



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

ROSÁLIA MARIA TÔRRES DE LIMA

**TOXICOGENÉTICA DO [6]-GINGEROL FRENTE ÀS SUAS POSSÍVEIS AÇÕES
ANTITUMORAIS**

TERESINA – PI

2019

ROSÁLIA MARIA TÔRRES DE LIMA

TOXICOGENÉTICA DO [6]-GINGEROL FRENTE ÀS SUAS POSSÍVEIS AÇÕES
ANTITUMORAIS

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

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Amélia C. Melo Cavalcante

Área e Linha de Pesquisa

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

TERESINA – PI

Catálogo na Publicação (CIP)

Ficha catalográfica elaborada por: Isabel dos Santos Lima (Bibliotecária) - CRB-3/1060

L732t Lima, Rosália Maria Tôrres de
Toxicogenética do [6]- Gingerol frente às suas possíveis ações
antitumorais / Rosália Maria Tôrres de Lima. - Teresina, PI: Universidade
Federal do Piauí, 2019.

247 f.: il.; color.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Amélia C. Melo Cavalcante
Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO (Doutorado em
Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí.

1. [6]-Gingerol. 2. Câncer de mama. 3. Teste micronúcleo. 4. Apoptose. 5.
Necrose. I. Título.

CDD 616.994

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: ROSÁLIA MARIA TÔRRES DE LIMA

TÍTULO DO PROJETO: "Toxicogenética do [6]-Gingerol frente as suas possíveis ações 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>	<u>Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante</u>
Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>João Marcelo de Castro e Sousa</u>
Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>Felipe Cavalcanti</u>
Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior – UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u>JJ</u>
Profa. Dra. Antonia Maria das Gracas Lopes Citó - UFPI (Examinadora)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u>Antonia Maria das Gracas Lopes Citó</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 01 de abril de 2019.

HORÁRIO: 14:00h

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 – PONTO FOCAL – UFPI**

Prof^a. Dr^a. Carla Eiras

A *Deus*, que diante das minhas dificuldades, me manteve de pé, aos meus pais (*Maria da Conceição e Gerdeão*), que sempre cuidaram de mim, e me incentivaram a ser uma pessoa melhor, aos meus avós (*Dilma e Adamastor*), minha eterna gratidão pelos ensinamentos de amor e respeito ao próximo, a minha orientadora (*Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante*), pela confiança em mim depositada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos não é uma tarefa fácil, ou até mesmo justa diante das inúmeras pessoas que fizeram parte desta longa trajetória, para não correr o risco do esquecimento, começo agradecendo a todos, que de forma direta ou indireta colaboraram com a presente pesquisa, assim como, aquelas pessoas que contribuíram para minha construção pessoal.

De modo especial, agradeço a *Deus*, por me dar forças para seguir em frente, especialmente nos momentos difíceis, e pela presença constante em minha vida, a Ele agradeço, pela família e os bons amigos que tenho. À minha mãe *Maria da Conceição*, pela sua eterna bondade, apoio, cuidado e amor incondicional, que se fez capaz de prover o sustento da nossa família e garantir de forma digna e honesta, tudo o que foi necessário para minha formação. Ao meu pai *Gerdeão*, “*in memoriam*”, que no curto espaço de tempo presente em minha vida me ensinou que a felicidade se encontra nos pequenos momentos, gestos de cuidado e carinho. Aos meus avós, *Dilma Máximo* e *Adamastor Tôrres*, “*in memoriam*”, agradeço a Deus pela oportunidade de ter convivido, por sempre ser acolhida com muita alegria e amor, onde mesmo diante de muitas adversidades sempre tiveram fé e a esperança que as coisas iriam melhorar, e nunca desistiram de lutar por uma vida melhor. A minha avó *Soledade Oliveira*, pelo carinho e atenção que sempre teve comigo. A minha irmã, *Renata Carine*, sou grata pelo apoio, incentivo, ajuda e disponibilidade. À minha tia, *Rosa Cristina*, agradeço o cuidado, carinho e dedicação.

À Universidade Federal do Piauí, por meio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – **RENORBIO**, pela oportunidade de crescimento científico.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – Renorbio, pelos conhecimentos transmitidos.

A minha orientadora, *Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante*, pelo apoio, dedicação, conhecimento transmitido e acompanhamento durante todo o percurso do doutorado, por sempre estar disponível. Agradeço a oportunidade e confiança.

Aos meus amigos do **Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica – LAPGENIC**, *José Williams*, *Marcus Vinícius*, *José Victor*, *Leane Brunelle*, *Ag-Anne Menezes*, *Ana Maria Mata*, *Muhammad Toregul*, *Antônio Braga*, *Ricardo Carvalho*, *Márcia Fernanda*, *Débora Cássia*, *Keylla Machado*, *Kátia Machado*, em especial, *Antonielly Campinho*, pela eficiência, dedicação e compromisso. Muito obrigada por compartilhar horas de bancada, as quais, foram primordiais para a execução desta pesquisa.

Aos professores *Dr. José Roberto de Oliveira Ferreira, Dra. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Dr. João Marcelo de Castro e Sousa, Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira*, pelas colaborações fundamentais para esta pesquisa.

Aos professores que participaram da **banca de qualificação**, *Dr. João Marcelo de Castro e Sousa, Dr. Luciano da Silva Lopes, Dra. Chistiane Mendes Feitosa*, agradeço a disponibilidade para avaliação dos dados expostos na tese.

Aos profissionais do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, que colaboram com as atividades dos Programas de Pós-Graduação, **Sr. Francisco Sena, Sr. Ary, Sra. Ivelta**.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (**IFPI**) – **CAPES/IFPI**, pela liberação concedida, permitindo exclusividade a essa pesquisa. Aos professores do Eixo de Produção Alimentícia, *Marília Marques, Mariana Morais, Luanne Morais, Alessandro de Lima, Juliany Ramos, Paulo Ronaldo, Edna Chaves, Shirneth Bucar*. Muito obrigada!!!

Enfim, a todos àqueles que de forma direta ou indireta, se fizeram presentes, torceram e contribuíram para que esta pesquisa se tornasse realidade. A todos, minha sincera gratidão.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e inda mais alegre ainda no meio da tristeza! Só assim de repente, na horinha em que se quer, de propósito – por coragem. Será? Era o que eu às vezes achava”.

(João Guimarães Rosa - Grande Sertões: Veredas)

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5'NT: 5'-nucleotidase	ECH: Enoil-CoA hidratase
5FU: 5-fluorouracil	EG: Extrato de Gengibre
[6]-G: [6]-Gingerol	EPC: Células Progenitoras Endoteliais
ACC: Acetil-CoA carboxilase	ERK: Cinase regulada por sinal extracelular
AFB1: Aflatoxina B1	ERO: Espécie Reativa de Oxigênio
Akt/PKB: Proteína Kinase B	FASN: Ácido graxo sintase
ALP: Fosfatase Alcalina	FM: Frequência de Mutagenicidade
ALT: Alanina Aminotransferase	FoxOs: Proteína box Forkhead
AP: Fosfatase Ácida	G6Pase: Glicose-6-Fosfatase
AP-1: Fosfatase Ácida 1	GFP-LC3: Cadeia leve-proteica fluorescente verde 3
A-SAA: Amiloide Sérica A	GGT: Gama Glutamil Transferase
AST: Aspartato Aminotransferase	GR: Glutaciona Redutase
A β : β -amiloide	GSHPx: Glutaciona Peroxidase
BAX: Proteína X associada a Bcl2	GSH: Glutaciona
Bcl2: Célula-B de linfoma 2	GSK3 β : Glicogênio Sintase Quinase 3 beta
BHT: Hidroxitolueno Butilado	GSSG: Glutaciona Dissulfeto
BJ: Fibroblastos de Prepúcio	GST: Glutaciona S-Transferase
BMDC: Células Derivadas de Medula Óssea	GSTP1: Glutaciona S-Transferase P1
Caco2: Adenocarcinoma de cólon humano	HepG2: Linhagem de carcinoma hepatocelular
CAF: Fibroblasto Associado ao Câncer	HCT116: Linhagem de câncer colorretal
CaSiHa: Linhagem de carcinoma cervical	HIF-1 α : Fator Indutível de Hipoxia 1 - alfa
CAT: Catalase	HL-60: Leucemia Promielocítica Aguda Humana
Cdk: Quinase dependente de ciclina	HO-1: Heme oxigenase 1
c-FLIP: Proteína inibidora de FLICE	H ₂ O ₂ : Peróxido de Hidrogênio
CM: Câncer de Mama	HPLC: High Performance Liquid Chromatography
c-Myc: Proteínas proto-oncogênicas	HPV: Papilomavírus Humano
COX: Ciclo-oxigenase	hTERT: Transcriptase Reversa da Telomerase humana
COX-1/2: Ciclo-oxigenase 1/2	HuH7: Linhagem hepatócito humano
CRC: Câncer Colorretal	IEC6: Linhagem de células epiteliais intestinais 6
CRP: Proteína C-reativa	IF: Índice de Fases
CSC: Célula-Tronco Cancerígena	IFN- γ : Interferon-gama
CuSo: Sulfato de Cobre	IL-1: Interleucina-1
DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno	IL-1 β : Interleucina-1 beta
DMH: 1,2-dimetil-hidrazina	IL-6: Interleucina-6
DMSO: Dimetilsulfóxido	IL-8: Interleucina-8
DOX: Doxorrubicina	IM: Índice Mitótico
DR5: Receptor de morte	INCA: Inst. Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
DU145: Adenocarcinoma de próstata humano	iNOS: Óxido nítrico sintase

I/R: Dano de reperfusão isquêmica

I κ B α : Inibidor kappa B

JAK: Janus Quinase

JNK: c-Jun N-terminal Quinase

JURLMK1: Linhagem de leucemia mieloide crônica

K562: Linhagem de leucemia mieloide crônica

K₂Cr₂O₇: Dicromato de Potássio

LAMA84: Linhagem de leucemia mieloide crônica

LC-MS: Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

LDH: Lactato Desidrogenase

LLA: Leucemia Linfocítica Aguda

LLC: Leucemia Linfocítica Crônica

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LMC: Leucemia Mieloide Crônica

LNCap: Adenocarcinoma de próstata humano

LoVo: Câncer de cólon humano

LPS: Lipopolissacarídeo

LTA4H: Leucotrieno A4 Hidrolase

LTB 4: Leucotrieno B4 Biosíntese

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógenos

Mcl-1: Leucemia de célula mieloide-1

MDA: Malondialdeído

MDA-MB-231: Câncer de mama humano

MG-63: Células semelhantes a osteoblastos humanos

MLCK: Quinase de Cadeia Leve de Miosina

MMP-2: Metaloproteinase de Matriz 2

MMP-9: Metaloproteinase de Matriz 9

MN: Micronúcleo

mPGES: Prostaglandina E2 sintase-1 microssomal

MSC: Células-Tronco Mesenquimais

mTOR: alvo mecanicista da rapamicina

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio

NaCl: Cloreto de Sódio

Na₂CO₃: Bicarbonato de Sódio

Na₂SO₄: Sulfato de Sódio

NC: Necrose

NF- κ B: Fator nuclear kappa beta

NO: Óxido Nítrico

Nrf2: Nator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

ONOO⁻: Peroxinitrito

OXPHOS: fosforilação oxidativa

PanC: Linhagem de adenocarcinoma de pâncreas

PARP: enzima poli ADP ribose polimerase

p21^{Cip1}: Inibidor de ciclina dependente de kinase 1A

p27^{Kip1}: Inibidor de ciclina dependente de kinase 1B

p38: Proteína 38

p53: Proteína p53 (proteína do tumor)

PBMC: Célula Mononuclear do Sangue Periférico

PC3: Adenocarcinoma de próstata humano

PG: Prostaglandina

PGE: Prostaglandina E

PGE2: Prostaglandina E2

PI3-K: Fosfatidilinositol 3-quinase

PLC- γ 1: Fosfolipase C gama 1

PPAR γ : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ

PRPP: Fosforribosil pirofosfato

Ptx: Paclitaxel

S-180: Sarcoma 180

SAA1: Amiloide Sérica A

SAPK: Proteína quinase ativada por estresse

SDH: Succinato desidrogenase

SHSY5Y: Linhagem humana neuroblastoma

SiHa: Linhagem carcinoma cervical

SOD: Superóxido dismutase

STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição

STZ: Estreptozotocina

Sw480: Linhagem de carcinoma de cólon

TER: Resistência elétrica transepitelial

TJ: proteínas de junção apertada

TNF- α : Fator de necrose tumoral -alfa

TRAIL: Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral

U937: Linhagem leucemia mieloide crônica

UV: Ultravioleta

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

XIAP: Cromossomo X-ligado ao Inibidor de Apoptose

DE LIMA, R.M.T.L. **Toxicogenética do [6]-Gingerol frente as suas possíveis ações antitumorais**. Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante. 2019. 247p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

RESUMO

As substâncias encontradas no gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) apresentam ações antitumoral, antimutagênica, antioxidante e anti-inflamatória. O estudo avaliou os efeitos e mecanismos toxicogenéticos e antitumorais do [6]-Gingerol ((S)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-decanona) em ensaios não clínicos. A toxicidade e citotoxicidade foi avaliada em *Artemia salina*, *Allium cepa* e MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio). Efeitos antitumorais foram avaliados em linhagem humana para leucemia, murinos com Sarcoma 180 e carcinoma mamário, induzido pelo 7,12-dimetilbenzantraceno, com aplicação de marcadores citogenéticos. O [6]-Gingerol foi testado em 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O [6]-Gingerol apresentou toxicidade e citotoxicidade a partir de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em *Artemia salina* e *Allium cepa*, apresentando concentração inibitória no ensaio MTT de 1,14; 5,73 e de 11,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em linhagem leucêmica, Sarcoma 180 e em células mononucleadas de sangue periférico, respectivamente. Nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o [6]-Gingerol apresentou efeitos antitumorais em Sarcoma 180 pela redução de viabilidade celular e do índice de divisão celular, por mecanismos genotóxicos similares aos danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 . Efeitos antitumorais do [6]-Gingerol em 10 mg.Kg^{-1} , também foram observados em camundongos fêmeas com carcinoma mamário, evidenciado pelas análises histopatológicas e redução da marcação da proteína Ki-67. O tratamento com [6]-Gingerol não demonstrou alterações na avaliação comportamental dos animais, o perfil hematológico apontou conformidade na série vermelha, porém, aumento de eosinófilos, na série branca. Na avaliação bioquímica para enzimas hepáticas, foi observado aumento significativo de alanina aminotransferase, contudo, verificou-se ausência de alterações renais (ureia e creatinina). O [6]-Gingerol induziu baixa toxicidade, genotoxicidade e apoptose em células não tumorais (sangue periférico, medula óssea e fígado) quando comparado a ciclofosfamida (25 mg.kg^{-1}). Por outro lado, estes efeitos foram proeminentes em tecido neoplásico. Assim, o [6]-Gingerol teve efeitos antitumorais por mecanismos citogenéticos indicativos de citotoxicidade e genotoxicidade por danos oxidativos, mutagenicidade pela formação de brotos e pontes nucleoplásmicas, que culminaram para a indução de apoptoses. Os efeitos observados em estudos não clínicos podem contribuir para novas análises necessárias para o uso do [6]-Gingerol em formulações farmacêuticas antitumorais.

