CIT, seguida da 2ª e 3ª coleta na 12ª semana, da 4ª coleta na 13ª semana e da 5ª coleta no final da 14ª semana. Valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 5$). ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey. *** $p < 0,0001$ comparado aos danos basais e # comparado ao dano basal e as semanas de terapia com CIT.

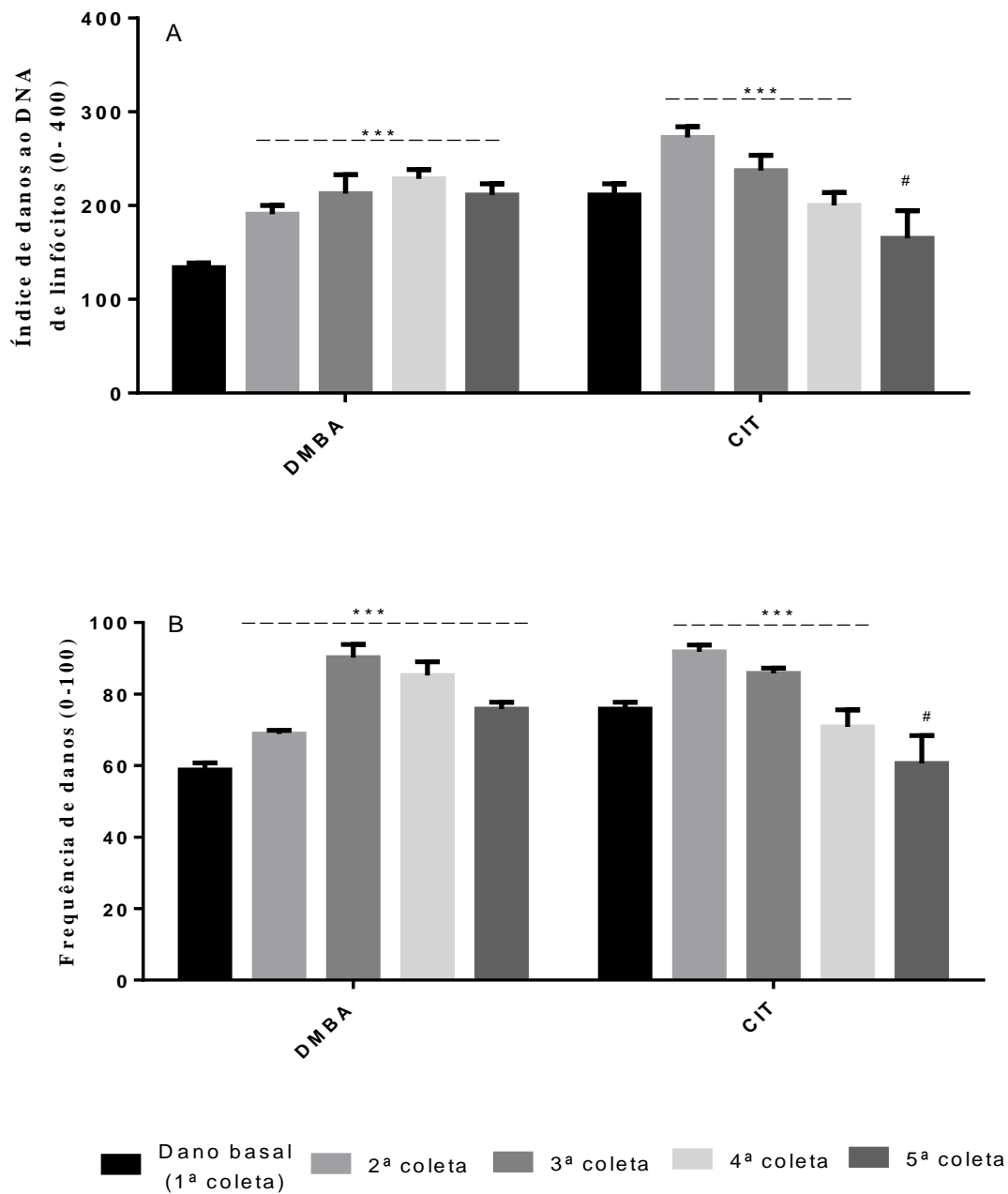
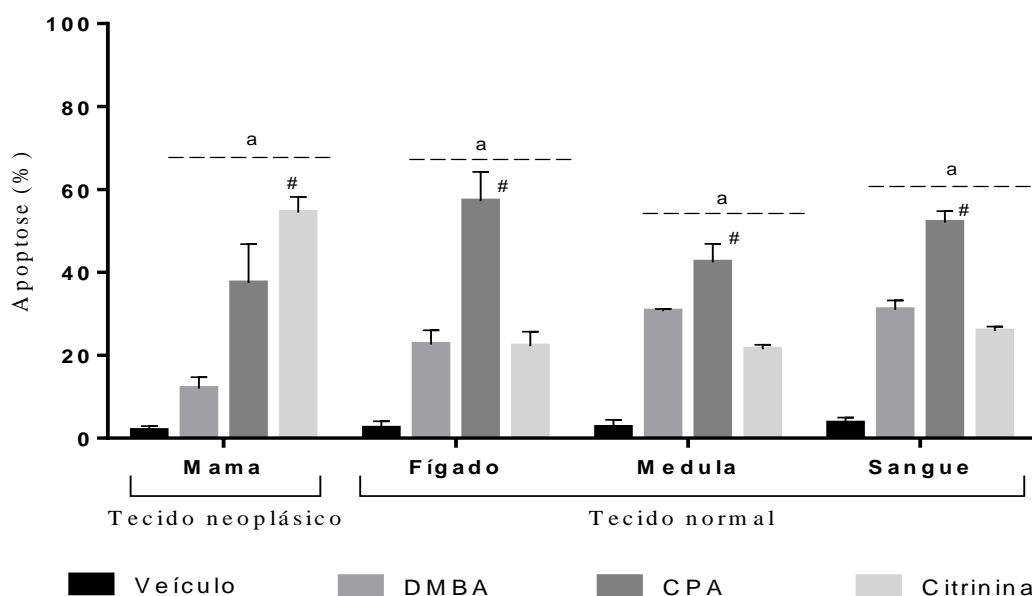


Figura 8. Apoptose em diferentes tecidos de camundongos fêmeas após 11 semanas de indução do câncer de mama com DMBA seguida de três semanas de terapia com o grupo citrinina (CIT) e com o grupo ciclofosfamida (CPA). Valores representam a média \pm desvio padrão (n=5). CIT (citrinina). DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno). CPA (ciclofosfamida). ANOVA (duas vias), pós-teste de Tukey. ^ap<0,05 comparado ao veículo e [#]p<0,0001 em comparação aos demais grupos.



3.3.2 Mutagenicidade da CIT em fígado e medula óssea de camundongos fêmeas com carcinoma mamário induzido pelo DMBA

Com aplicação do teste de micronúcleos, em células de medula óssea, foi possível observar que a CIT, ao contrário do observado para o DMBA, não induziu efeitos clastogênicos e aneugênicos. Não se observaram significâncias para apoptoses e células binucleadas, induzidas pela CIT, em medula óssea. Em células do fígado, também não se observaram efeitos mutagênicos, pelo aumento de micronúcleos, como também, pela formação de pontes. Entretanto, constataram-se efeitos apoptóticos da CIT e indução de células binucleadas em tecido hepático (**Tabela 5**).

Tabela 5. Mecanismos citogenéticos indicativos de mutagenicidade da citrinina – CIT (2µg/kg) em células não neoplásicas (medula óssea e células do fígado), após 11 semanas de indução do câncer de mama com DMBA-7,12-dimetilbenzantraceno (6 mg/kg) e 3 semanas de terapia com CIT.