Palavras-chave: [6]-Gingerol, câncer de mama, ensaio cometa, teste micronúcleo, apoptose, necrose.

DE LIMA, R.M.T.L. **Toxicogenetics of [6]-Gingerol against its possible antitumor actions.** Advisor: Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante. 2019. 247p. Doctoral thesis. Postgraduate Program in Biotechnology. Northeast Network of Biotechnology – RENORBIO. Federal University of Piauí, Teresina.

ABSTRACT

Substances found in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) have showed anti-tumor, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory properties. This study evaluated the toxicogenetic and antitumoral effects of [6]-Gingerol ((S)-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone), as well as mechanisms related to these effects in non-clinical trials. Toxicity and cytotoxicity was evaluated in *Artemia salina*, *Allium cepa* and MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl bromide) assays, while toxicogenetic and antitumoral effects were evaluated in HL-60, Sarcoma-180 and 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary carcinoma in mice, with application of cytogenetic markers. [6]-Gingerol was tested at 5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The compound showed toxicity and cytotoxicity from 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in *Artemia salina* and *Allium cepa*, with an inhibitory concentration of 1,14; 5,73 and 11,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, in HL-60, Sarcoma-180 and in peripheral blood mononuclear cells, respectively, in MTT. At 10 and 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ we observed antitumoral effects in Sarcoma-180 by reduction of cell viability and cell division index, due to genotoxic mechanisms similar to oxidative damage induced by H_2O_2 . Anti-tumor effects of [6]-Gingerol in 10 mg.Kg^{-1} were also observed in female mice with mammary carcinoma, evidenced by histopathological analyzes and reduced labeling for Ki-67. The treatment with [6]-Gingerol did not show alterations in the behavior of the animals. Moreover, the hematological profile showed compliance in the red series, although it has been evidenced an increase in eosinophils in the white series. Also, an increase of alanine aminotransferase was observed after therapy with [6]-Gingerol. Interestingly, [6]-Gingerol induced low toxicity, genotoxicity and apoptosis in non-tumor cells (peripheral blood, bone marrow and liver cells) when compared to therapy with cyclophosphamide (25 mg.kg^{-1}). But these effects were prominent in breast carcinoma. Thus, [6]-Gingerol had anti-tumor effects by cytogenetic mechanisms indicative of cytotoxicity and genotoxicity by oxidative damage, mutagenicity by the formation of nucleoplasmic bridges and buds, which culminated in the induction of apoptosis. These effects observed in non-clinical studies may contribute to further analyzes necessary for the use of [6]-Gingerol in pharmaceutical formulations with emphasis on the oncological context.

Keywords: [6]-Gingerol, breast cancer, comet assay, micronucleus test, apoptosis, necrosis.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Efeito antioxidante do extrato de gengibre (EG) e componente fitoquímico biologicamente ativo [6]-Gingerol ([6]-G).....	107
Tabela 2 - Efeito anti-inflamatório do extrato de gengibre (EG) e componente fitoquímico biologicamente ativo [6]-Gingerol ([6]-G).....	116
Tabela 3 - Efeito antitumoral do extrato de gengibre (EG) e componente fitoquímico ativo [6]-Gingerol ([6]-G).....	122

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Perfil do índice (%) de fases (IF) e mitótico (IM) de células meristemáticas de raízes de <i>Allium cepa</i> (n=5) expostas ao [6]-G após o período de 24 - 48h.....	163
Tabela 2 - Aberrações cromossômicas (AC) em mitose e frequência de mutagenicidade (FM) em células meristemáticas em raízes de <i>Allium cepa</i> expostas a [6]-G, no período de 24-48 h.....	164

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Mecanismos citogenéticos do [6]-G avaliados células de S-180 após 72h de exposição indicativos de efeitos antitumorais, por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.....	194
---	-----

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Avaliação comportamental e atividade locomotora de camundongos fêmeas, durante 14 semanas de tratamento com azeite, 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e terapias químicas com ciclofosfamida (CPA) e [6]-G.....	218
Tabela 2 - Perfil metabólico durante terapia com [6]-G durante as semanas 12, 13 e 14 em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas e com o veículo (azeite de oliva).....	219
Tabela 3 - Perfil hematológico e bioquímico após terapia com [6]-G e CPA, em camundongos com câncer de mama induzido pelo DMBA.....	222

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	
Figura 1 - Esquema representativo da subdivisão da tese.....	25
REFERENCIAL TEÓRICO	
Figura 1 - Modelo clássico dos estágios da carcinogênese.....	35
Figura 2 - Representação ilustrativa de um microambiente tumoral.....	36
Figura 3 - Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas e ajustadas a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.....	39
Figura 4 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto, câncer de pele não melanoma.....	40
Figura 5 - Subtipos do câncer de mama com base na expressão de receptores hormonais.....	43
Figura 6 - Camundongo (<i>Mus musculus</i>) linhagem <i>Swiss</i> portador de S-180.....	47
Figura 7 - Gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe) (A); rizoma (B).....	56
Figura 8 - Estrutura química dos principais gingeróis presentes no rizoma de gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	58
Figura 9 - Reação de transformação do [6]-Gingerol por oxidação.....	59
Figura 10 - Classificação dos danos celulares após ensaio cometa.....	66
CAPÍTULO 1	
Figura 1 - Estrutura do [6]-Gingerol.....	101
Figura 2 - Mecanismos envolvendo ativação anormal de mediadores inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento do microambiente tumoral.....	115
CAPÍTULO 2	
Figura 1 - Cromatograma no modo analítico em gradiente liner em 254 nm e espectro de UV do padrão [6]-G (A), espectro de massas do [6]-G (B).....	158
Figura 2 - Efeitos tóxicos do [6]-G em <i>A. salina</i> . Os valores são médias \pm erro padrão (SEM) (n = 3, triplicata, 10 náupios vivos/tubo); p < 0,05 quando comparadas ao ^a CN, ^b K ₂ Cr ₂ O ₇ e concentrações ^c 5; ^d 10; ^e 20; ^f 40; ^g 60; ^h 80 e ⁱ 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do [6]-G no mesmo período de tempo. ANOVA seguido de Tukey (múltiplas comparações) <i>pós-teste</i> de sentido único. CN: controle negativo; K ₂ Cr ₂ O ₇ : dicromato de potássio (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); CL 50: concentração que indica 50 % de letalidade; IC: intervalo de confiança; R ² : coeficiente de determinação.....	159
Figura 3 - Viabilidade celular avaliada pelo ensaio MTT em células PBMC, S-180 e HL-60 após 72 h de exposição. Valores representam a média \pm erro padrão (SEM) de três experimentos independentes. p < 0,05 quando comparadas ao ^a CN, ^b Dox (PBMC: 0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; S-180/HL-60: 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e concentrações ^c 1,5625; ^d 3,125; ^e 6,25; ^f 12,5; ^g 25; ^h 50 e ⁱ 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do [6]-G. CN: células não tratadas. CL 50: concentração que indica 50% de inibição; IC: intervalo de confiança; R ² : coeficiente de determinação. ANOVA seguido de Tukey (múltiplas comparações) <i>pós-teste</i> de sentido único.....	160
Figura 4 - Número médio de raízes <i>A. cepa</i> L em 24 e 48 h. (B) Comprimento médio (mm) de raízes <i>A. cepa</i> L. em 24 e 48 h. Os valores são médias \pm erro padrão (SEM) (n = 5, cebola/concentração); p < 0,05 significativamente diferente entre as concentrações e controles no mesmo período de tempo, quando comparado ao ^a CN; ^b CP (CuSO ₄); ^c 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; ^d 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; ^e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; ^f 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com exposição de 24 h e 48 h. ANOVA seguido de one way, post test Tukey (múltiplas comparações).....	162
Figura 5 - Perfil fotomicrográfico de células meristemáticas de <i>A. cepa</i> . Fases da divisão celular: Intérfase (A), prófase (B), metáfase (C), anáfase (D), telófase (E). Anormalidades cromossômicas: ponte cromossômica em anáfase (F), fragmentos cromossômicos (G), atrasos cromossômicos (H), cromossomos soltos (I) e micronúcleo (J). Tratamento [6]-G: 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (J); 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (K); 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (L); 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (M). Aumento de 40X.....	165
CAPÍTULO 3	
Figura 1 - Cromatograma no modo analítico em gradiente liner em 254 nm e espectro de UV do padrão [6]-G (A), espectro de massas do [6]-G (B).....	188
Figura 2 - Citotoxicidade do [6]-G pela determinação da IC ₅₀ e viabilidade celular pelo ensaio de exclusão por azul de Tripán em S-180 após 72 h de exposição. Valores representam a média	

± erro padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: 2 µg.mL ⁻¹ . [6]-G (5; 10 e 20 µg.mL ⁻¹). ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao grupo CN, ^b p<0,05 comparado ao grupo Dox e ^c p<0,05 comparado ao grupo 5 µg.mL ⁻¹	189
Figura 3 - Genotoxicidade do [6]-G em cultura primária de S-180 após 72 h de exposição. A: Índice de Danos. B: Frequência de Danos. Valores representam a média ± erro padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: 2 µg.mL ⁻¹ . [6]-G (5; 10 e 20 µg.mL ⁻¹). ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao grupo CN, ^b p<0,05 comparado ao grupo Dox, ^c p<0,05 comparado ao grupo 5µg.mL ⁻¹ e ^d p<0,05 comparado ao grupo 10 µg.mL ⁻¹	190
Figura 4 - Perfil fotomicrográfico de genotoxicidade do [6]-G em cultura primária de S-180 no ensaio cometa. A: células sem tratamento. B: dox (2 µg.mL ⁻¹) C: [6]-G 5 µg.mL ⁻¹ . D: [6]-G 10 µg.mL ⁻¹ . E: [6]-G 20 µg.mL ⁻¹ . F: Dano 0. G: Dano 1. H: Dano 2. I: Dano 3. J: Dano 4. Coloração com prata. Aumento de 400X.....	191
Figura 5 - Genotoxicidade do [6]-G em cultura primária de S-180 e sangue periférico (SP) de camundongos sem alterações neoplásicas em cotratamento com peróxido de hidrogênio, por mecanismos associados ao estresse oxidativo. A: Índice de Danos. B: Frequência de Danos. Valores representam a média ± erro padrão de quatro experimentos independentes. S-180. SP: sangue periférico. CN: células não tratadas. H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) (10 mM). [6]-G (5; 10 e 20 µg.mL ⁻¹). ANOVA, Two-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao grupo CN, ^b p<0,05 comparado ao grupo DOX e [#] p<0,05 comparado ao grupo S-180 na mesma concentração, [*] p<0,05 comparado ao [6]-G sem H ₂ O ₂ na mesma concentração.....	192
Figura 6 - Perfil fotomicrográfico (microscopia óptica -aumento de 1000X) de células de S-180 tratada com [6]-G] (5, 10 e 20 µg.mL ⁻¹) no teste CBMN indicativos de efeitos antitumorais. Seta preta em A: brotos nucleares. Seta branca em A: ponte nucleoplásmica. Seta em B: ponte nucleoplásmica. Seta preta em C: necrose. Seta branca em C: apoptose. Seta em D: micronúcleo. Seta em E: apoptose. Seta em F: apoptose. Coloração com Giemsa 5%.....	194
Figura 7 - Efeitos antitumorais do [6]-G por apoptose e necrose em cultura primária de S-180 após 72h de exposição. Valores representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. S-180. CN: células não tratadas. Dox: 2 µg.mL ⁻¹ . [6]-G (5; 10 e 20 µg.mL ⁻¹). ANOVA, One-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado ao grupo CN, ^b p<0,05 comparado ao grupo Dox na mesma semana de tratamento.....	195
CAPÍTULO 4	
Figura 1 - Cromatograma no modo analítico em gradiente liner em 254 nm e espectro de UV do padrão [6]-G (A), espectro de massas do [6]-G (B).....	217
Figura 2 - Perfil do peso de órgãos de camundongos fêmeas, após 11 semanas de tratamento com DMBA e terapia com CPA e [6]-G (12 ^a , 13 ^a e 14 ^a semana). Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). [6]-G: [6]-Gingerol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. CPA: ciclofosfamida. ^a p<0,05 comparado ao azeite, ^b p<0,05 comparado ao grupo DMBA, ^c p<0,05 comparado ao grupo CPA (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey)	220
Figura 3 - Perfil macroscópico das mamas dos animais, após indução do câncer com DMBA e em terapia com CPA e [6]-G. CPA: ciclofosfamida. [6]-G: [6]-Gingerol. (A) Grupo veículo (azeite), (B) grupo com DMBA, (C) terapia com CPA, (D) terapia com [6]-G.....	221
Figura 4 - 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 [6]-G (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 e E: hiperplasia ductal atípica. F: citoplasma mais claro e heterogêneo. Coloração H&E (aumento de 200X)	223
Figura 5 - Avaliação do percentual de células do tecido mamário marcadas com Ki-67 em camundongos fêmeas, após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com CPA e [6]-G. Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). [6]-G; [6]-Gingerol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. CPA = ciclofosfamida. ANOVA (two way), pós-teste de Tukey. p<0,05 comparado ao Azeite ^a , DMBA ^b	224

Figura 6 - 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 [6]-G. A : controle veículo (azeite de oliva) – leve marcação (+ [7,16 ± 2,61]). B : DMBA – expressiva marcação (+++ [76,24 ± 4,64]). C : CPA – com marcação moderada (++ [21,25 ± 3,59]) e D : [6]-G – marcação moderada (++ [30 ± 2,49]), <i>Score</i> mensurado pela contagem individual de 400 células com núcleo acastanhado (aumento de 200 X).....	225
Figura 7 - Estudo da genotoxicidade do [6]-G 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 ⁻¹), seguidas de 3 semanas de terapia com o grupo [6]-G (10 mg.kg ⁻¹) e ciclofosfamida (CPA, 25 mg.kg ⁻¹). Valores representam a média ± desvio padrão (n=5). [6]-G: [6]-Gingerol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. ^a p<0,05 comparado ao grupo azeite, ^b p<0,05 comparado ao DMBA e ^c p<0,05 comparado ao CPA (ANOVA, one way, pós-teste de Tukey)	226
Figura 8 - 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 mg.kg ⁻¹) e terapia com [6]-G (10 mg.kg ⁻¹). A - índice de danos (0 - 400) e B - frequência de danos (0-100). Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). ANOVA, two way, pós-teste de Tukey. ^a p<0,05 comparado aos danos basais e ^Ω comparado ao dano basal da primeira coleta.....	227
Figura 9 - Avaliação do percentual de apoptose em diferentes tecidos de camundongos fêmeas, após 7 semanas de indução do câncer de mama com DMBA e terapia com [6]-G. Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5). [6]-G; [6]-Gingerol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. CPA = ciclofosfamida. ANOVA (duas vias), pós-teste de Tukey. p<0,05 comparado ao Azeite ^a , DMBA ^b e CPA ^c	228

SUMÁRIO

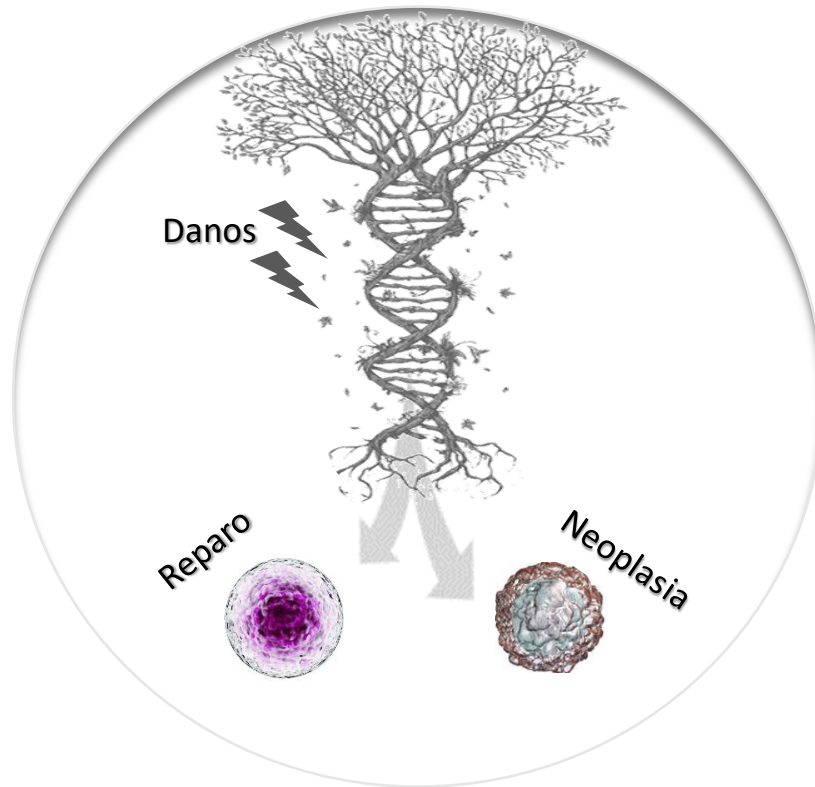
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	VIII
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
1 INTRODUÇÃO	21
REFERÊNCIAS	26
2 OBJETIVOS	33
2.1 Geral.....	32
2.2 Específicos.....	32
3 REFERENCIAL TEÓRICO	35
3.1 Câncer: aspectos gerais, etiologia, epidemiologia, fatores psicossociais	35
3.2 Câncer de mama	41
3.3 Sarcoma	45
3.4 Leucemias	47
3.5 Produtos naturais	49
3.5.1 Compostos fitoquímicos: conceito e papel na quimioprevenção do câncer.....	51
3.5.2 Compostos fenólicos: propriedade antioxidante e pró-oxidante.....	53
3.5.3 Ervas e especiarias.....	54
3.5.3.1 Gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	55
3.5.3.2 Principais bioativos do gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	57
3.5.3.3 Propriedades funcionais do [6] – Gingerol ([6]-G).....	59
3.6 Biomarcadores toxicogenéticos	62
3.6.1 Bioensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	62
3.6.2 Ensaio <i>Allium cepa</i>	63
3.6.3 Ensaio de viabilidade celular.....	64
3.6.4 Ensaio Cometa.....	65
3.6.5 Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese – CBMN.....	67
REFERÊNCIAS	69
4 CAPÍTULO 1 - Potencial protetor e terapêutico do extrato de gengibre (<i>Zingiber officinale</i>) e [6]-Gingerol no câncer: Uma revisão abrangente	99
Resumo	99
1 INTRODUÇÃO	100
2 MÉTODOS	102
2.1 Estratégia de busca	102
2.2 Seleção dos estudos para inclusão na revisão sistemática	103

2.3 Extração de dados.....	103
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
3.1 Papel das EROs no organismo e estresse oxidativo.....	104
3.2 Efeito antioxidante do [6]-Gingerol e EG.....	105
3.3 Inflamação e câncer.....	112
3.4 Mediadores do processo inflamatório no microambiente tumoral.....	113
3.5 Plantas medicinais.....	120
3.6 <i>Zingiber officinale</i> Roscoe e câncer.....	121
4 CONCLUSÃO.....	133
REFERÊNCIAS.....	134
5 CAPÍTULO 2 - Avaliação tóxica, citotóxica, citogenética e antitumoral do [6]-Gingerol em estudos não clínicos	152
Resumo.....	152
1 INTRODUÇÃO.....	153
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	154
2.1 Reagentes e produtos químicos.....	154
2.2 Análise cromatográfica do padrão sigma [6]-G.....	155
2.3 Preparação da amostra teste.....	155
2.4 Teste de letalidade em <i>A. salina</i>	155
2.5 Bioensaio em <i>Allium cepa</i>	156
2.6 Viabilidade celular em MTT.....	157
2.7 Análise estatística.....	157
3 RESULTADOS.....	158
3.1 Confirmação do padrão [6]-G HPLC–UV e HPLC–ES-MS.....	158
3.2 Efeitos tóxicos do [6]-G em <i>A. salina</i>	158
3.3 Efeito do [6]-G na viabilidade celular em PBMC, cultura primária de S-180 e linhagem HL-60.....	159
3.4 Efeitos tóxicos do [6]-G e controles em <i>A. cepa</i>	161
3.5 Efeitos citotóxicos do [6]-G em <i>A. cepa</i>	157
3.6 Mutagenicidade do [6]-G em <i>A. cepa</i> pela frequência de aberrações cromossômicas (AC) em mitose.....	163
4 DISCUSSÃO.....	165
5 CONCLUSÃO.....	171
REFERÊNCIAS.....	172
6 CAPÍTULO 3 - Efeitos antitumorais por mecanismos citogenéticos do [6]-Gingerol em modelo animal de Sarcoma 180.....	181
Resumo.....	181

1 INTRODUÇÃO	182
2 MATERIAIS E MÉTODOS	184
2.1 Reagentes e produtos químicos	184
2.2 Análise cromatográfica do padrão sigma [6]-G	184
2.3 Preparação da amostra teste	185
2.4 Cultura primária de Sarcoma 180	185
2.5 Viabilidade celular por azul de Tripán em cultura primária de S-180	185
2.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)	186
2.7 Ensaio cometa	186
2.8 Estudo de mecanismo para genotoxicidade pelo cotratamento com H₂O₂ (ensaio desafio)	187
2.9 Análise estatística	187
3 RESULTADOS	188
3.1 Análise cromatográfica do padrão sigma [6]-G	188
3.2 Avaliação da citotoxicidade do [6]-G pelo ensaio de exclusão de azul de Tripán	189
3.3 Efeitos genotóxicos do [6]-G em cultura primária de S-180 através do ensaio cometa	189
3.4 Avaliação de um dos possíveis mecanismos genotóxicos do [6]-G em cultura primária de S-180 e sangue periférico de camundongos	191
3.5 Efeitos antitumorais do [6]-G em cultura primária de S-180 avaliado pelo teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese	193
4 DISCUSSÃO	195
5 CONCLUSÃO	200
REFERÊNCIAS	201
7 CAPÍTULO 4 - Efeitos antitumorais do [6]-Gingerol em carcinoma mamário induzido com 7,12-dimetilbenzantraceno, em camundongos fêmeas	209
Resumo	209
1 INTRODUÇÃO	210
2 MATERIAIS E MÉTODOS	211
2.1 Produtos químicos e preparação das amostras	211
2.2 Análise cromatográfica do padrão sigma [6]-G	212
2.3 Animais	212
2.4 Indução química do câncer de mama <i>in vivo</i> com o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA)	213
2.5 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica para Ki-67	213
2.6 Monitoramento toxicológico durante a indução do carcinoma mamário e tratamento com [6]-G	214
2.6.1 Análise metabólica e hipocrática	214

2.6.2 Campo aberto.....	214
2.6.3 Rota rod.....	215
2.6.4 Eutanásia e coleta dos órgãos.....	215
2.6.5 Análise hematológica e bioquímica.....	215
2.7 Avaliação citogenética em modelo <i>in vivo</i> de carcinoma mamário induzido quimicamente por DMBA e tratamento com [6]-G.....	216
2.7.1 Ensaio cometa em diferentes tecidos (sangue periférico caudal, fígado, medula óssea e mama direita)	216
2.8 Análise estatística.....	216
3 RESULTADOS.....	217
3.1 Avaliação da confirmação do [6]-G por HPLC–UV e HPLC–ES-MS.....	217
3.2 Monitoramento comportamental (atividade motora), metabólico e peso de órgãos.....	218
3.3 Perfil macroscópico, histopatológico e imuno-histoquímico (Ki-67) em tecido mamário de tratadas com DMBA e terapia com [6]-G.....	220
3.4 Perfil hematológico e bioquímico após indução do câncer de mama e terapia com [6]-G e ciclofosfamida.....	222
3.5 Mecanismos citogenéticos induzidos pelo DMBA, CPA e [6]-G.....	225
3.5.1 Genotoxicidade em células não tumorais e tumorais após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com [6]-G.....	225
3.5.2 Avaliação da capacidade de reparo de danos ao DNA em células nucleadas de sangue periférico durante e após o tratamento com DMBA e terapia com [6]-G.....	227
3.6 Avaliação da apoptose após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com [6]-G e CPA.....	228
4 DISCUSSÃO.....	228
5 CONCLUSÃO.....	232
REFERÊNCIAS.....	234
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	241
ANEXO A – COMPROVAÇÃO DA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO.....	242
ANEXO B – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	243
ANEXO C – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	244
ANEXO D – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	245
ANEXO E – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – UFPI.....	246

Introdução



1 INTRODUÇÃO

O câncer não é uma condição estritamente definida como uma causa única, mas um grupo que compreende mais de 100 doenças diferentes com características compartilhadas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015), é uma das principais causas de morbimortalidade em humanos, sendo a segunda causa mais proeminente de mortes no mundo (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017), após as doenças cardiovasculares (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). A morbidade do câncer aumenta em escala global, indicando que as terapias convencionais (cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, imunoterapia) precisam ser suplementadas por agentes anticancerígenos com eficácia aprimorada e menos toxicidade adversa (FADEYI et al., 2013).

O carcinoma mamário é o tipo de câncer mais diagnosticado em mulheres no mundo (LUKONG; OGUNBOLUDE; KAMDEM, 2017), destaca-se por ser o tipo mais incidente e a principal causa de mortalidade por câncer no Brasil para o sexo feminino (INCA, 2017), sendo o tipo mais identificado em mulheres americanas, afetando uma entre oito mulheres (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013), cerca de 90% das mortes por câncer de mama no mundo são devido à metástase (MILLER et al., 2016), outras complicações ainda podem ser observadas no perfil do câncer de mama triplo negativo, o qual apresenta resistência ao tratamento hormonal (REDDY, 2011), cabe enfatizar que não se limita apenas às mulheres, mas também tem efeitos promissores sobre os homens e transgêneros (BROWN, 2015; GRUNDY et al., 2016). No Brasil, o carcinoma mamário é o primeiro tipo mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil) (INCA, 2017).

O emprego de uma extensa variedade de compostos naturais tem sido reportado na terapia do câncer (SHUKLA; MEHTA, 2015), onde constituintes bioativos (fitoquímicos) presentes no metabolismo secundário de plantas promovem papel significativo no processo antitumoral (ZHENG et al., 2016; OCHWANG'I et al., 2018). Os efeitos anticancerígenos mais documentados durante a aplicação terapêutica de fitoquímicos incluem apoptose e parada do ciclo celular, apontando que as proteínas são os alvos mais atingidos por essas substâncias, dificultando a progressão da célula cancerígena (AKL et al., 2015). Vários genes se coordenam para o crescimento e diferenciação de uma célula normal, no entanto, durante o processo tumoral, um ou mais desses genes se alteram e se expressam aberrantemente (BISWAS et al., 2015).