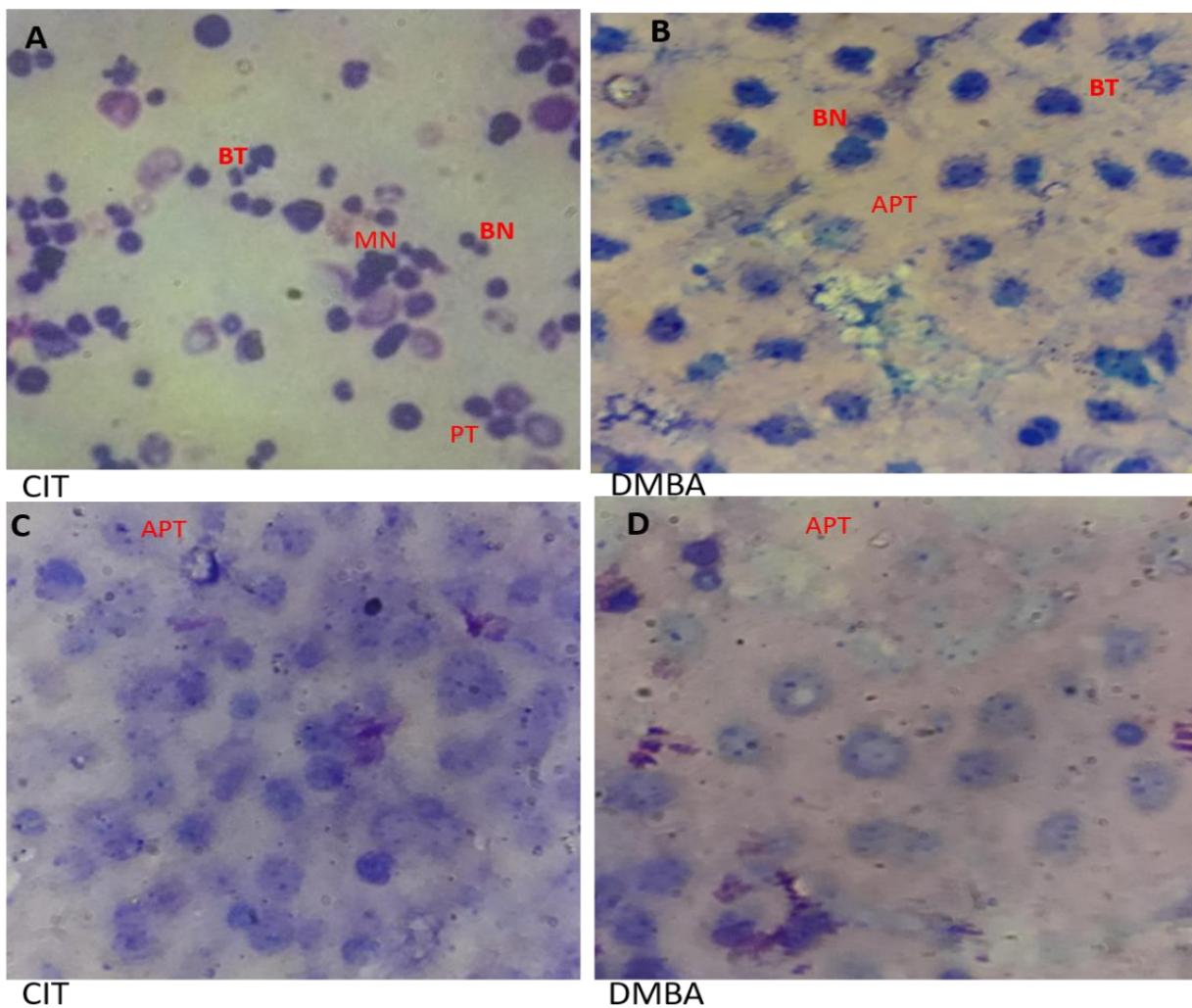
Grupos	Marcadores citogenético				
	Medula óssea				
	MN	PT	BT	APT	BN
Veículo	6,00 ± 1,30	8,80 ± 2,58	19,60 ± 11,99	11,80 ± 3,11	16,40 ± 5,03
DMBA	32,00 ± 4,63 ^a	27,00 ± 2,23 ^{a,b}	69,80 ± 11,99 ^{a,b}	35,40 ± 8,32 ^a	58,20 ± 14,02 ^a
Citrinina	10,00 ± 1,58	15,80 ± 3,14	20,00 ± 2,19	10,40 ± 16,29	23,00 ± 15,87
	Células do fígado				
	MN	PT	BT	APT	BN
	Veículo	5,50 ± 2,58	9,40 ± 2,40	8,60 ± 1,94	18,00 ± 7,24
DMBA	25,83 ± 5,70 ^{a,b}	26,20 ± 5,35 ^{a,b}	25,00 ± 2,91 ^{a,b}	407,40 ± 98,8 ^a	50,40 ± 5,81 ^a
Citrinina	9,16 ± 3,18	11,90 ± 2,96	15,20 ± 3,11	498,80 ± 94,71 ^a	65,20 ± 10,43 ^{a,c}

MN: micronúcleos, PT: pontes citoplasmáticas, BT: brotos, APT: apoptoses, BN: células binucleadas.

Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). ^a p<0,0001 comparado ao grupo azeite de oliva (Veículo- 10 mL/Kg), ^b p<0,0001 comparado a CIT e ^c p<0,0001 comparado ao DMBA (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

A CIT induziu algumas alterações citogenéticas compatíveis para mecanismos antitumorais, a exemplo de MN (micronúcleos), pontes (PT) e brotos (BT) em medula óssea, porém, estas não foram significantes em relação ao veículo (**Figura 9 A**). Registra-se, entretanto, que as apoptoses (APT) foram significantes em células do fígado (**Figura 9 C**). Em relação aos MN, PT, BT, BN, o indutor do câncer DMBA induziu significantes aumentos dessas alterações citogenéticas em medula óssea (**Figura 9 B**), bem como em células de fígado (**Figura 9 D**). Cabe também enfatizar que a CIT induziu mais citotoxicidade do que o DMBA em células de fígado.

Figura 9. Fotomicrografias (microscopia óptica, aumento de 400 X. Coloração com Giensa a 10%) de alterações citogenéticas induzidas pela CIT (2 µg/kg), em células não neoplásicas (medula óssea e células do fígado) após 11 semanas de indução do câncer de mama com DMBA- 7,12-dimetilbenzantraceno (6 mg/kg) e 3 semanas de terapia com CIT. Em A (CIT), B (DMBA), ambas em medula óssea. Em C (CIT) e em D (DMBA), ambas em células do fígado. MN (micronúcleos), BT (brotos), PT (pontes), APT (apoptoses), BN (células binucleadas).



4. DISCUSSÃO

O câncer de mama é um dos mais prevalente (ARRARAS et al., 2016), com mais de 1,7 milhões de casos diagnosticados mundialmente (ABDEL-ZAHE; ELDEIB, 2016), e responsável pela segunda causa de morte mundial entre as mulheres (MAJIDINIA; YOUSEFI, 2017). Os modelos animais apresentam relevância para a investigação sobre agentes quimioterápicos (KEMP, 2015; KARNAM et al., 2017). Neste estudo, avaliou-se a citrinina (CIT), isolada do extrato acetonitrila obtido do fungo *P. citrinum*, quanto a sua toxicogenética

e efeitos antitumorais em carcinoma mamário induzido pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA).

O DMBA, hidrocarboneto aromático policíclico, é um pró-carcinógeno que é rapidamente absorvido pelo trato intestinal, acumulando-se em tecido adiposo (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1981), requerendo ativação metabólica no fígado e na glândula mamária (TAMULSKI; MORREAL; DAO, 1973). Quando por ativação metabólica, pelo conjunto enzimático citocromo P450 (CYP1A1 e CYP1B1), libera o metabólito carcinógeno dihidrodiolepóxido capaz de induzir alterações hepáticas e mamárias, podendo ainda induzir proliferação celular (BASKARAN et al., 2010; WANG et al., 2011; ALVARADO et al., 2017; XUE et al., 2017; ALENCAR et al., 2018). A avaliação de parâmetros toxicológicos pode fornecer conhecimentos de importância para a caracterização de alterações fisiológicas, hematológicas, bioquímicas e comportamentais compatíveis com os efeitos tóxicos de substâncias químicas naturais e/ou sintéticas sob investigação em diferentes modelos, inclusive estudos de carcinogênese (ANVISA, 2013). Para verificar se o DMBA, a CPA e a CIT induziam alterações frente às atividades locomotoras (exploração e emocionalidade) aplicaram-se os testes de campo aberto e *Rota Rod* (PINTO; KO, 2011; SÁ et al., 2011).