Nesse contexto, os fitoquímicos podem fornecer recursos atraentes (FADEYI et al., 2013) na abordagem preventiva do câncer de mama (ZHENG et al., 2016), os efeitos pró-oxidantes de alguns fitoagentes apresentam citotoxicidade seletiva para células tumorais e lançam novas perspectivas sobre a estratégia de terapia do câncer (LEE et al., 2013). As moléculas bioativas de plantas medicinais apresentam diversidade estrutural e são promissoras como agentes quimioterápicos devido à sua seletividade para com as células tumorais, menor toxicidade em relação aos fármacos tradicionais e custo reduzido (TORQUATO et al., 2017).

Os fitoquímicos (alcaloides, flavonoides, fenóis, taninos, glicosídeos) advindos das partes de plantas (raiz, folha, flor, caule, casca, fruto) são mais bem tolerados por células normais e realizam diversas funções farmacológicas (SINGH; JARIAL; KANWAR, 2013), embora o mecanismo exato pelo qual os fitoquímicos desempenham funções anticancerígenas ainda seja um amplo tema de pesquisa (SINGH et al., 2016). A quimioprevenção dos fitoquímicos em geral tem sido amplamente estudada em cânceres mais comuns, incluindo pulmão, cólon, próstata e mama (HUSSAIN; KUMARA; GHOSH, 2016), entretanto, tumores raros e heterogêneos de origem mesenquimal, tais como os sarcomas, progredem em relação à compreensão dos mecanismos do câncer (POTTER; JONES; BARROTT, 2018).

Os sarcomas de partes moles correspondem de 4% a 8% de todos os cânceres na infância (de 0 a 14 anos), com uma taxa de incidência mundial em torno de 11 casos por milhão, informações européias sugerem um aumento anual significativo de 1,8% (FERLAY et al., 2013; REES et al., 2016; WORCH et al., 2011). As taxas de incidência de osteossarcoma variam entre 2 a 4 casos por milhão na faixa etária de 0 a 14 anos e de 4,3 na faixa etária de 0 a 19 anos no mundo. No Brasil, há uma discreta predominância no sexo masculino, sendo o pico de maior incidência dos 15 aos 19 anos (FERLAY et al., 2013; HOWLADER et al., 2014).

Dentre os tipos de câncer infantojuvenil, destaca-se também a leucemia, sendo o tipo mais comum na maioria dos países no mundo (cerca de 25% a 35%). No Brasil, verifica-se uma maior frequência de leucemias nos grupos etários de 0 a 14 anos: 33% e 0 a 19 anos: 26%, também se observa um sutil predomínio do sexo masculino (INCA, 2016), o risco estimado corresponde a 5.75 e 4.56 casos novos a cada 100 mil homens/mulheres, ocupando a nona e a décima posições, respectivamente (INCA, 2017).

Alguns dos medicamentos mais eficazes utilizados contra o câncer foram derivados de produtos naturais (EFFERTH et al., 2017), dentre os fitoquímicos, os polifenóis são a classe mais conhecida e amplamente estudada de compostos naturais encontrados em plantas, possuem anel (s) aromático (s) contendo um ou mais grupos de hidroxila (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006; QUIDEAU et al., 2011). Esta característica estrutural comum aos

polifenóis é a base da sua atividade antioxidante (PISOSCHI; CIMPEANU; PREDOI, 2015), entretanto, sob certas condições, como altas concentrações e presença de íons metálicos, os polifenóis têm se mostrado pró-oxidantes ao promover um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células cancerígenas que desencadeiam a fragmentação apoptótica do DNA (OIKAWA et al., 1998). Os componentes fenólicos encontrados no rizoma do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoi), em particular, [6]-Gingerol ((S)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-decanona) e [6]-Shogaol ((E)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-decen-3-ona) atingem várias moléculas celulares que contribuem para o processo de tumorigênese, sobrevivência celular, proliferação, invasão e angiogênese (SAHDEO; AMIT, 2015).

Estudos indicam que a substância majoritária do gengibre, [6]-Gingerol ([6]-G), apresenta ação modulatória nas vias de sinalização e mediadores envolvidos em diferentes tipos de carcinomas e linhagens tumorais, tais como, NF- κ B, TNF α , Bax, AKT, (CHAKRABORTY et al., 2012); ERK (KIM; KIM, 2013; RADHAKRISHNAN et al., 2014), PARP (ELKADY et al., 2012), Bcl2, XIAP (LEE et al., 2014), Cdk1, Cdc25B, Cdc25C (RASTOGI et al., 2014), p 53 (RASTOGI et al., 2015) e PI3K, MAPK, mTOR (ZHANG et al., 2017).

Substâncias isoladas de origem alimentar, a exemplo do [6]-G, devem ser submetidas à avaliação do potencial toxicogenético e efeitos adversos (LI et al., 2017), onde, vários testes *in vitro* e *in vivo* são combinados para avaliar a atividade mutagênica / genotóxica (ROTHFUSS et al., 2011) em tecido normais e tumorais afim de verificar possíveis alterações citogenéticas (UNO et al., 2015), como também, analisar rupturas na cadeia de DNA (CORCUERA et al., 2015) e danos oxidativos (DAVISON, 2016). Da mesma forma, o estudo da citotoxicidade se destaca como um método de rastreio com alto rendimento, estratégico na avaliação de linhagens tumorais (tais como, células primárias de Sarcoma 180; linhagem HL-60 - leucemia promielocítica aguda) e não tumorais (PBMC - células mononucleadas de sangue periférico) expostas a agentes anticancerígenos, possibilitando o estudo de numerosos compostos em curto período de tempo (SINGH et al., 2016).

Para o estudo do carcinoma mamário, um dos modelos mais utilizados, se baseia no uso do 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), um hidrocarboneto aromático policíclico utilizado para induzir câncer de mama em modelos animais, o qual, atua como potente carcinógeno e indutor de danos ao DNA, sendo amplamente utilizado em pesquisas não clínicas, para investigação de substâncias com propriedades antitumorais (BASKARAN et al., 2010; ARROYO-ACEVEDO et al., 2015; ABBA et al., 2016), sugere-se que as alterações mediadas por DMBA sejam semelhantes às observadas no câncer humano (MIYATA, 2001).

Considerando a importância dos fitoquímicos na terapêutica do câncer, em especial, o [6]-G, esta pesquisa objetivou avaliar os efeitos antitumorais do [6]-G em células do líquido ascítico de Sarcoma 180, HL-60 e em modelos murinos para câncer de mama, bem como evidenciar os mecanismos toxicogênicos indicativos de morte celular.

A tese está dividida em 4 capítulos (**Figura 1**). O **capítulo 1**, discorre sobre uma revisão sistemática acerca do emprego do extrato de gengibre e [6]-G frente a processos tumorigênicos, oxidativos e inflamatórios, com ênfase nos mecanismos de ação em estudos experimentais e clínicos; o **capítulo 2** aborda os efeitos toxicogênicos do [6]-G em modelos não clínicos, como *A. salina* e *A. cepa*, bem como seus efeitos antitumorais em células do líquido ascítico de camundongos com Sarcoma 180, linhagem tumoral HL-60, e em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC); o **capítulo 3** reporta a análise de possíveis ações antitumorais do [6]-G, por marcadores citogênicos em cultura primária de S-180 através do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) e ensaio cometa, além da avaliação do mecanismo para genotoxicidade pelo cotratamento com H₂O₂ em células tumorais (S-180) e normais (sangue periférico); e o **capítulo 4** explana sobre os possíveis efeitos antitumorais do [6]-G, em modelo animal para carcinoma mamário induzido quimicamente por DMBA, identificação de alterações citogênicas, relação da frequência, índice e reparo de danos ao DNA, monitoramento de alterações metabólicas, comportamentais, bioquímicas, hematológicas, histopatológicas e imuno-histoquímica.

Figura 1 - Esquema representativo da subdivisão da tese.



Legenda: MN: micronúcleos. NC: necrose. AP: apoptose. PBMC: células mononucleadas de sangue periférico.

REFERÊNCIAS

- ABBA, M. C.; ZHONG, Y.; LEE, J.; KIL, H.; LU, Y.; TAKATA, Y.; SIMPER, M. S.; GADDIS, S.; SHEN, J.; ALDAZ, C. M. DMBA induced mouse mammary tumors display high incidence of activating Pik3caH1047 and loss of function Pten mutations. **Oncotarget**, v. 7, n. 39, p. 64289, 2016.
- AKIMOTO, M.; LIZUKA, M.; KANEMATSU, R.; YOSHIDA, M.; TAKENAGA, K. Anticancer effect of ginger extract against pancreatic cancer cells mainly through reactive oxygen species-mediated autotic cell death. **PLoS one**, v. 10, n. 5, p. e0126605, 2015.
- AKL, M. R.; AYOUB, N. M.; EBRAHIM, H. Y.; MOHYELDIN, M. M.; ORABI, K. Y.; FOUDAH, A. I.; SAYED, K. A. E. Araguspongine C induces autophagic death in breast cancer cells through suppression of c-Met and HER2 receptor tyrosine kinase signaling. **Marine drugs**, v. 13, n. 1, p. 288-311, 2015.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016. Atlanta, GA: American Cancer Society. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2015-2016.pdf>. Acesso em: 24/11/2018
- ARROYO-ACEVEDO, J.; CHÁVEZ-ASMAT, R. J.; ANAMPA-GUZMÁN, A.; DONAIRES, R.; RÁEZ-GONZÁLES, J. Protective effect of Piper aduncum capsule on DMBA-induced breast cancer in rats. **Breast cancer: basic and clinical research**, v. 9, p. 41, 2015.
- BASKARAN, N.; MANOHARAN, S.; BALAKRISHNAN, S.; PUGALENDHI, P. Chemopreventive potential of ferulic acid in 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague–Dawley rats. **European journal of pharmacology**, v. 637, n. 1, p. 22-29, 2010.
- BISWAS, J.; ROY, M.; MUKHERJEE, A. Anticancer drug development based on phytochemicals. **Journal of Drug Discovery, Development and Delivery**, v. 2, p. 1012, 2015.
- BROWN, G. R. Breast cancer in transgender veterans: a ten-case series. **Journal of Lesbian, Gay, Bisexual, and Transgender Health Services**, v. 2, n. 1, p. 77-80, 2015.
- CHAKRABORTY, D.; BISHAYEE, K.; GHOSH, S.; BISWAS, R.; MANDAL, S. K.; KHUDA-BUKHSH, A. R. [6]-Gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in cancer cells: Drug–DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells. **European journal of pharmacology**, v. 694, n. 1, p. 20-29, 2012.
- CHOI, Y. Y.; KIM, M. H.; HONG, J.; KIM, S.-H.; YANG, W. M. Dried Ginger (*Zingiber officinalis*) Inhibits Inflammation in a Lipopolysaccharide-Induced Mouse Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- CORCUERA L. A.; VETTORAZZI, A.; ARBILLAGA, L.; PÉREZ, N.; GIL, A.G.; AZQUETA, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; GARCÍA-JALÓN, J. A.; LÓPEZ DE CERAIN, A.

Genotoxicity of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A after simultaneous application of the in vivo micronucleus and comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 76, p. 116-124, 2015.

DAI, X.; LI, T.; BAI, Z.; YANG, Y.; LIU, X.; ZHAN, J.; SHI, B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 10, p. 2929, 2015.

DANWILAI, K.; KONMUN, J.; SRIPANIDKULCHAI, B.; SUBONGKOT, S. Antioxidant activity of ginger extract as a daily supplement in cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a pilot study. **Cancer management and research**, v. 9, p. 11, 2017.

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.

DONGARE, S.; GUPTA, S. K.; MATHUR, R.; SAXENA, R.; MATHUR S.; AGARWAL, R.; NAG, T. C.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, P. Zingiber officinale attenuates retinal microvascular changes in diabetic rats via anti-inflammatory and antiangiogenic mechanisms. **Molecular vision**, v. 22, p. 599, 2016.

EFFERTH, T.; SAEED, M. E.; MIRGHANI, E.; ALIM, A.; YASSIN, Z.; SAEED, E.; KHALID, H. E.; DAAK, S. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 50284, 2017.

ELKADY, A. I.; ABUZINADAH, O. A.; BAESHEN, N. A.; RAHMY, T. R. Differential control of growth, apoptotic activity, and gene expression in human breast cancer cells by extracts derived from medicinal herbs Zingiber officinale. **Journal of BioMed Research**, v. 2012, 2012.

FADEYI, S. A.; FADEY, I. O. O.; ADEJUMO, A. A.; OKORO, C.; MYLES, E. L. *In vitro* anticancer screening of 24 locally used Nigerian medicinal plants. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 79, 2013.

FERLAY, J.; STELIAROVA-FOUCHER, E.; LORTET-TIEULENT, J.; ROSSO, S.; COEBERGH, J. W.; COMBER, H.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 6, p. 1374–1403, 2013.

GRUNDY, A.; HARRIS, S. A.; DEMERS, P. A.; JOHNSON, K. C.; AGNEW, D. A. Occupational exposure to magnetic fields and breast cancer among Canadian men. **Cancer medicine**, v. 5, n. 3, p. 586-596, 2016.

HADGU, E.; SEIFU, D.; TIGNEH, W.; BOKRETSION, Y.; BEKELE, A.; ABEBE, M.; SOLLIE, T.; MERAJVER, S. D.; KARLSSON, C.; KARLSSON, M. G. Breast cancer in Ethiopia: evidence for geographic difference in the distribution of molecular subtypes in Africa. **BMC women's health**, v. 18, n. 1, p. 40, 2018.

HOWLADER, N.; NOONE, A. M.; KRAPCHO, M.; GARSHELL, J.; MILLER, D.; ALTEKRUSE, S. F. **SEER cancer statistics review, 1975-2011**. Bethesda (MD): National Cancer Institute; 2014.

HUSSAIN, S. S.; KUMARA, A. P.; GHOSH R. Food-based natural products for cancer management: Is the whole greater than the sum of the parts? **Seminars in Cancer Biology**, p. 233-246, 2016.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade – **Rio de Janeiro: INCA**, 2016.

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

KHOOGAR, R.; KIM, B. C.; MORRIS, J.; WARGOVICH, M. J. Chemoprevention in gastrointestinal physiology and disease. Targeting the progression of cancer with natural products: a focus on gastrointestinal cancer. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 310, n. 9, p. G629, 2016.

KIM, S. O.; KIM, M. R. [6]-gingerol prevents disassembly of cell junctions and activities of MMPs in invasive human pancreas cancer cells through ERK/NF- κ B/snail signal transduction pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

LEE, D. H.; KIMB, D. W.; JUNG, C. H.; LEE, Y. J.; PARK, D. D. Gingerol sensitizes TRAIL-induced apoptotic cell death of glioblastoma cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 279, n. 3, p. 253-265, 2014.

LEE, W. L.; HUANG, J. Y.; SHYUR, L. F. Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

LETE, I.; ALLUE, J. The effectiveness of ginger in the prevention of nausea and vomiting during pregnancy and chemotherapy. **Integrative medicine insights**, v. 11, p. 11-17, 2016.

LI, Y.; LI, S.; MENG, X.; GAN, R. Y.; ZHANG, J. J.; LI, H. B. Dietary natural products for prevention and treatment of breast cancer. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 728, 2017.

LIU, S. M.; OU, S. Y.; HUANG, H. H. Green tea polyphenols induce cell death in breast cancer MCF-7 cells through induction of cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 18, n. 2, p. 89-98, 2017.

LUKONG, K. E.; OGUNBOLUDE, Y.; KAMDEN, J. P. Breast cancer in Africa: prevalence, treatment options, herbal medicines, and socioeconomic determinants. **Breast cancer research and treatment**, v. 166, n. 2, p. 351-365, 2017.

MILLER, K. D.; SIEGEL, R. L.; LIN, C. C.; MARIOTTO, A. B.; KRAMER, J. L.; ROWLAND, J. H.; STEIN, K. D.; ALTERI, R.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271-289, 2016.

MITROVIC, O.; COKIC, V.; DIKIC, D.; BUDEC, M.; VIGNJEVIC, S.; SUBOTICKI, T.; GULAN, M.; RADOVIC, S.; FURTULA, S. Correlation between ER, PR, HER-2, Bcl-2, p53, proliferative and apoptotic indexes with HER-2 gene amplification and TOP2A gene amplification and deletion in four molecular subtypes of breast cancer. **Targeted oncology**, v. 9, n. 4, p. 367-379, 2014.

MIYATA, M.; FURUKAWA, M.; TAKAHASHI, K.; GONZALEZ, F. J.; YAMAZOE, Y. Mechanism of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced immunotoxicity: role of metabolic activation at the target organ. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 86, n. 3, p. 302-309, 2001.

OCHWANG'I, D. O.; KIMWELE, C. N.; ODUMA, J. A.; GATHUMBI, P. K.; KIAMA, S. G.; EFFERTH, T. Cytotoxic activity of medicinal plants of the Kakamega County (Kenya) against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 215, p. 233-240, 2018.

OIKAWA, S.; NISHINO, K.; OIKAWA, S.; INOUE, S.; MIZUTANI, T.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene. **Biochemical pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 361-370, 1998.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, J.; ZALDÍVAR-MACHORRO, V. J.; VILLANUEVA-PORRAS, D.; VEGA-ÁVILA, E.; CHAVARRÍA, A. A. Potential alternative against neurodegenerative diseases: Phytodrugs. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

PISOSCHI, A. M.; CIMPEANU, C.; PREDOI, G. Electrochemical methods for total antioxidant capacity and its main contributors determination: a review. **Open Chemistry**, v. 13, n. 1, 2015.

POTTER, J. W.; JONES, K. B.; BARROTT, J. J. Sarcoma—The standard-bearer in cancer discovery. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 126, p. 1-5, 2018.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.

RADHAKRISHNAN, E.; BAVA, S. V.; NARAYANAN, S. S.; NATH, L. R.; THULASIDASAN, A. K. T.; SONIYA, E. V. [6]-Gingerol induces caspase-dependent apoptosis and prevents PMA-induced proliferation in colon cancer cells by inhibiting MAPK/AP-1 signaling. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104401, 2014.

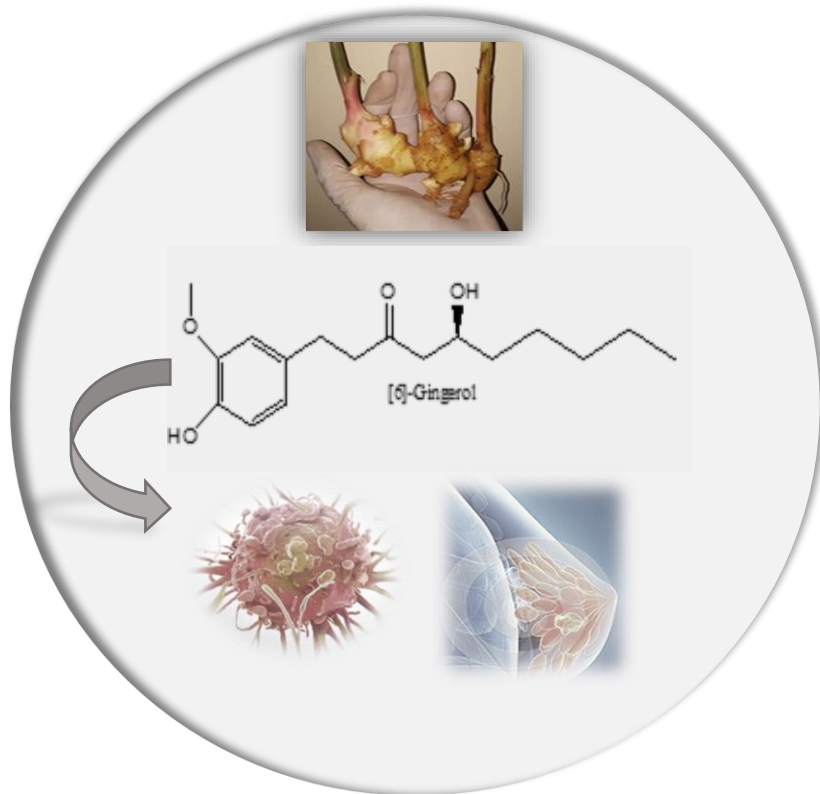
RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1439-1452, 2006.

RASTOGI, N.; DUGGAL, S.; SINGH, S. K.; PORWAL, K.; SRIVASTAVA, V. K.; MAURYA, R.; BHATT, M. L. B.; MISHRA D. P. Proteasome inhibition mediates p53 reactivation and anti-cancer activity of 6-Gingerol in cervical cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43310, 2015.

- RASTOGI, N.; GARA, R. K.; TRIVEDI, R.; SINGH, A.; DIXIT, P.; MAURYA, R.; MISHRA, D. P. (6)-Gingerolinduced myeloid leukemia cell death is initiated by reactive oxygen species and activation of miR-27b expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 288-301, 2014.
- REDDY, K. B. Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. **Current oncology**, v. 18, n. 4, p. e173, 2011.
- REES, C. A.; KEATING, E. M.; LUKOLYO, H.; DANYSH, H. E.; SCHEURER, M. E.; MEHTA, P. S. Mapping the Epidemiology of Kaposi Sarcoma and Non-Hodgkin Lymphoma Among Children in Sub-Saharan Africa: A Review. **Pediatric blood & cancer**, v. 63, n. 8, p. 1325-1331, 2016.
- ROTHFUSS, A.; HONMA, M.; CZICH, A.; AARDEMA, M. J.; BURLINSON, B.; GALLOWAY, S.; HAMADA, S.; KIRKLAND, D.; HEFLICH, R. H.; HOWE, J.; AKAJIMA, M.; O'DONOVAN, M.; PLAPPERT-HELBIG, U.; PRIESTLEY, C.; RECIO, L.; SCHULER, M.; UNO, Y.; MARTUS, H. J. Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 723, n. 2, p. 108-120, 2011.
- SAHDEO, P.; AMIT, K. T. Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer. **Gastroenterology research and practice**, v. 2015, 2015.
- SCHADICH, E.; HLAVÁČ, J.; VOLNÁ, T.; VARANASI, L.; HAJDÚCH, M.; DŽUBÁK, P. Effects of ginger phenylpropanoids and quercetin on Nrf2-ARE pathway in human BJ fibroblasts and HaCaT keratinocytes. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.
- SHUKLA, S.; MEHTA, A. Anticancer potential of medicinal plants and their phytochemicals: a review. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 199-210, 2015.
- SIEGEL, R. L.; MILLER K. D.; JEMAL A. Cancer statistics 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n.1, p.7-30, 2016.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.
- SINGH, S.; JARIAL, R.; KANWAR, S. S. Therapeutic effect of herbal medicines on obesity: herbal pancreatic lipase inhibitors. **Wudpecker J. Med. Plants**, v. 2, p. 53-65, 2013.
- SINGH, S.; SHARMA, B.; KANWAR, S. S.; KUMAR, A. Lead phytochemicals for anticancer drug development. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1667, 2016.
- TORQUATO, F.V.; GOETTERT, H., I.; JUSTO, M., Z. G. J.; PAREDES-GAMERO, E. Anti-Cancer phytometabolites targeting cancer stem cells. **Current genomics**, v. 18, n. 2, p. 156-174, 2017.

- ULLAH, I.; SUBHAN, F.; AYAZ, M.; SHAH, R.; ALI, G.; HAQ, I. U.; ULLAH, S. Anti-emetic mechanisms of zingiber officinale against cisplatin induced emesis in the pigeon; behavioral and neurochemical correlates. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 34, 2015.
- UNO, Y.; MORITA, T.; LUIJTEN, M.; BEEVERS, C.; HAMADA, S.; ITOH S.; OHYAMA, W.; TAKASAWA, H. Micronucleus test in rodent tissues other than liver or erythrocytes: Report of the IWGT working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 783, p. 19-22, 2015.
- VAN, T. M. A.; PALSON, O. S.; RINGEL, Y. E.; WHITEHEAD, W. E. Is ginger effective for the treatment of irritable bowel syndrome? A double blind randomized controlled pilot trial. **Complementary therapies in medicine**, v. 22, n. 1, p. 17-20, 2014.
- VENKATESAN, R.; JI, E.; KIM, S. Y. Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: a comprehensive review. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- VIPIN, A. V.; RAKSHA RAO, K.; NAWNEET, K. K.; APPAIAH, K. A.; VENKATESWARAN, G. Protective effects of phenolics rich extract of ginger against Aflatoxin B1-induced oxidative stress and hepatotoxicity. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 91, p.415–424, 2017.
- WORCH, J. E.; CYRUS, J.; GOLDSBY, R.; MATTHAY, K. K.; NEUHAUS, J.; DUBOIS, S. G. Racial differences in the incidence of mesenchymal tumors associated with EWSR1 translocation. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, p. cebp. 1170.2010, 2011.
- ZHANG, Q.; ZHU, B.; LI, Y. Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: A New Approach for Anticancer Therapy. **Frontiers in immunology**, v.8, n.71, 2017.
- ZHENG, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.; XU, D. P.; LI, S.; LI, H. B. Spices for prevention and treatment of cancers. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 495, 2016.
- ZHU, Y.; WANG, F.; ZHAO, Y.; WANG, P.; SANG, S. Gastroprotective [6]-gingerol aspirinate as a novel chemopreventive prodrug of aspirin for colon cancer. **Scientific reports**, v. 7, p. 40119, 2017.

Objetivos



2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos antitumorais do [6]-G em células do líquido ascítico de Sarcoma 180, HL-60 e em modelos murinos para câncer de mama, bem como evidenciar os mecanismos toxicogénéticos, com aplicação de biomarcadores citogenéticos indicativos de instabilidade genética compatíveis com inibição de proliferação celular.

2.2 Específicos

- Realizar uma revisão sistemática acerca das atividades anticancerígenas do extrato de gengibre e [6]-G associadas a mecanismos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais em estudos *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*;
- Avaliar os efeitos toxicogénéticos e antioxidantes do [6]-G em modelos não clínicos como *A. salina* e *A. cepa*, bem como investigar os efeitos citotóxicos do [6]-G em células primárias de Sarcoma 180 (S-180), linhagem tumoral HL-60 e células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) normais;
- Analisar os efeitos antitumorais do [6]-G em cultura primária de S-180, evidenciando os mecanismos citogenéticos indicativos de genotoxicidade e mutagenicidade, com aplicação do ensaio cometa e do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN);
- Avaliar os efeitos antitumorais e mecanismos toxicogénéticos do [6]-G, em modelos murinos para o câncer de mama em camundongos fêmeas, por parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos histopatológicos e imuno-histoquímico, e aplicação do ensaio cometa na avaliação dos níveis de genotoxicidade, reparo e apoptose.