No presente estudo, o DMBA (6 mg/Kg por semana) induziu toxicidade comportamental (pelo aumento de quedas e levantamentos) em cinco semanas, de um tratamento de 11 semanas para indução do carcinoma mamário, quando comparado ao veículo (azeite de oliva). A CIT e a ciclofosfamida (CPA) não induziram alterações comportamentais, indicando que o antineoplásico e a CIT não induziram toxicidade ao sistema locomotor e comportamental. A toxicidade pode ser avaliada mediante efeitos na coordenação motora e na emocionalidade (BIAGIONI et al., 2016). Estudos relatam uma série de alterações provocadas em cobaias pela administração de CIT (40 mg/kg/dia x 14 dias), como: perda de peso corporal, desidratação, anemia, necrose de fígado e rim (THACKER; CARLTON; SANSING, 1977) e lesões renais em camundongos (62 e 87 mg/kg) (JORDAN e CARLTON, 1977).

Todavia, como relatado, não se observaram alterações metabólicas e nem alterações no peso de órgãos, exceto para o DMBA que induziu aumento de mamas, reduzidas com as terapias com CPA e, em especialmente, com CIT. A toxicidade sistêmica de substâncias químicas também pode ser avaliada 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). Observaram-se efeitos de toxicidade para a CIT (2 µg/Kg) apenas pela redução de eosinófilos e de monócitos, possivelmente devido a infecções ou a reações de

sensibilidade. Entretanto, não se constataram alterações na série vermelha. Mas alterações hepáticas foram induzidas pela CIT, como observado pelo aumento da transaminase glutâmico-pirúvica. É pertinente ressaltar que existem relatos de que a CIT, em altas concentrações, induz efeitos tóxicos ao fígado, rim, coração e trato gastrointestinal (KREJCI; BRETZ; KOECHEL, 1996; FLAJS e PERAICA, 2009).

O DMBA induz alteração nos níveis de marcadores hepáticos e renais (OZDEMIR et al., 2007), porém, no estudo em foco, não se observaram alterações hematológicas e bioquímicas para o DMBA e para a CPA. Entretanto, no presente estudo, o DMBA (6 mg/Kg por semana), durante 11 semanas, induziu carcinoma mamário na mama direita de camundongos fêmeas virgens, como observado nas análises histopatológicas.

A glândula mamária tem por natureza a propriedade de acumular tecido gorduroso, determinando local específico para atuação do DMBA (ALVARADO et al., 2017; ALENCAR et al., 2018). Estudos em roedores tratados com DMBA (1 mg/animal ou 20 mg/animal – dose única), durante 6 a 13 semanas, demonstraram a formação de tumores mamários na maioria dos animais (75% a 100%) (BARROS et al., 2004; CURRIER et al., 2005). Em análises histopatológicas, o modelo de carcinogênese química com DMBA nas doses de 1 a 3 mg/Kg ou superior tem eficiência em roedores para o desenvolvimento do câncer de mama (MEDICA, 2004; OLIVEIRA et al., 2015).

O carcinoma mamário invasivo também se evidenciou pela marcação imunohistoquímica para a proteína Ki-67. O DMBA induziu em 400 células observadas 68,24 % de marcação para Ki-67, indicando proliferação celular, como também relatado por WANG et al. (2011). O marcador de proliferação celular Ki-67 associa-se expressivamente à proporção de crescimento das células dentro do ciclo celular, pois está expresso em todas as fases do ciclo (G₁, S, G₂ e M), como também com a agressividade da neoplasia mamária (NISHIMURA et al., 2014). O percentual imunohistoquímico para Ki-67, durante a terapia com CIT, reduziu-se para 14,64 %, como avaliado após terapia durante a 12^a, 13^a e 14^a semanas. Esse valor foi menos da metade do valor de marcação para Ki-67 (30,00 %) em terapia com CPA, indicando que a CIT não ampliou a proliferação celular observada após a 11^a semana de indução do câncer com DMBA.

O DMBA, na dose semanal de 6 mg/kg durante 11 semanas, também induziu instabilidade genética, pelos danos ao DNA em células da mama, bem como da medula, sangue periférico e fígado, com ineficiência de reparo. Também induziu mutagenicidade pela formação de micronúcleos, brotos, pontes e células binucleadas. Estudos apontam que o DMBA causa

indução de tumores mamários em animais devido a sua eficácia em proporcionar instabilidade genética (MEDINA, 2004; LIU et al., 2015). É pertinente enfatizar que a carcinogenicidade de muitos agentes quimioterápicos é parcialmente dependente de sua capacidade de induzir danos mutagênicos e clastogênicos ao DNA, incluindo adutos de DNA, erros de replicação, quebras e ligações cruzadas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008; RATTNER, J.; BATHE, 2017), como relatado para o seu metabólito carcinógeno dihidrodiolépoóxido, (BASKARAN et al., 2010; ALVARADO et al., 2017; XUE et al., 2017). Além disso, o DMBA também induz a formação de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA em células carentes do gene BRCA1, responsável por controlar o processo de checagem do ciclo mitótico (KANG et al., 2013).

A CPA e a CIT também induziram genotoxicidade em células mamárias, como também em medula óssea, fígado e sangue periférico. A CPA, agente alquilante que faz parte da família das mostardas nitrogenadas, é capaz de induzir vários tipos de danos ao DNA, dentre eles mutações genéticas e aberrações cromossômicas (VAGHEFAB et al., 1997; SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2008). A CIT induz genotoxicidade (BOUSLIMI et al., 2008; KNASMULLER et al., 2004; LIU et al., 2003), aberrações cromossômicas (BOUSLIMI et al., 2008; CHANG et al., 2011) e alterações no ciclo celular (KURODA et al., 2013). Entretanto, estresse oxidativo é uma das principais causas dos seus efeitos genotóxicos (JOHANNESSEN; NILSEN; LØVIK, 2007; KUMAR et al., 2014).

O policetídeo CIT possui grupo OH livre em seus carbonos (C8 e C12), que, quando associado à micotoxina ocratoxina, induz danos ao DNA via formação de radical •OH, gerando danos oxidativos (GAYATHRI et al., 2015). A CIT também aumenta a formação de EROs e estimula a produção de íons superóxidos na cadeia respiratória, promovendo morte celular por disfunção mitocondrial (OLIVEIRA FILHO et al., 2017) e por ativação da proteína MAPK (KAMATA et al., 2005).

Neste estudo, foram observados efeitos de reparo de DNA apenas frente aos danos induzidos pela CIT em linfócitos. Cabe também enfatizar que o conhecimento da capacidade de reparo de DNA e instabilidade genética são importantes na terapêutica oncológica, especialmente devido ao fato de que alguns agentes quimioterápicos e a radioterapia induzem alterações em cromossomos (BOUMWMAN; JONKERS, 2012; FERGUSON et al., 2015). A CIT, nesta pesquisa, não induziu micronúcleos, brotos e pontes em células não tumorais da medula e do fígado. Em outro estudo, não se observou, também, mutagenicidade da CIT em teste com *Salmonella/microsoma* (KNASMULLER et al., 2004). No entanto, existem relatos

sobre a indução de apoptose e formação de micronúcleos (CHAN, 2007; DÖNMEZ-ALTUNTAS et al., 2007; YU et al., 2006).

Os micronúcleos, corpos extranucleares, e os brotos podem ser relacionados para eliminação e amplificação ou reparo de DNA e as células binucleadas podem ser indicativas de falhas de citocineses no final da divisão celular (SABHARWAL et al., 2015). A formação de micronúcleos pode ser devido a quebras, indicando clastogenia, e por perda de cromossomos para agentes aneugênicos (FENECH et al., 2011. FERREIRA et al., 2009). A CIT induziu células binucleadas no fígado, que podem ser indicativas de falhas de citocineses no final de divisão celular, e células com cromatina condensada são indicativas de apoptoses (cariorrexe e cariólise), como também de picnoses (SABHARWAL et al., 2015).

A CIT induziu apoptoses e citotoxicidade em células tumorais e não tumorais, especialmente, em células do carcinoma mamário. Os danos observados no DNA, além de sua extensão, também podem ser associados à liberação de enzimas que atuam diretamente no processo de apoptose e necrose, a exemplo das proteínas pró-apoptóticas caspases -8, -9, -3 e Bcl2 (LIMA et al., 2014). A CPA, antineoplásico de uso frequente, induziu apoptose e, de modo similar, CIT. Contudo, CIT induziu percentual de apoptose reduzido em células de tecidos não neoplásicos (fígado, medula óssea, e leucócitos de sangue periférico), quando comparado com o grupo CPA. Em estudos com osteoblastos humanos, a CIT induziu apoptose, além de perda do potencial de membrana mitocondrial e atividade de caspase 3 (HUANG et al., 2009) ou via citocromo c (dependente de mitocôndria), que aumenta a atividade catalítica da caspase 3 (FLAJS; PERAICA, 2009; GAYATHRI et al., 2015).