Referencial Teórico



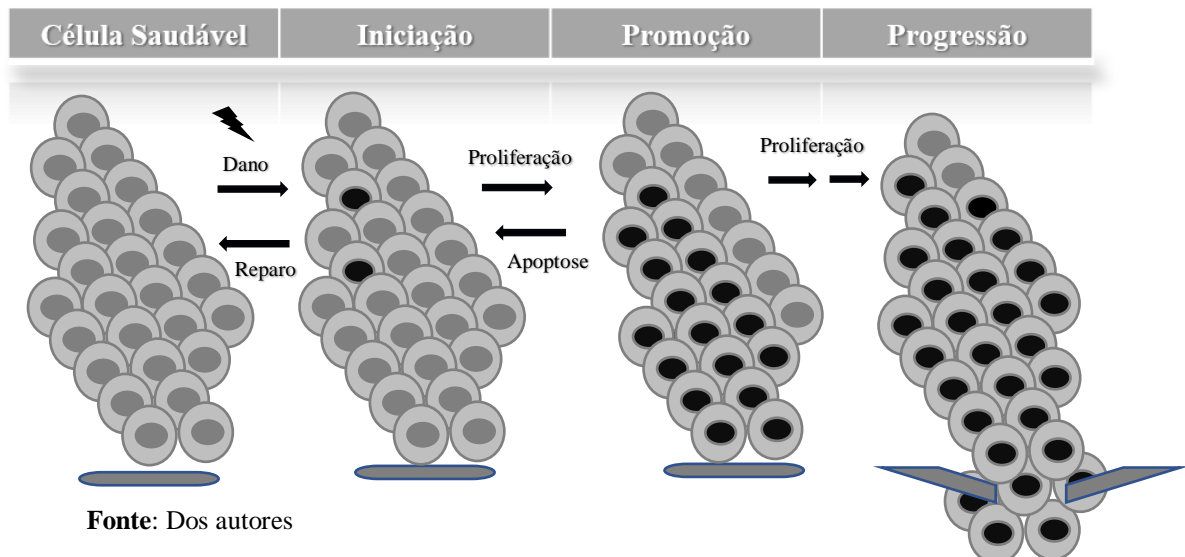
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer: aspectos gerais, etiologia, epidemiologia, fatores psicossociais

O câncer é um complexo conjunto de doenças sistêmicas (NEAL et al., 2015) que afetam múltiplos órgãos e sistemas (RUTKOWSKI et al., 2015), decorrente de mudanças em múltiplas redes biológicas (PACHE; CEOL; ALOY, 2012). A base molecular do desenvolvimento de células cancerígenas tem sido atribuída principalmente a oncogenes e genes supressores de tumores (LEVINE; PUZIO-KUTER, 2010), onde a respectiva ativação e inativação destes, por meio de eventos mutacionais podem desencadear crescimento e proliferação descontrolados, levando células normais a adquirirem propriedades de carcinogênese (formação do câncer) (NGO et al., 2015).

A carcinogênese ocorre por uma sequência de estágios (INCA, 2017). De acordo com o modelo clássico (**Figura 1**), a fase da iniciação envolve a exposição de células normais a agentes cancerígenos e formação de uma célula pré-neoplásica (HANAHAN; WEINBERG, 2011), a segunda fase, está relacionada à extensão do tempo de exposição ao agente carcinogênico, ocasionando mutações, com alterações na expressão gênica e no aumento anormal da multiplicação celular (OLIVEIRA et al, 2007), a terceira fase, relacionada a progressão, envolve alterações celulares e moleculares que ocorrem do estado pré-neoplásico ao neoplásico (KLAUNIG, 2013), onde as células se proliferam de maneira descontrolada e angariam a habilidade de adentrar a outros tecidos através da angiogênese e das vias linfáticas (OLIVEIRA et al, 2007).

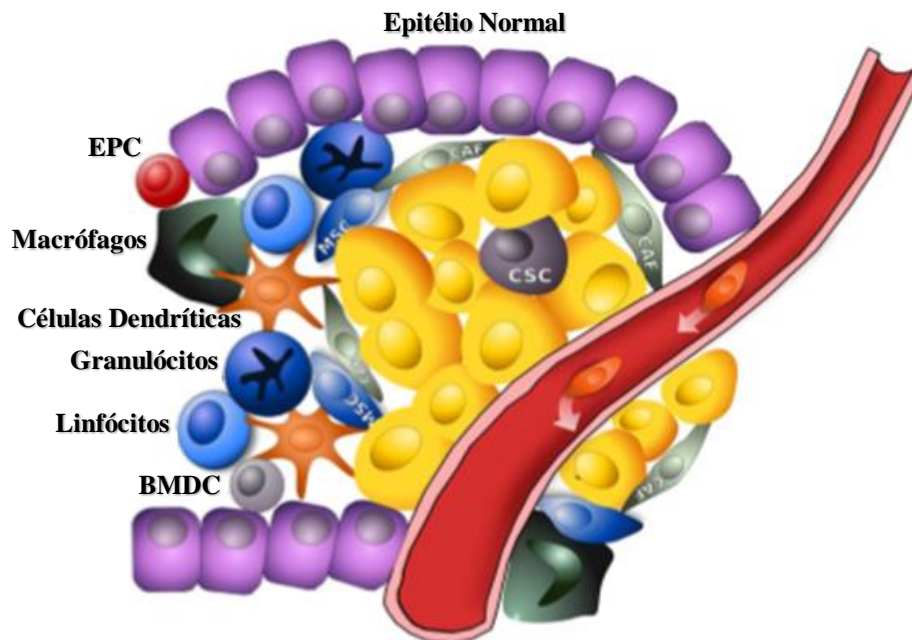
Figura 1 - Modelo clássico dos estágios da carcinogênese.



A transformação do tecido saudável em tumoral se desenvolve geralmente ao longo de anos ou mesmo décadas de vida, é um processo altamente complexo que envolve agentes estressores que danificam o DNA (AGGARWAL et al., 2009). Inúmeras condições contribuem para a promoção da carcinogênese, os quais incluem alterações epigenéticas, estresse da maquinaria de replicação, agentes biológicos, estresse oxidativo e agentes químicos nocivos ao DNA (HANAHAN; WEINBERG, 2011), uma ruptura da homeostase, frequentemente associada à inflamação crônica, também está ligada à carcinogênese (NOONAN et al., 2008).

O microambiente tumoral (**Figura 2**) pode ser caracterizado como um ecossistema complexo (KRESO; DICK, 2014), uma vez que apresentam múltiplas populações celulares (epiteliais, dendríticas, macrófagos, granulócitos, linfócitos, células-tronco cancerígena) derivadas do hospedeiro (HILL, 2016), assim como, moléculas sinalizadoras (fator de crescimento endotelial vascular - VEGF, quimiocinas, fator de necrose tumoral - TNF) (XU; FARACH-CARSON, 2014). A indesejável evolução da malignidade durante a progressão do câncer surge através de um processo de seleção em uma estrutura populacional complexa e heterogênea (MAHDIPOUR-SHIRAYEH et al., 2017).

Figura 2 - Representação ilustrativa de um microambiente tumoral.



Legenda: BMDC (células derivadas de medula óssea); CAF (fibroblasto associado ao câncer); CSC, (célula-tronco cancerígena); EPC (células progenitoras endoteliais); MSC (células-tronco mesenquimais).

Fonte: Adaptado de PAPACCIO et al., 2017.

Os fenômenos da carcinogênese e crescimento tumoral ocorrem em tecidos neoplásicos, mas não em células individuais, e o microambiente é parte integrante e essencial do câncer. Portanto, faz-se necessário considerar o microambiente tumoral como um epitélio anormal funcional. A teoria do campo da organização tecidual indica que as células estromais, inflamatórias e endoteliais têm papéis cruciais no tumor em desenvolvimento (BAKER, 2015), células cancerígenas podem levar a modificações da topografia e composição molecular do estroma durante o desenvolvimento precoce do tumor (CALORINI; BIANCHINI, 2010)

Tumores de mesma origem histológica diferem em relação ao comportamento biológico entre pacientes, da mesma forma, células do mesmo tumor podem variar no que diz respeito ao nível de malignidade (TIRINO et al., 2011), há uma heterogeneidade substancial que influencia consideravelmente na resposta das subpopulações de células tumorais à quimioterapia, onde, enquanto algumas respondem bem ao tratamento, outras resistem e causam falhas (WALTHER; SKLAR, 2011). A população tumoral heterogênea representa uma das principais razões para o desenvolvimento de tumores refratários resistentes (EFFERTH et al., 2017).

O aparecimento de resistência a drogas na terapia do câncer é um obstáculo importante ainda não resolvido, mesmo depois de muitas décadas de enormes esforços na pesquisa do câncer (WALTHER; SKLAR, 2011). A resistência também impede a aplicação de altas doses de fármacos, devido aos graves efeitos colaterais dos antineoplásicos. Novas estratégias para erradicar subpopulações de tumores heterogêneos podem não apenas combater o desenvolvimento de resistência a drogas, mas também facilitar a redução de efeitos colaterais (EFFERTH et al., 2017). A integridade genômica apresenta-se conservada em células normais, entretanto, células tumorais mutam constantemente seu DNA genômico para se adaptar ao ambiente, especialmente durante e após uma terapia (SPROUFFSKE et al., 2013; WURZ; KAO; DEGREGORIO, 2014).

Os fatores de risco não modificáveis (como os genéticos) e modificáveis contribuem para o desenvolvimento e manifestação de lesões cancerígenas, sendo que, os fatores de risco modificáveis podem ser evitáveis (AGGARWAL; VIJAYALEKSHMI; SUNG, 2009; TANAKA; SUGIE, 2007). Para muitos tipos de câncer, sabe-se que maus hábitos (tabagismo, álcool, dieta inadequada, falta de exercícios), comorbidades físicas (sobrepeso, obesidade, diabetes, síndrome metabólica, certas síndromes inflamatórias) e exposição a carcinógenos contribuem com um risco adicional para o câncer (ALBINI et al., 2015).

Após o diagnóstico da doença, é necessário um tratamento holístico e individualizado para que as necessidades físicas e psicológicas do paciente sejam abordadas. Para melhorar os resultados é preciso enfatizar o diagnóstico precoce e a intervenção rápida, conforme tem

relatado os programas de rastreio do câncer (NEAL et al., 2015). Serviços especializados em oncologia adaptados às necessidades individuais dos pacientes incluem mediação cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, medicina nuclear, cuidados paliativos e apoio psicológico (MAN et al., 2018). Para ser altamente eficaz, as intervenções nas redes biológicas devem ser múltiplas, por um lado, mas extremamente seletivas, por outro lado, para poupar os órgãos normais dos efeitos colaterais prejudiciais (AZMI, 2012).

As principais desvantagens da quimioterapia clássica são a recorrência do câncer, associada à resistência aos medicamentos, e efeitos colaterais graves que podem limitar o uso de drogas anticancerígenas e, assim, prejudicar a qualidade de vida dos pacientes. Apesar disso, a quimioterapia ainda é um dos tratamentos mais utilizados em todos os tipos de câncer e em todas as fases da progressão da doença (RAYAN; RAIYN; FALAH, 2017), em relação ao tratamento com radiação, a resposta dos tumores é multifatorial e depende das características do microambiente tumoral, assim como da sensibilidade intrínseca das próprias células tumorais (HILL, 2016).

Mesmo diante de inúmeros suportes terapêuticos (MAN et al., 2018), o câncer ainda exerce um enorme ônus social em esfera mundial, sem perspectivas imediatas de controle efetivo (STEWART; WILD, 2014). Regiões menos desenvolvidas da África, Ásia (excluindo o Japão), América Latina e Caribe correspondem a cerca de 57% da carga global e 65% das mortes por câncer (JEMAL et al., 2011; TORRE et al., 2015). Prevê-se ainda que a incidência de câncer aumente 75% até 2030, devido a comportamentos de estilo de vida associados ao risco e à ocidentalização de países economicamente em desenvolvimento (TORRE et al., 2015).

No Brasil, estima-se a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer para cada ano do biênio 2018-2019, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), existindo a previsão de 420 mil casos novos de câncer. Tais estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto entre os mais incidentes, entretanto ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago (**Figura 3**). A descrição da distribuição dos tipos mais incidentes de câncer, por meio do tempo, tem sido uma das principais estratégias para o estabelecimento de diretrizes em políticas públicas e, principalmente, para o planejamento de ações de prevenção e controle do câncer (INCA, 2017).


Figura 3 - Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas e ajustadas a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Colón e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glandula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro	324.580	314,55	-	-	-	-	310.300	292,74	-	-	-	-

Fonte: INCA, 2017

Os cânceres de próstata (68 mil) em homens, e mama (60 mil) em mulheres, serão os mais frequentes. Os tipos de câncer mais notificados em homens serão próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) figurarão entre os principais. As taxas de incidência (**Figura 4**) ajustadas por idade tanto para homens (217,27/100 mil) quanto para mulheres (191,78/100 mil) são consideradas intermediárias e compatíveis com as apresentadas para países em desenvolvimento (INCA, 2017).

Figura 4 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto, câncer de pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: INCA (2017)

Os principais órgãos financiadores de pesquisa sobre o câncer, governos e agências internacionais explicitamente reconhecem a magnitude do problema e definem prioridades para prevenção, diagnóstico precoce e tratamento mais eficaz (VARMUS; KUMAR, 2013). A prevenção e controle no Brasil, um país de dimensões continentais e fortes diferenças regionais por abrigar uma população de comportamentos, crenças e atitudes de modo bem diversificado, representando então, um dos grandes desafios que a saúde pública enfrenta (INCA, 2017), dessa forma, a prevenção efetiva do câncer é difícil por uma variedade de razões logísticas, sociais e econômicas (BISSELL; HINES, 2011; GREAVES, 2014).

O câncer permeia muitas dimensões da vida de um indivíduo, exigindo uma abordagem de tratamento holística que engloba intervenções médicas e psicológicas (BARRE; PADMAJA; SUVASHISA, 2018). Altos níveis de sofrimento psíquico merecem atenção clínica, uma vez que podem influenciar negativamente a adesão ao tratamento (KENNARD et al., 2004; YEE et al., 2017), apesar dos avanços terapêuticos da doença, evidências apontam o fato do câncer acometer o paciente não apenas fisiologicamente, mas também psicossocialmente (DEMIR, 2017). O estresse é considerado um grande fator psicológico precipitante em pacientes com câncer desde o diagnóstico, tratamento e prognóstico, mesmo após a doença ter passado (KANG; PARK; MCARDLE, 2012), uma vez que, o medo da recorrência e as dificuldades impostas pelas circunstâncias, como os problemas físicos diários podem criar comorbidades psiquiátricas (ansiedade, depressão, transtorno de estresse pós-traumático) novas ou amplificar as já existentes (NIKBAKHSH et al., 2014; SURMAN; JANIK, 2017).

O equilíbrio entre a inovação contínua e o custo monetário deve ser ponderado, já que essas duas questões não existem isoladamente uma da outra (DIELEMAN; BARAL; BIRGER, 2016), ser um paciente diagnosticado com câncer pode levar a despesas catastróficas com várias

consequências, incluindo uma redução no rendimento familiar (DOCKERTY; SKEGG; WILLIAMS, 2003), perda patrimonial, déficit na qualidade de vida, comprometimento da saúde psicossocial e dificuldade na adesão ao tratamento, dessa forma, há uma extrema necessidade de lidar com essas despesas inflacionárias, pois elas acabarão excedendo a capacidade do paciente e da sociedade em sustentá-las (TRAN; ZAFAR, 2018). Por outro lado, evidências sugerem que a interrupção do tratamento do câncer pode piorar o prognóstico e a sobrevida dos pacientes (BARTON et al., 1992; D`AMBROSIO et al., 2008; OHRI et al., 2016).

O termo “toxicidade financeira” vem sendo cada vez mais utilizado na literatura médica para descrever os efeitos do ônus financeiro do paciente com câncer (ZAFAR et al., 2013), sendo que, aqueles com baixa renda são particularmente vulneráveis aos efeitos econômicos (ARZULLAH et al., 2004). Os eventos adversos que atingem os pacientes durante o tratamento do câncer são frequentes e também associados a uma carga econômica substancial (WONG et al., 2018), além de impactar negativamente nos resultados clínicos, perturbar o planejamento do tratamento, muitas vezes levando a mudanças de terapia (como atrasos de dose ou reduções), menor adesão, e até mesmo a interrupção (RASHID et al., 2015; TACHI et al., 2015).

3.2 Câncer de mama

O câncer de mama (CM) desempenha um papel preocupante, uma vez que cerca de dois milhões de novos casos e meio milhão de mortes, estão relacionadas à patologia registradas anualmente em todo o mundo (GOLUBNITSCHAJA et al., 2016), o CM sozinho representa 25% de todos os casos de câncer e 15% de todas as mortes por câncer entre as mulheres (TORRE et al., 2015). No Brasil, ocorreram 15.403 óbitos por CM no ano de 2015 (BRASIL, 2017), para cada ano do biênio 2018-2019, estimam-se 59.700 casos novos de CM, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres, para o estado do Piauí, estimativas indicam o surgimento de 600 novos casos (INCA 2017), alerta-se ainda, que o CM não se limita às mulheres, uma vez que, o carcinoma da mama masculina é responsável por 0,8% a 1% de todos os CM (GOMEZ-RAPOSO et al., 2010).

O CM é uma doença altamente heterogênea, e conseqüentemente, apresenta classificações complexas (SINN; KREIPE, 2013; VAN NIJNATTEN et al., 2017), para os vários perfis histopatológicos, hormonais e genéticos da doença (GRAY et al., 2017). O CM pode ser categorizado em carcinoma *in situ* e invasivo (infiltrante). O CM *in situ* é

posteriormente subclassificado como ductal (carcinoma ductal *in situ*), onde as lesões aparecem com mais frequência nos ductos mamários, e lobulares (câncer lobular *in situ*), o qual está associado à hiperplasia lobular atípica (LOGAN et al., 2015), a versão infiltrante do carcinoma lobular frequentemente se estende a outras áreas do corpo, porém, na categoria *in situ*, o câncer não se distanciou do lóbulo ou ductos onde se situava (WEST et al., 2017).

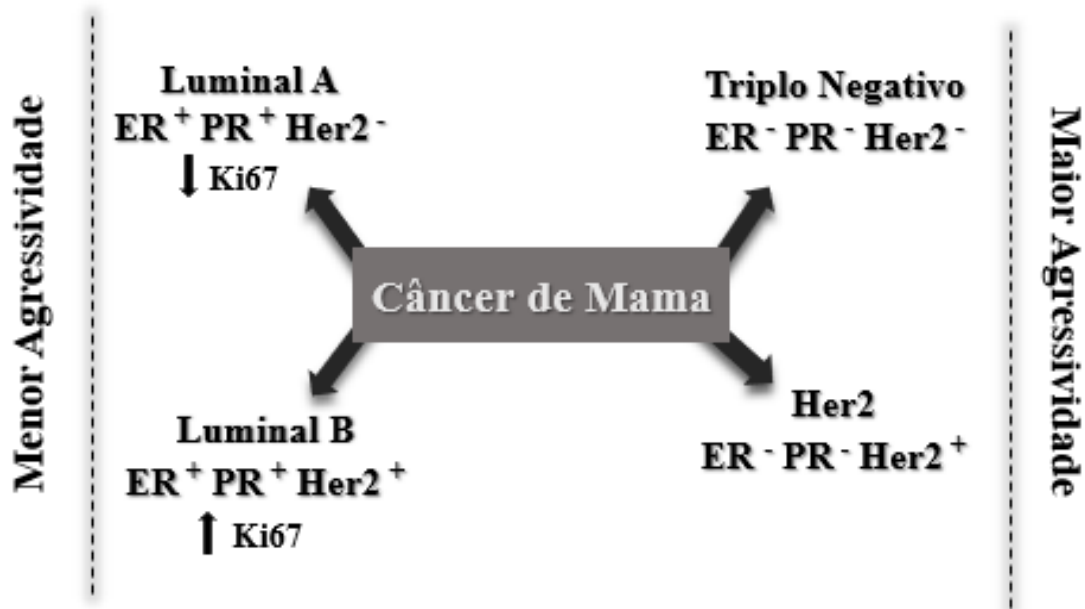
Os carcinomas ductais são os mais comuns das neoplasias malignas da mama (aproximadamente 80%), seguem um modelo de progressão tumoral linear, onde a transição do carcinoma ductal *in situ* para infiltrante é um passo crítico na progressão do CM, que muitas vezes leva a doença metastática, a qual está associada à elevada mortalidade (KORKOLA et al., 2003; POLYAK, 2007; ESPINA; LIOTTA, 2011). A subcategoria do carcinoma ductal *in situ* conhecido como comedocarcinoma tende a ser mais agressivo (NORTON et al., 2010), os tipos mais comuns baseados no padrão arquitetônico incluem carcinoma ductal sólido (células tumorais preenchem completamente os ductos), cribriforme (células tumorais não preenchem completamente os ductos apresentando lacunas), papilar (células tumorais se organizam em padrão de samambaia dentro dos ductos mamários afetados) e micropapilar (menores que o padrão papilar) (NOUNOU et al., 2015).

Os estágios do CM são determinados pela invasão da malignidade, seja ela demarcada nos tecidos mamários ou que tenha migrado para além da membrana basal, levando à metástase (PHIPPS; LI, 2010). Conforme a doença progride, o tumor primário limitado a mama (estágio 1) frequentemente se espalha para outros tecidos da mama e gânglios linfáticos próximos (estágio 2–3) ou para órgãos distantes (metástase à distância, isto é, estágio 4) (SINN; KREIPE, 2013) como pulmão, tecido ósseo, fígado e cérebro, estes são os locais mais comuns de metástase proveniente do CM (WEIGELT; PETERSE; VAN'T, 2005).

O CM também pode ser classificado com base nas expressões dos receptores hormonais (receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (Her2)) (ONITILO et al., 2009), sendo denominado de acordo com a subtipagem intrínseca: Luminal A; Luminal B; Her2 superexpresso; triplo-negativo (**Figura 5**) (CEJALVO et al. 2017). O Luminal A apresenta o melhor prognóstico geral, é o tipo mais comum do CM com ER⁺ e PR⁺ positivos, expressão negativa de Her2⁻ e baixa expressão de Ki67 (DAI et al. 2015). O subtipo Luminal B, por outro lado, é ER⁺, PR⁺ e Her2⁺ e ocasionalmente ER⁺ PR⁺ e Her2⁻, também possui maior expressão de Ki67, o que leva a um pior prognóstico (THOMPSON et al. 2016). Tumor de mama triplo negativo ER⁻, PR⁻ e Her2⁻ são significativamente mais agressivos e tende a metastatizar, esse tipo de câncer é o mais fatal e tem o pior prognóstico em geral. É muito agressivo e propenso a metástases com menor taxa

de sobrevivência (PARK et al., 2014), corresponde a cerca de 15% a 20% dos casos de CM (JITARIU et al., 2017)

Figura 5 - Subtipos do câncer de mama com base na expressão de receptores hormonais.



Fonte: Dos autores.

Estudos epidemiológicos revelaram que 12% das mulheres com câncer de mama têm um membro da família afetado e 1% dos pacientes tem um ou mais parentes afetados (DUMITRESCU; COTARLA, 2005). Metade das síndromes de predisposição ao CM está associada a mutações em BRCA1 e BRCA2, notavelmente, ambos os genes (BRCA1 e BRCA2) associados ao câncer de mama são anti-oncogenes que codificam proteínas supressoras de tumor (GODET; GILKES, 2017), entretanto, mutações deletérias no BRCA 1 e 2 são consideradas fatores de risco para suscetibilidade ao CM e outros tipos de câncer, incluindo câncer de ovário, cólon e próstata (STEWART; WILD, 2014; MEHRGOU; AKOUCHEKIAN, 2016). O CM triplo negativo, considerado a forma mais agressiva da doença, apresenta maior incidência de mutações no BRCA-1 (GADI; DAVIDSON, 2017). O risco ao longo da vida varia de 65 a 81%, para portadores de mutação em BRCA1; e 45 a 85%, para portadores de BRCA2 (KAMIŃSKA et al., 2015). As mutações no gene TP53, supressor tumoral, também têm sido associadas a um aumento do risco de CM precoce em mulheres (SCHON; TISCHKOWITZ, 2017).

Diferentes fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do CM em mulheres. A idade, sem dúvidas, aumenta o risco de desenvolver a doença (MCGUIRE et al., 2015) sendo

a incidência de CM maior em mulheres acima de 50 anos de idade (ALEGRE et al., 2013). Múltiplos fatores estão envolvidos na etiologia do câncer de mama: menarca precoce (< 12 anos); menopausa tardia (> 55 anos); nuliparidade de paridade; primeira gravidez após os 30 anos; uso de alguns anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal (TRH) na menopausa; exposição à radiação ionizante; consumo de bebidas alcoólicas; sedentarismo; dietas hipercalóricas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; INCA, 2017; STEWART; WILD, 2014).

Em mulheres obesas o tecido adiposo pode fornecer o estrogênio, pois é capaz de produzi-lo, este aumento na produção hormonal parece aumentar o risco de CM em mulheres pós-menopausa acima do peso; deficiência de vitamina D e falta de exposição ao sol também são consideradas causas importantes do CM (ALCO et al., 2014). A doença, quando atinge uma das mamas, pode aumentar o risco em quatro vezes de acometer a outra mama, enquanto os pacientes acometidos com câncer de ovário, endométrio ou cólon apresentam um risco 1 a 2 vezes maior de desenvolver CM (HASSON-OHAYON et al., 2010).

O tratamento multimodal de pacientes diagnosticados com CM envolve modalidades padronizadas, como cirurgia, radioterapia e terapia medicamentosa, além de algumas medidas complementares opcionais que vão desde a acupuntura até o controle da dieta (GREENLEE et al., 2017; MASOUD; PAGÈS, 2017). No manejo do CM após o diagnóstico, o objetivo é preservar a qualidade de vida do paciente (MENG et al., 2017). As duas primeiras modalidades (cirurgia e radioterapia) são usadas principalmente para erradicar o tumor primário da mama e os tecidos cancerígenos locorreionais (GREENLEE et al., 2017). A cirurgia é a principal estratégia para indivíduos cujo CM não se estendeu a outras áreas do corpo, também podendo ser uma escolha para estágios mais complexos da doença (ELLIS et al., 2017; HOUSSAMI; TURNER; MORROW, 2017; PEARSON; MILLIGAN; CAIN, 2017). A radiação empregando altos níveis de radiação *in situ* após a cirurgia reduz o risco de recorrência local do câncer, uma vez que pode eliminar células tumorais residuais (DHANKHAR et al., 2010; AKRAM; SIDDIQUI, 2012).

A quimioterapia pode ser prescrita para controlar o CM metastático, minimizar ou retardar seu desenvolvimento uma vez que é capaz de eliminar células cancerígenas usando drogas citotóxicas (MASOOD, 2016; AKRAM et al., 2017). O modelo quimioterápico pode ser administrado antes e após procedimento cirúrgico, dependendo das condições do paciente. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, os medicamentos quimioterápicos utilizados no tratamento do CM são: docetaxel, paclitaxel, agentes de platina (cisplatina, carboplatina),

vinorelbina (navelbina), capecitabina (Xeloda), doxorubicina lipossomal (doxil), ciclofosfamida (citoxan) e carboplatina (paraplatina) (BENSON et al., 2004).

A terapia endócrina (anti-estrogênica), pode ser utilizada em tipos de câncer que são afetados por hormônios, os quais expressam receptores hormonais, como receptores de estrogênio (AKRAM et al., 2017), a categoria mais comum de drogas usadas no câncer de mama é o anti-estrógeno tamoxifeno, raloxifeno e toremifeno (CLARKE et al., 2003). O tumor quando demonstra o padrão de superexpressão / amplificação do HER2, utiliza-se o trastuzumabe (Herceptin), uma terapia alvo anti-HER2. Entretanto, na ausência da expressão dos três receptores (ER⁻, PR⁻ e Her2⁻), o CM triplo negativo não é sensível à terapia hormonal e à terapia anti-HER2, dessa forma, a quimioterapia torna-se a única terapia medicamentosa útil (JITARIU et al., 2017; GADI; DAVIDSON, 2017).

O problema com a quimioterapia padrão é o fato das drogas convencionais não distinguem com precisão células normais e malignas em crescimento, ou seja, enquanto as células estão se dividindo, acabam se tornando alvos dos antineoplásicos (EFFERTH et al., 2017), dentre os efeitos prejudiciais comuns da quimioterapia destacam-se náuseas, vômitos, diarreia, perda de pelos (KANTI et al., 2014), mielossupressão, especialmente a neutropenia (WANG; PROBIN; ZHOU, 2006), além de nefrotoxicidade (ZIRAK et al., 2014; INOUE et al., 2018), hepatotoxicidade (YAGMURCA et al., 2007) e cardiotoxicidade (ANGSUTARARUX; LUANPITPONG; ISSARAGRISIL, 2015; VARRICCHI et al., 2018).