É válido salientar que organismos marinhos têm fornecido importantes metabólitos secundários que agem como poderosos antitumorais, melhorando significativamente o combate de várias neoplasias (SCHWARTSMANN et al., 2001; GOMES et al., 2016), assim como os fungos endófitos, derivados de organismos marinhos, são potenciais fontes desses metabólitos biologicamente ativos (MANIMEGALAI; DEVI; PADMAVATHY, 2013). Como observado no estudo, em modelo animal para o câncer de mama, a CIT reduziu tamanho de mama com carcinoma mamário, não induziu proliferação celular, induziu citotoxicidade e apoptoses, por mecanismos genotóxicos, possivelmente, associados a estresse oxidativo. Essas características são compatíveis com efeitos antitumorais.

A citotoxicidade da CIT pode ser associada à sua indução de espécies reativas de oxigênio (BOUSLIMI et al., 2008; CHEN; CHAN, 2009), que pode levar a reações de transferência de elétrons, durante o metabolismo basal, características da EROs (ALENCAR et

al., 2016). Vários policetídeos produzem efeitos citotóxicos em células tumorais (LEI et al., 2017), a exemplo da CIT: em linhagens tumorais de câncer cervical (HeLa) (CHANG et al., 2009); carcinoma epidermoide oral humano (KB), com CE_{50} de 65,93 μ M; adenocarcinoma de próstata (LNCap), com CE_{50} de 77,92 μ M; adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), com CE_{50} de 71,93 μ M; carcinoma de pulmão humano (LU-1), com CE_{50} de 147,85 μ M (YAO et al., 2011) e carcinoma de fígado (HepG2), com CE_{50} de 110 μ M (GAYATHRI et al., 2015). Por outro aspecto, as substâncias com propriedades antagônicas como antioxidantes e citotóxicas, como relatado para a CIT, apresentam-se como boa opção para a terapia do câncer (LESGARDS et al. 2014).

Em nosso estudo o modelo de carcinoma mamário com DMBA mostrou ser eficaz, bem como a terapia com CIT, que reduziu o processo de proliferação neoplásica da mama sem induzir efeitos comportamentais, locomotores e sem induzir alterações nos pesos dos órgãos de tecidos não neoplásicos.

5. CONCLUSÃO

O modelo animal de indução de carcinoma mamário invasivo pelo DMBA, mediante análises histopatológicas e imunohistoquímicas para Ki-67, foi significativa para o estudo de efeitos antitumorais da citrinina (CIT- 2 μ g/kg durante 3 semanas) isolada do extrato acetoneitrila do *P. citrinum*. Durante o estudo, foi possível pontuar os seguintes aspectos:

- (1) Durante a indução do câncer, foi possível observar que o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA- 6 mg/kg durante 11 semanas) e a CPA (25 mg/kg durante 3 semanas) induziram alterações comportamentais pelo aumento do número de quedas e aumento de levantamentos comparados ao veículo (azeite de oliva).
- (2) Não se observaram alterações no peso dos órgãos (fígado, rim, coração, pulmão, baço) durante a indução do câncer e das terapias com ciclofosfamida (CPA) e CIT. Entretanto, o DMBA induziu aumento nas mamas, por proliferação celular, como observado pela marcação com Ki-67. Mas durante a terapia com CIT, não se observou aumento no peso das mamas, e houve menor marcação para o ki-67.
- (3) O DMBA e a CPA não induziram alterações hematológicas e bioquímicas, mas a CIT induziu alterações hepáticas (aumento da transaminase glutâmico pirúvica).
- (4) A CIT induziu significantes níveis de apoptoses, especialmente no tecido mamário e citotoxicidade no fígado.

- (5) O DMBA, CIT e CPA (ciclofosfamida) induziram danos genotóxicos em células da mama, como também em medula, fígado e sangue periférico, entretanto, observaram-se efeitos de reparo de DNA apenas na terapia com CIT, em linfócitos de sangue periférico.
- (6) Observaram-se mecanismos citogenéticos, tais como danos ao DNA, formação de micronúcleos, pontes, brotos, fragmentação nuclear (cariorrexe) e células binucleadas, durante a indução do carcinoma mamário em células não tumorais, como as da medula e do fígado.
- (7) Observaram-se atividades antitumorais para a CIT na dose testada, pela diminuição do peso e indução de apoptoses na mama e não indução de proliferação celular. Entretanto, observaram-se também efeitos apoptóticos em células do fígado por fragmentação nuclear (cariorrexe) e pelo aumento de células binucleadas indicativas de citotoxicidade. Todavia, a CIT não induziu efeitos clastogênicos e ou aneugênicos em células de medula e do fígado.
- (8) Os marcadores citogenéticos são importantes no monitoramento de indução do câncer com DMBA e em estudos e atividades antitumorais. A CIT é um produto natural de importância para formulações antitumorais.

REFERÊNCIAS

ABDEL-ZAHER, A. M.; ELDEIB, A. M. Breast cancer classification using deep belief networks. **Expert Systems with Applications**, v. 46, p. 139-144, 2016.

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.

ALENCAR, M. V. O. B.; ISLAM, M. T.; ROCHA, L. M. C.; QUEIROZ, J. L.; SILVA, M. B. S.; MATA, A. M. O. F.; CARVALHO, R. M.; GOMES JÚNIOR, A. L.; MORAES, G. P.; PAZ, M. F. C. J.; CERQUEIRA, G. S.; DANTAS, S. M. M. M.; SOUSA, I. J. O.; FERREIRA, P. M. P.; CAVALCANTE, A. A. C. M. Ascorbic acid modulates doxorubicin and cyclophosphamide-induced cytogenetic damages in Sarcoma 180 Cells. **International Archives of Medicine**, v. 9, n. 181, p. 1-10, 2016.

ALENCAR, M. V. O. B.; ISLAM, M. T.; LIMA, R. M. T.; PAZ, M. F. C. J.; REIS, A. C.; MATA, A. M. O. F.; OLIVEIRA FILHO, J. W. G.; CERQUEIRA, G. S.; FERREIRA, P. M. P.; SOUSA, J. M. C.; MUBARAK, M. S.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. **Phytol as an Anticarcinogenic and Mice with DMBA-Induced Breast Cancer**. *IUBMB Life*, v. 9999, n. 9999, p. 1-13, 2018.

ALVARADO, A.; FAUSTINO-ROCHA, A. I.; COLAÇO, B.; OLIVEIRA, P. A. Experimental mammary carcinogenesis – Rat models. **Life Sciences**, v. 173, p. 116-134, 2017.

ANDRADE, T. J. A. S. Investigação Química e Biológica dos Metabólitos Secundários Derivados de Macroalgas Marinhas e Microrganismos Associados. Tese de doutorado em Química, Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2014. p.358.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 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.

ARRARAS, J. I.; MANTEROLA, A.; ASIN, G.; ILLARRAMENDI, J. J.; CRUZ, S.; IBÁÑEZ, 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.

BABU, G. R. S.; IIAIYARAJA, N.; KHANUM, F.; ANAND T. Cytoprotective propensity of green tea polyphenols against citrinin-induced skeletal-myotube damage in C2C12 cells. **Cytotechnology**, doi: 10.1007/s10616-017-0077-4, 2017.

BARROS, A. C. S. D.; MURANAKA, E. N. K.; MORI, L. J.; PELIZON, C. H. T.; IRIYA, K.; GIOCONDO, G.; PINOTTI, J. A. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbez(a)anthracene. **Revista Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 59, n. 5, p. 257-261, 2004.

BASKARAN, N.; MANOHARAN, S.; BALAKRISHNAN, S.; PUGALENDHI, P. Chemopreventive potential of ferulic acid in 7,12-dimethylbenz[α]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 637, p. 22-29, 2010.

BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; NETO, A.G.F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Livraria Editora Ltda, 1976.

BIAGIONI, A. F.; ANJOS-GARCIA, T. D.; ULLAH, F.; FISHER, I. R.; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; FREITAS, R. L.; FELIPPOTTI, T. T.; COIMBRA, N. C. Neuroethological validation of an experimental apparatus to evaluate oriented and non-oriented escape behaviours: comparison between the polygonal arena with a burrow and the circular enclosure of an open-field test. **Behav Brain Res**, v. 298, p. 65-77, 2016.

BOUSLIMI, A.; OUANNES, Z.; GOLLI, E. E.; BOUAZIZ, C.; HASSEN, W.; BACHA, H. Citotoxicity and Oxidative Damage in Kidney Cells Exposed to the Mycotoxins Ochratoxin A and Citrinin: Individual and Combined Effects. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 18, p. 341-349, 2008.

BOUWMAN, P.; JONKERS, J. The effects of deregulated DNA damage signaling on cancer chemotherapy response and resistance. **Nature Review Cancer**, v. 12, n. 9, p. 587-598, 2012.

CHAN, W. H. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. **Biochemical Journal**, v. 404, 317-326, 2007.

CHANG, C. H.; YU, F. Y.; WANG, L. T.; LIN, Y. S.; LIU, B. H. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, n° 237, p. 281-287, 2009.

CHANG, C.H.; YU, F.Y.; WU, T.S.; WANG, L.T.; LIU, B.H. Mycotoxin Citrinin Induced Cell Cycle G2/M Arrest and Numerical Chromosomal Aberration Associated with Disruption of Microtubule Formation in Human Cells. **Toxicological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 84-92, 2011.

CHEN, C. C.; CHAN, W. H. Inhibition of Citrinin-Induced Apoptotic Biochemical Signaling in Human Hepatoma G2 Cells by Resveratrol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3338-3357, 2009.

CHO, K. H.; LEE, S.; KIM, D.; SHIN, D.; JOO, J. II; PARK, S. M. Cancer reversion, a renewed challenge in systems biology. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 2, p. 48-57, 2017.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. I.; FERNÁNDEZ, J. L.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GOSÁLBEZ, A.; GOSÁLBEZ, J. New application of the comet assay: Chromosome-Comet Assay. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 7, p. 655-660, 2011.

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

CUSTÓDIO-SANTOS, T.; VIDEIRA, M.; BRITO, M. A. Brain metastasization of breast cancer. **BBA Reviews on Cancer**, 1868, p. 132-147, 2017.

DeSANTIS, C. E.; BRAY, F.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; ANDERSON, B. O.; JEMAL, A. Internacional Variation in female breast cancer incidence and mortality rates. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Published Online, p. 1495-1506, 2015.

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.

DÖNMEZ-ALTUNTAS, H.; DUMLUPINAR, G.; IMAMOGLU, N.; HAMURCU, Z.; LIMAN, B. C. Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. **Journal Applied Toxicology**, v. 27, n. 4, 2007.

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.

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

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLES, 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.

FERGUSON, L.R. et al. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 5-24, 2015.

FERREIRA, F. L. S.; PRÁ, D.; MARTINO-ROTH, M. G.; GARCÍAS, G. L. Buccal micronucleus frequency in associated with age in Down syndrome. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1231-1237, 2009.

FLAJS, D.; PERAICA, M. Toxicological Properties of Citrinin. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, p. 457-464, 2009.

GAYATHRI, L.; DHIVYA, R.; DHANASEKARAN, D.; PERIASAMY, V. S.; ALSHATWI, A. A.; AKBARSHA, M. A. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: *In vitro* study in HepG2 cell. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 151-163, 2015.

GOMES, N. G. M.; DASARI, R.; CHANDRA, S.; KISS, R.; KORNIENKO, A. Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the "Supply Problem". **Marine Drugs**, v. 14, n. 98, p. 1-39, 2016.

GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, E.; GARCÍA, P. A.; AGUILAR, M. J.; PADILLA, C. A. ÁLVAREZ, J. Breastfeeding and the prevention of breast cancer: a retrospective review of clinical histories. **Journal of Clinical Nursing**, v. 23, p. 2397-2403, 2014.

GRUJIČIĆ, D.; RADOVIĆ, M.; ARSENIJEVIĆ, S.; MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ, O. Cytogenetic biomarkers in detection of genotoxic effects of gestagens in peripheral blood lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Medical Genetics**, v. 59, n. 12, p. 624-633, 2016.

GUBIANI, J.R.; ZERAIK, M. L.; OLIVEIRA, C. M.; XIMENES, V. F.; NOGUEIRA, C. R.; FONSECA, L. M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Biologically active Eremophilane-type sesquiterpenes from *Camarops* sp., an endophytic fungus isolated from *Alibertia macrophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 668-672, 2014.

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.

HUANG, Y.T.; LAI, C.Y.; LOU, S.L.; YEH, J.M.; CHAN, W.H. Activation of JNK and PAK2 Is Essential form Citrinin-Induced Apoptosis in a Human Osteoblast Cell Line. **Environmental Toxicology**, v. 24, p. 343-356, 2009.

IWAHASHI, H.; KITAGAWA, E.; SUZUKI, Y.; UEDA, Y.; ISHIZAWA, Y.; NOBUMASA, H.; KUBOKI, Y.; HOSODA, H.; IWAHASHI, Y. Evaluation of Toxicity of the Mycotoxin Citrinin Using Yeast ORF DNA Microarray and Oligo DNA Microarray. **BMC Genomics**, v. 8, n. 95, p. 1-13, 2007.

- JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-221, 2008.
- JOHANNESSEN, L. N.; NILSEN, A. M.; LØVIK, M. Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. **Toxicology Letters**, v. 168, p. 103-112, 2007.
- JORDAN, W. H.; CARLTON, W. W. Citrinin mycotoxicosis in the mouse. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 15, p. 29-34, 1977.
- KAMATA, H.; HONDA, S. I.; MAEDA, S.; CHANG, L.; HIRATA, H.; KARIN, M. Reaction oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 649-661, 2005.
- 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.
- KARNAM, K. C.; ELLUTLA, M.; BODDULURU, L. N.; KASALA, E. R.; UPPULAPU, S. K.; KALYANKUMARRAJU, M.; LAHKAR, M. Preventive effect of berberine against DMBA-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 207-214, 2017.
- KEMP, C. J. Animal models of chemical carcinogenesis: driving breakthroughs in cancer research for 100 years. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2015, n. 10, p. 865-874, 2015.
- KNASMULLER, S.; CAVIN, C.; CHAKRABORTY, A.; DARROUDI, F.; MAJER, B. J.; HUBER, W. W.; EHRLICH, V. A. Structurally Related Mycotoxins Ochratoxin A, Ochratoxin B, and Citrinin Differ in Their Genotoxic Activities and in Their Mode of Action in Human-Derived Liver (HepG2) Cells: Implications for Risk Assessment. **Nutrition and Cancer**, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2004.
- KREJCI, M. E.; BRETZ, N. S.; KOECHEL, D. A. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]plasma. **Toxicology**, v. 106, p. 167-177, 1996.
- KUMAR, M.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A.K.; SANKAR, M.; PATIL, R.D.; SINGH, N.D. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A- and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Toxicology Industrial Health**, v. 30, p. 90-98, 2014.
- KURODA, K.; ISHII, Y.; TAKASU, S.; KIJIMA, A.; MATSUSHITA, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, H.; KONISHI, Y.S.; SAKAI, H.; YANAI, T.; NOHMI, T.; OGAWA, K.; UMEMURA, T. Cell cycle progression, but not genotoxic activity, mainly contributes to citrinin-induced renal carcinogenesis. **Toxicology**, v. 311, p. 216-224, 2013.
- LEI, H.; LIN, X.; HAN, L.; MA, J.; DONG, K.; WANG, X.; ZHONG, J.; UM, Y.; LIU, Y.; HUANG, X. Polyketide derivatives from a marine-sponge-associated fungus *Pestalotiopsis heterocornis*. **Phytochemistry**, v. 142, p. 51-59, 2017.
- 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, S. W.; LIN, A. Y. C. Increased acute toxicity to fish caused by pharmaceuticals in hospital effluents in a pharmaceutical mixture and after solar irradiation. **Chemosphere**, v. 139, p. 190-196, 2015.
- LI, W.; GUO, L.; BI, X.; MA, J.; ZHENG, S. Immunohistochemistry of p53 and Ki-67 and p53 mutation analysis in renal epithelioid angiomyolipoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 8, p. 9446-9451, 2015.
- 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, B.H.; YU, F.Y.; WU, T.S.; LI, S.Y.; SU, M.C.; WANG, M.C.; SHIH, S.M. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, p. 255-263, 2003.
- 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. 708-729, 2015.
- LUKONG, K. E. Understanding breast cancer – The long and winding road. **BBA Clinical**, v. 7, p. 64-77, 2017.
- MACHADO, K.C.; OLIVEIRA, G. L. S.; 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. 273-279, 2015.
- MAGALHÃES, J. P. How ageing processes influence cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, p. 357-365, 2013.
- MAJIDINIA, M.; YOUSEFI, B. Breast tumor stroma: A driving force in the development of resistance to therapies. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 89, n. 3, p. 309-318, 2017.
- MANIMEGALAI, K.; DEVI, N. K. A.; PADMAVATHY, S. Marine fungi as a source of secondary metabolites of antibiotics. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research**, v. 4, n. 3, p. 275-282, 2013.
- MAZUMDER, P. M.; MAZUMDER, R.; MAZUMDER, A.; SASMAL, D. S. Antimicrobial Activity of the Mycotoxin Citrinin Obtained From the Fungus *Penicillium citrinum*. **Ancient Science of Life**, v. XXI, n. 3, p.191-197, 2002.
- MEDINA, D. Breast cancer: The protective effect of pregnancy. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 380-384, 2004.
- 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.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Drinking water & health**. Washington, DC: National Academy Press, 1981, v. 4, p. 257.

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: 13 mar. 2018.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 23-29, 2006.

OLIVEIRA FILHO, J. W. G.; ISLAM, M. T.; ALI, E. S.; UDDIN, S. J.; SANTOS, J. V. O.; ALENCAR, M. V. O. B.; GOMES JÚNIOR, A. L.; PAZ, M. F. C. J.; BRITO, M. R. M.; SOUSA, J. M. C.; SHAW, S.; MEDEIROS, M. G. F.; DANTAS, S. M. M. M.; ROLIM, H. M. L.; FERREIRA, P. M. P.; KAMAL, M. A.; PIECZYNSKA, M. D.; DAS, N.; GUPTA, V. K.; MOCAN, A.; ANDRADE, T. J. A. S.; SINGH, B. N.; MISHRA, S. K.; ATANASOV, A. G.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. A comprehensive review on biological properties of citrinin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p.130-141, 2017.

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.

OZDEMIR, I.; SELAMOGLU, Z.; ATES, B.; GOK, Y.; YILMAZ, I. Modulation of DMBA-induced biochemical changes by organoselenium compounds in blood of rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 44, p. 257-259, 2007.

PINTO, M. V.; MELLO, F. B.; ROBERTO, J.; MELLO, B. Avaliação toxicológica de preparação fitoterápica contendo Piper methysticum Forst Piperaceae (Kava ®) sobre o desenvolvimento pré-natal em ratos Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 818-824, 2007.

PINTO, W. V. R.; KO, G. M. Teste de rota rod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, p. 202-212, 2011.

RATTNER, J.; BATHE, O. F. Monitoring for response to antineoplastic drugs: The potential of a metabolomic approach. **Metabolites**, v. 7, n. 60, p. 1-16, 2017.

RESTIFO, N. P.; DUDLEY, M. E.; ROSENBERG, S. A. Adoptive immunotherapy for cancer harnessing the T cell response. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, p. 269-281, 2012.

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.

SÁ, C. G.; CARDOSO, K. M. F.; FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Efeito do tratamento agudo do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck na aquisição da memória espacial de

ratos avaliada no labirinto aquático de Morris. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p. 211-215, 2011.

SABHARWAL, R.; VERMA, P.; SYED, M. A.; SHARMA, T.; SUBUDHI, S. K.; MOHANTY, S.; GUPTA, S. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. **Indian Journal Medical Paediatric**, v. 36, n. 4, p. 212-218, 2015.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; 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.

SCHWARTSMANN, G.; ROCHA, A. B.; BERLINCK, R. G. S.; JIMENO, J. Marine organisms as a source of new anticancer agents. **The Lancet Oncology**, v. 2, p. 221-225, 2001.

SOUSA, J. M. C.; MATOS, L. A.; ALCÂNTARA, D. F. A.; RIBEIRO, H. F.; SANTOS, L. S.; OLIVEIRA, M. N.; BRITO-JUNIOR, L. C.; KHAYAT, A. S.; GUIMARÃES, A. C.; CUNHA, L. A.; BURBANO, R. R.; BAHIA, M. O. Cellular responses induced *in vitro* by pesthelic acid, a fungal metabolite, in a gastric adenocarcinoma cell line (PG100). **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4106-4115, 2013.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Molecular Toxicology Protocols**, p. 85-95, 2005.

STORNETTA, A.; ZIMMERMANN, M.; CIMINO, G. D.; HENDERSON, P. T.; STURLA, S. J. DNA Adducts from Anticancer Drugs as Candidate Predictive Markers for Precision Medicine. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 388-409, 2017.

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.

THACKER, H. L.; CARLTON, W. W.; SANSING, G. A. Citrinin mycotoxicosis in the guinea-pig. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 15, p. 553-561, 1977.

TRENDOWSKI, M. Recent advances in the development of antineoplastic agents derived from natural products. **Drugs**, v. 75, p. 1993-2016, 2015.

VAGHEFAB, H.; NYGRENC, P.; EDLINGA, C.; BERGHIC, J.; HELLMANAB, B. Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: A pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 395, n. 2-3, p. 127-138, 1997.

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.

VARGAS, A. J.; HARRIS, C. Biomarker development in the precision medicine era: lung cancer as a study. **Nature Reviews Cancer**, Advance online Publication, p. 1-13, 2016.

- 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.
- WAKANA, D.; HOSOE, T.; ITABASHI, T.; OKADA, K.; TAKAKI, G. M. C.; YAGUCHI, T.; FUKUSHINA, K.; KAWAI, K. New Citrinin derivatives isolated from *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 60, p.279–284, 2006.
- 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.
- XUE, M.; JI, X.; XUE, C.; LIANG, H.; GE, Y.; HE, X.; ZHANG, L.; BIAN, K.; ZHANG, L. Caspase-dependent and caspase-independent induction of apoptosis in breast cancer by fucoidan via the PI3K/AKT/GSK3 β pathway *in vivo* and *in vitro*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 898-908, 2017.
- 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.
- YAO, G.; SEBISUBI, F. M.; YUNG, L.; VOO, C.; HO, C. C.; TAN, G. T.; CHANG, L. C. Citrinin derivatives from the soil filamentous fungus *penicillium sp.* H9318. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1125-1129, 2011.
- YOON, H. Y.; KWAK, S. S.; JANG, M. H.; KANG, M. H.; SUNG, S. W.; KIM, C. H.; KIM, S. R.; YEOM, D. W.; KANG, M. J.; CHOI, Y. W. Docetaxel-loaded RIPL peptide (IPLVVPLRRRRRRRC)-conjugated liposomes: Drug release, cytotoxicity, and antitumor efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, p. 229-237, 2017.
- YU, F. Y.; LIAO, Y. C.; CHANG, C. H.; LIU, B. H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. **Toxicology Letters**, v. 161, p. 143-151, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

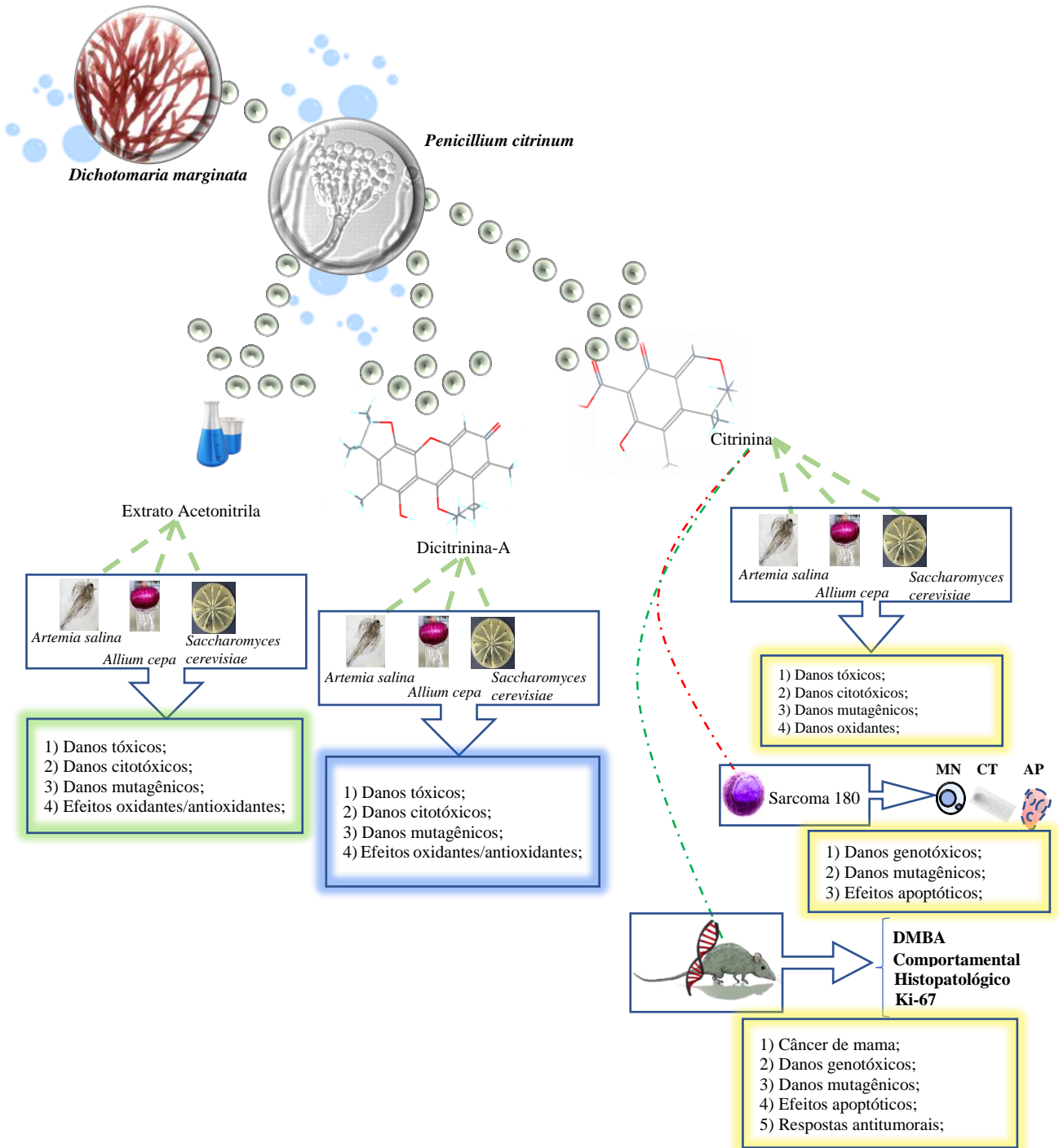
O estudo preliminar, envolvendo uma revisão sistemática sobre as principais atividades biológicas da citrinina, metabólito secundário extraído do fungo endófito *Penicillium citrinum*, apontou importantes atividades biológicas. Na pesquisa, conforme demonstrado na **Figura 1**, em sistema *Artemia salina*, o extrato de acetonitrila (EACNPc), citrinina e dicitrinina-A, nas concentrações testadas, apresentaram toxicidade. Já no sistema *Allium cepa*, as mesmas substâncias foram tóxicas, citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas. Em *Saccharomyces cerevisiae*, extrato e os isolados produziram respostas antioxidantes frente aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, apenas nas menores concentrações. Nas maiores concentrações, induziram respostas oxidantes em linhagens proficientes e mutadas para superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial, catalase e duplo mutante.

A avaliação toxicogenética e antitumoral da citrinina, em modelo de cultura primária em Sarcoma 180, revelou que citrinina, especialmente na maior concentração, induziu efeitos citogenéticos por mecanismos associados à formação de micronúcleos, pontes citoplasmáticas e brotos nucleares, bem como por indução de morte celular, especialmente por apoptose.

Em modelo de câncer de mama com uso do DMBA, em camundongos fêmeas virgens, foi possível identificar, durante 11 semanas de indução do câncer, alterações comportamentais pelo aumento do número de quedas (Rota rod) e aumento de levantamentos (campo aberto), quando comparados ao veículo (azeite). As 11 semanas de indução não provocaram alterações no peso dos órgãos (fígado, rim, coração, pulmão e baço), bem como ao observado na 12^a, 13^a e 14^a semanas com citrinina e ciclofosfamida. Em estudos patológicos, o câncer de mama foi confirmado, e no imuno-histoquímico, para a marcação de Ki-67, o DMBA induziu proliferação celular. Entretanto, durante a terapia com citritina, essa marcação foi diminuída. A citrinina induziu alterações em enzimas hepáticas e danos citogenéticos (danos ao DNA e alterações cromossômicas) indicativos de apoptoses, especialmente, no tecido mamário. Citrinina não induziu efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos em células da medula e fígado. Salienta-se, portanto, que a citrinina pode ser considerada importante para formulações farmacêuticas.

Diversos protocolos para indução de câncer de mama usando DMBA foram realizados, porém este trabalho se tornou auspicioso quando da análise da capacidade da citrinina como uma importante molécula antitumoral para o combate de neoplasia mamária. Desta forma, tendo em vista os mecanismos citogenéticos evidenciados neste estudo, é possível e importante sugerir que a citrinina possui potencial como agente antineoplásico.

Figura 1- Resumo do resultado geral da tese.



MN: micronúcleos; CT: Cometa; AP: Apoptose; DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno.



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox



A comprehensive review on biological properties of citrinin



José Williams Gomes de Oliveira Filho^a, Muhammad Torequul Islam^{b,c}, Eunos S. Ali^{d,e},
 Shaikh Jamal Uddin^f, Jose Victor de Oliveira Santos^b,
 Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar^{a,b}, Antonio Luiz Gomes Júnior^{a,b,v},
 Márcia Fernanda Correia Jardim Paz^{a,b}, Maria dos Remédios Mendes de Brito^b,
 João Marcelo de Castro e Sousa^g, Subrata Shaw^h, Maria das Graças Freire de Medeiros^g,
 Sandra Maria Mendes de Moura Dantasⁱ, Hercília Maria Lins Rolim^c,
 Paulo Michel Pinheiro Ferreira^u, Mohammad Amjad Kamal^{j,k,l}, Magdalena D. Pieczynska^m,
 Niranjana Das^q, Vijai K. Gupta^s, Andrei Mocanⁿ, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade^o,
 Brahma Nand Singh^t, Siddhartha K. Mishra^{p,r,*}, Atanas G. Atanasov^{m,q,s,*},
 Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^r

^a Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Piauí - IFPI, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

^b Laboratory of Genetics and Toxicology-LAPGENIC, Post-Graduate Program in Pharmaceutical Science, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

^c Laboratory of Pharmaceutical Nanosystems – NANOSFAR, Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

^d Gaco Pharmaceuticals and Research Laboratory, Dhaka 1000, Bangladesh

^e School of Medicine, Flinders University, GPO Box 2100, Adelaide 5001, South Australia, Australia

^f Pharmacy Discipline, Life Science School, Khulna University, Khulna 9208, Bangladesh

^g Department of Biological Sciences, Federal University of Piauí, Picos, PI 64.600-000, Brazil

^h Broad Institute of MIT and Harvard, 415 Main Street, Cambridge, MA, 02142, USA

ⁱ Laboratory of Cytogenetics and Mutagenesis, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64.049-550, Brazil

^j King Fahd Medical Research Center, King Abdulaziz University, Saudi Arabia

^k Enzymoics, 7 Peterlee Place, Hebersham, NSW 2770, USA

^l Novel Global Community Educational Foundation, Australia

^m Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec, Poland

ⁿ Department of Pharmaceutical Botany, Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, 400012 Cluj-Napoca, Romania

^o NIAC-Nucleus of Research Applied to Sciences-IFMA-Federal Institute of Education, Science and Technology of Maranhão (Campus São Raimundo das Mangabeiras), Brazil

^p Cancer Biology Laboratory, School of Biological Sciences (Zoology), Dr. Harisingh Gour Central University, Sagar 470003, M.P., India

^q Department of Pharmacognosy, Faculty of Life Sciences, University of Vienna, Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria

^r Department of Chemistry, Netaji Subhas Mahavidyalaya, Udaipur 799114, Gomati Tripura, India

^s Department of Chemistry and Biotechnology, ERA Chair of Green Chemistry, School of Science, Tallinn University of Technology, 12618 Tallinn, Estonia

^t Herbal Nanobiotechnology Lab, Pharmacognosy and Ethnopharmacology Division, CSIR-National Botanical Research Institute, Lucknow 226001, India

^u Department of Biophysics and Physiology, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brazil

^v Biomedicine Course, UNINOVAFAP University Center, Teresina, Piauí, 64.073-505, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Mycotoxins
 Citrinin
 Toxicity
 Genotoxicity
 Anticancer
 Antimicrobial

ABSTRACT

Citrinin (CIT) is a mycotoxin which causes contamination in the food and is associated with different toxic effects. A web search on CIT has been conducted covering the timespan since 1946. The accumulated data indicate that CIT is produced by several fungal strains belonging to *Penicillium*, *Aspergillus* and *Monascus* genera, and is usually found together with another nephrotoxic mycotoxin, ochratoxin A. Although, it is evident that CIT exposure can exert toxic effects on the heart, liver, kidney, as well as reproductive system, the mechanism of CIT-induced toxicity remains largely elusive. It is still controversial what are the genotoxic and mutagenic effects of CIT. Until now, its toxic effect has been linked to the CIT-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunction in biological systems. However, the toxicity strongly depends on its concentration, route, frequency and time of exposure, as well as from the used test systems. Besides the toxic effects, CIT is also

* Corresponding author. Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec, Poland.

** Corresponding author. Cancer Biology Laboratory, School of Biological Sciences (Zoology), Dr. Harisingh Gour Central University, Sagar 470003, M.P., India.

E-mail addresses: siddhartha.km@gmail.com (S.K. Mishra), atanas.atanasov@univie.ac.at (A.G. Atanasov).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.002>

Received 31 July 2017; Received in revised form 29 September 2017; Accepted 3 October 2017

Available online 07 October 2017

0278-6915/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO B – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO (CAP. 02)

23/08/2018

E-mail de INSTITUTO FEDERAL DO PIAUÍ - Resubmission Requested: New status for your co-authored submission to Mutation R...



José Williams Filho <williamsfilho@ifpi.edu.br>

Resubmission Requested: New status for your co-authored submission to Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

1 mensagem

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

16 de agosto de 2018

<Evisesupport@evises.com>

11:42

Responder a: Evisesupport@evises.com

Para: williamsfilho@ifpi.edu.br

Dear Mr de Oliveira Filho,

You have been listed as a co-author of the following submission:

Submission no: MUTGEN_2018_260

Submission title: Toxic / cytotoxic and cytogenetic evaluation of the acetonitrile extract, Citrinin and Dicitrinin-A from *Penicillium citrinum*

Corresponding author: Mr Md. Torequl Islam

Listed co-author(s): Miss Dulce Silva, Dr Ana Dias, Mr José Santos, Miss Ana da Mata, Professor Teresinha Andrade, Professor marcus alencar, Mr José de Oliveira Filho, Professor Felipe da Silva, Miss Ag-Anne de Meneses, Miss Antonielly dos Reis, Dr. João Marcelo Sousa, Mr Ricardo de Carvalho, Professor Ana Amélia Melo-Cavalcante, Miss Rosália de Lima

We are writing to let you know the status of this submission has changed to Resubmission Requested. The link below takes you to a webpage where you can log in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to view the submission status and see reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evises.com/profile/api/navigate/MUTGEN?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthorupdate13835718%23%2FMUTGEN%2Fsubmission%2FMUTGEN_2018_260&email=williamsfilho@ifpi.edu.br&firstName=Jos%C3%A9&sumame=de+Oliveira+Filho&country=Brazil&title=Mr

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Once again, thank you very much for your submission.

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

http://www.evises.com/co-author/#/MUTGEN/unsubscribe/williamsfilho@ifpi.edu.br/9qCzOA6w9PgYGB5F1rvu6QkAt6C0zhWKDNqUKvBOZ0bmZAP83T0zUMthW9Pu_nHk

ANEXO C – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO (CAP. 03).

IUBMB Life



Antitumoral effects of citrinin in an animal model of Sarcoma 180 via cytogenetic mechanisms

Journal:	<i>IUBMB Life</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Filho, José Andrade, Teresinha ; Universidade Federal do Piauí de Lima, Rosália dos Reis, Antonielly Santos, José de Menezes, Ag-Anne; Universidade Federal do Piauí de Alencar, Marcus Dias, Ana ; Universidade Federal do Piauí Silva, Dulce; Universidade Federal do Piauí Ferreira, José Ferreira, Paulo Rolim, Hercília Islam , Muhammad ; Universidade Federal do Piauí, Pharmaceutical Science e Sousa, João Melo-Cavalcante, Ana Amélia
Keywords:	Sarcoma 180, citrinin, cytogenetic, apoptosis

SCHOLARONE™
Manuscripts

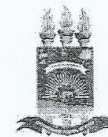
<http://mc.manuscriptcentral.com/tandf/tbmb>

**ANEXO D – 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: ceepi@ufpi.edu.br

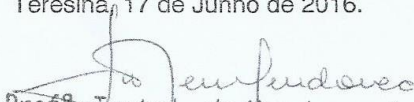


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “**Toxicogenética do Rizoma de Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e Gingerol 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 heterogênico/ <i>swiss</i>
Nº de Animais	60
Peso/ Idade	25-30g/ 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central no CCA/UFPI.

Teresina, 17 de Junho de 2016.


Prof. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO E – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO (CAP. 04).

13/09/2018

E-mail de INSTITUTO FEDERAL DO PIAUÍ - Manuscript submitted to Journal of Cellular Biochemistry - JCB-18-1856, Co-Author's...



INSTITUTO FEDERAL
Piauí

José Williams Filho <williamsfilho@ifpi.edu.br>

Manuscript submitted to Journal of Cellular Biochemistry - JCB-18-1856, Co-Author's Copy

Gary Stein <onbehalf@manuscriptcentral.com>

13 de setembro de 2018 04:01

Responder a: jcb@med.uvm.edu

Para: williamsfilho@ifpi.edu.br

13-Sep-2018

Manuscript number: JCB-18-1856

Dear Dr. Mr. de Oliveira Filho:

We are pleased to receive your manuscript entitled "Antitumor effects of citrinin isolated from *Penicillium citrinum* in animal model for breast cancer: toxicological and cytogenetic monitoring" by de Oliveira Filho, José Williams; Ibiapina Moreno, Lina Clara; Andrade, Teresinha de Jesus; de Lima, Rosália; Reis, Antonielly; Silva, Dulce Helena; Santos, José; Melo, Ag-Anne; da Mata, Ana Maria; Cavalcante Júnior, Salomão; da Silva, Angléssia Rafayanny; Islam, Muhammad; Alencar, Marcus; Lopes, Luciano; Ferreira, Paulo Michel; Sousa, João; Rolim, Hercília Maria; Melo-Cavalcante, Ana Amélia.

Please remember in any future correspondence regarding this article to always include its manuscript ID number JCB-18-1856.

If you experience problems associated with the submission web site, please contact the Wiley support staff directly at jcb@med.uvm.edu

Many thanks for submitting your manuscript,

Journal of Cellular Biochemistry Editorial Office

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>. In case you don't want to be contacted by this publication again, please send an email to jcb@med.uvm.edu.

ANEXO F – 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: ceepi@ufpi.edu.br

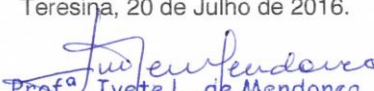


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação Toxicogenética de produtos naturais isolados de fungos associados de algas marinhas para formulações antitumorais**”, registrada nº **206/16**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE**– Núcleo de Tecnologia Farmacêutica/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de 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 **20/07/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Agosto/2016 à Agosto/ 2017
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo isogênico/swiss
Nº de Animais	78
Peso/ Idade	25-30g/ 2 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias-UFPI

Teresina, 20 de Julho de 2016.


Prof.^a Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
- Coordenadora