Os efeitos colaterais desagradáveis do tratamento do CM são um dos fatores mais motivadores para pesquisa de métodos alternativos. O uso de ervas no tratamento de pacientes com câncer de mama é considerado uma alternativa natural, pois algumas plantas podem conter propriedades que naturalmente têm a capacidade de tratar o CM (ZHU et al., 2011; MARY; VINOETHA; PRADEEP, 2012; ABDULL; AHMAD; NOOR, 2013).

3.3 Sarcoma

Os sarcomas compreendem um grande grupo de malignidades primárias, e de forma geral, podem ser divididos em dois tipos: sarcoma ósseo primário e sarcoma de tecido mole (SKUBITZ; D'ADAMO, 2007), estes se manifestam, de forma abrangente, em tecidos mesenquimais, como: músculo, osso, gordura, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e nervos (SHMOOKLER et al., 2001; MORRISON, 2003), podendo afetar distintas regiões do organismo. A maioria surge de forma esporádica, embora também haja algumas síndromes de predisposição genética como mutação do alelo RB (Retinoblastoma) e síndrome de *Li-*

Fraumeni, causada por mutações em TP53; também existem os fatores ambientais como exposição a cloreto de vinila ou radiação ionizante que estão associados a sarcomas específicos (FROEHNER; WIRTH, 2001; RUBINO et al., 2005; GONZALEZ et al., 2009; MAGNUSSON et al., 2012; COLLINS et al., 2014).

Integrando um grupo heterogêneo de neoplasias, os sarcomas comportam mais de 50 subtipos, dos quais cerca de 50% são musculoesqueléticos e ocorrem nas extremidades do corpo (STEFFNER; JANG, 2018), a patologia representa cerca de 1% das neoplasias adultas e aproximadamente 20% das neoplasias pediátricas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018; WARD et al., 2014). De acordo com a *American Cancer Society*, cerca de 12.310 novos casos (6.980 em homens e 5.330 em mulheres) foram diagnosticados com sarcoma de tecido mole nos Estados Unidos em 2016 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

Estimativas recentes indicam que os sarcomas são responsáveis por cerca de 2% das mortes relacionadas ao câncer, e a taxa de sobrevida em 5 anos é inferior a 15% (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018), aproximadamente, 200.000 pessoas no mundo são diagnosticadas com sarcomas a cada ano (DOYLE, 2014). No Brasil, de acordo com os Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) a mediana das taxas médias de incidência do sarcoma foi de 6,67 por milhão para a faixa etária de 0 a 14 anos, e de 7,54 por milhão para o grupo de 0 a 19 anos, observa-se ainda um predomínio no sexo masculino e, assim como descrito pela literatura, também se verifica dois picos etários, um de 1 a 4 anos e outro a partir dos 10 anos (INCA, 2016).

Apesar de menos comuns, os sarcomas representam um desafio terapêutico quando atingem grandes proporções, pois são agressivos localmente e capazes de apresentar crescimento invasivo e destrutivo, recidiva local e metástases (FLEURY; SANCHES, 2006; TONETO; LUCCHESI; REICHEL, 2013), verifica-se ainda, que mesmo a administração de diversas combinações de quimioterapias citotóxicas, como doxorrubicina e cisplatina, tenham melhorado significativamente as taxas de sobrevida de pacientes com certos tipos de sarcoma desde os anos 80, o progresso no tratamento da doença permaneceu lento e os desfechos clínicos não melhoraram nos últimos anos (HARWOOD et al., 2015).

Inúmeros estudos experimentais com sarcoma de *Crocker*, também conhecido como Sarcoma 180 (S-180), um tumor indiferenciado encontrado em ratos albinos machos no ano de 1914 (SILVA, SANTOS, CASSALI, 2006), tem sido utilizado como modelo experimental na avaliação plantas medicinais com efeito citotóxico (LAW et al., 2018), o tumor murino S-180 (**Figura 6**) é uma das culturas de célula primária mais usadas na pesquisa de produtos naturais com atividade antineoplásica (MAGALHÃES et al., 2010; BEZERRA et al., 2008; FERREIRA

et al., 2011; FERREIRA et al., 2015), a cultura de S-180 pode ser transplantada por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90% a 100% dos animais inoculados (OLIVEIRA-JR et al., 2005).

Figura 6 - Camundongo (*Mus musculus*) linhagem *Swiss* portador de S-180



Fonte: Dos autores.

Os tumores transplantáveis de camundongos têm sido amplamente explorados na oncologia experimental, principalmente na avaliação biológica da resposta à quimioterapia (MILLER et al., 2012), modelos com sarcoma são fundamentais para o entendimento da biologia molecular do câncer, uma vez que os sarcomas são distinguidos por aberrações moleculares como mutações, deleção intergenes, ampliações de genes e translocações (QUESADA; AMATON, 2012). Dessa forma, células tumorais de murino apresentam-se como uma importante ferramenta pré-clínica no estudo de novas substâncias químicas ou naturais com propriedades antitumorais (FERREIRA et al., 2015).

3.4 Leucemia

A leucemia é um tipo de câncer que ocorre no tecido que forma o sangue, a maioria das células do sangue se forma na medula óssea. Na leucemia, as células sanguíneas que não atingiram sua maturidade (células anormais), não funcionam de forma adequada, nem morrem, substituindo as células sanguíneas normais da medula óssea (HOWLADER et al., 2017), trata-se de um distúrbio hematológico em que dois pacientes com leucemia podem parecer morfologicamente idênticos e apresentar perfis moleculares diferentes, sendo imprevisível a variação da resposta às terapias prescritas (JAIN, 2009). As anormalidades cromossômicas não aleatórias, tais como, deleções e translocações são identificadas em cerca de 52% dos pacientes

primários de leucemia mieloide aguda (LMA) e foram reconhecidos como eventos genéticos que promovem esta doença (BYRD et al., 2002).

Entre os tipos de câncer infanto-juvenil, a leucemia é o mais comum na maioria das populações (cerca de 25% a 35%) em todo o mundo (INCA, 2016). Para o Brasil, estimam-se 5.940 casos novos de leucemia em homens e 4.860 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5.75 casos novos a cada 100 mil homens e 4.56 casos novos para cada 100 mil mulheres, ocupando a nona e a décima posições, respectivamente. No Brasil, ocorreram, em 2015, 3.692 óbitos por leucemia em homens e 3.145 em mulheres (INCA, 2017).

A leucemia é uma enfermidade onde os glóbulos brancos produzidos geralmente são numerosos e são anormais, o que significa que eles não podem defender eficazmente o corpo de doenças, patógenos ou substâncias estranhas. Os tipos de glóbulos brancos afetados, linfóides ou mielóides, pode identificar o tipo de leucemia (GREAVES, 1997; SWIERZEWSKI, 1999), essa também pode ser aguda ou crônica, dependendo da velocidade de sua evolução, dessa forma, o prognóstico da leucemia depende do tipo de célula sanguínea afetada e se a leucemia é aguda ou crônica (INCA, 2017).

A leucemia linfocítica se refere ao crescimento celular anormal nas células da medula que se tornam linfócitos. Na mieloide, o crescimento celular anormal ocorre nas células da medula que amadurecem nos glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas (VOGEL; FISHER, 1993). Há, pelo menos, quatro grandes classificações de leucemia: linfocítica aguda (LLA), mieloide aguda (LMA), linfocítica crônica (LLC) e mieloide crônica (LMC) (SZCZEPAŃSKI et al., 2003; DAVIS; VIERA; MEAD, 2014). A LLA apresenta características específicas para adultos e para crianças, sendo mais comum em crianças, sendo que a LMA, LLC e LMC são mais diagnosticados em adultos e raramente ocorrem em crianças (INCA, 2017), a LLC é a leucemia mais comum nos países ocidentais, ocorre geralmente em pacientes idosos e possui um curso clínico altamente variável (HALLEK, 2015).

As terapias mais comuns administradas na leucemia envolvem quimioterapia multiagente com vincristina, corticosteróides e uma antraciclina, radioterapia, transplante de células-tronco e imunoterapia com interferon. Os pacientes idosos, geralmente, não conseguem tolerar tais regimes e apresentam um prognóstico, particularmente, ruim (SWIERZEWSKI, 1999; PUI; EVANS, 2006; INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013). As taxas de sobrevivência da LLA melhoraram dramaticamente nas últimas quatro décadas, mas variam significativamente com a idade. Crianças tratadas em protocolos modernos têm taxas de sobrevivência superiores a 90% (VORA et al., 2013; VORA et al., 2014). Em contraste, a

sobrevivência da LLA adulta é de aproximadamente 40% para os pacientes com idade entre 25 e 59 anos e é significativamente menor (<20%) para os idosos (MOORMAN et al., 2010; SIVE et al., 2012).

A Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), constitui aproximadamente 10-15% de todos os casos de LMA em países latino-americanos, trata-se de uma patologia hemato-oncológica rara, estima-se uma incidência anual de LPA em 0,23 por 100.000 pessoas no mundo, apresentando maior prevalência na fase adulta com uma idade média de diagnóstico aos 44 anos (YIN; MEDEIROS; BUESO-RAMOS, 2010; PARK et al., 2011). A LPA se destaca por ser o tipo mais agressivo de LMA, detentora do pior prognóstico, (LO-COCO; CICONI, 2011; LI et al., 2014; WATTS; TALLMAN, 2014), porém, a introdução de terapias com ação direta na lesão molecular, como ATRA (Ácido Trans-Retinóico) e o ATO (Trióxido de Arsênio), demonstrou relevância na terapêutica dirigida ao alvo molecular, fruto da indução de diferenciação e apoptose (RICE; DE THÉ, 2014; CULL; ALTMAN, 2014).

Os efeitos secundários da quimioterapia utilizada na LPA, entretanto, são significativos, como citopenias, neutropenia febril e toxicidade cardíaca tardia (STEIN; TALLMAN, 2012; NICHOL et al., 2014; RICE; DE THÉ, 2014). Verifica-se dessa forma, a importância da investigação de desordens hematopoiéticas, as quais, podem ser estudadas em linhagens celulares, a exemplo da leucemia promielocítica humana (HL-60), para a busca de novos compostos naturais com efeitos antitumorais (CHIEN et al., 2017).

3.5 Produtos naturais

A natureza é a melhor fonte de medicamentos (FRANK et al., 2017; KACERGIUS et al., 2017), visto que, a maioria das drogas modernas foram derivadas ou inspiradas de fontes naturais (SCHMIDT; EFFERTH, 2016), uma proporção significativa (> 60%) dos fármacos antineoplásicos que estão em uso clínico e demonstraram eficácia relevante no combate ao câncer se originam de produtos naturais derivados de plantas, organismos marinhos e microrganismos (SEELINGER et al., 2012), a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos baseados em produtos naturais ainda têm sido o foco de inúmeras pesquisas (WRIGHT, 2017).

Os produtos naturais derivados de plantas incluem uma variedade de compostos químicos que foram evolutivamente selecionados por sua capacidade de aumentar a proteção e sobrevivência das plantas, desempenhando um significativo papel na interação destas com o meio ambiente (BRAHMACHARI et al., 2013). Devido a diversas atividades biológicas, as

plantas têm sido amplamente aplicadas na saúde humana como suplemento dietético ou na medicina tradicional há milhares de anos (EKOR, 2014).

Encontrar drogas que atuam em múltiplos caminhos, ou discernir possíveis combinações de drogas, representa um dos principais desafios por entender as redes de sinalização das células humanas e como elas são alteradas em diferentes tipos de câncer (RASK-ANDERSEN et al., 2014), a atividade anticancerígena da maioria dos produtos naturais geralmente atua via regulação da função imunológica, induzindo apoptose ou autofagia, ou inibindo a proliferação celular (RAYAN; RAIYN; FALAH, 2017).

Buscar diferenças moleculares entre as células normais e cancerígenas a fim de atingir especificamente os alvos relacionados ao câncer é de extrema importância, drogas direcionadas são projetadas para eliminar células cancerígenas pela sua ligação ao alvo específico, uma vez que este alvo não está presente nas células normais, espera-se que não exerça efeitos secundários nos tecidos normais (EFFERTH et al., 2017). A heterogeneidade tumoral representa um desafio considerável para a quimioterapia do câncer, uma vez que agrava a efetiva erradicação de todas as células de subpopulações geneticamente e fenotipicamente diferentes. Mesmo poucas células tumorais sobreviventes podem levar a repopulação e tumores refratários (SCHMIDT; EFFERTH, 2016).

Contextualmente, estima-se que quase um terço de todos os cânceres poderia ser evitado por meio de hábitos alimentares adequados e suplementos (MAGALOVA, 1999; LIU, 2013). Entre os candidatos mais promissores estão os fitoquímicos bioativos que demonstram fortes efeitos anticancerígenos (YADAV et al., 2011). Seu consumo diário regular pode reduzir o risco de vários tipos de câncer: pulmão, cólon, mama, colo do útero, esôfago, cavidade oral, cavidade, estômago, bexiga, pâncreas e ovário (BLOCK; PATTERSON; SUGAR, 1992).

Alcaloides, flavonoides, terpenoides, ácidos fenólicos, polissacarídeos, saponinas e outros têm sido documentados como produtos bioativos naturais com potente atividade anticâncer (AVATO et al. 2017; JOSHI; VISHWAKARMA; BHARATE, 2017; MAJUMDER; DAS; SAHA, 2017), tais fitoquímicos demonstram ser importantes reguladores em processos patológicos, especialmente o câncer, aumentando a conscientização sobre a contribuição significativa destes constituintes (BUDISAN et al. 2017). Evidências agregadas sugerem que uma dieta rica em agentes vegetais, incluindo especiarias, tem a capacidade de prevenir a maioria das doenças crônicas (SUNG et al., 2012).

3.5.1 Compostos fitoquímicos: conceito e papel na quimioprevenção do câncer

O termo "fitoquímico" refere-se aos compostos bioativos não-nutrientes presentes na dieta à base de plantas (GONZÁLEZ-VALLINAS et al., 2013), os fitoquímicos fazem parte do metabolismo secundário das plantas, os quais, são responsáveis por manter as funções cruciais para a sobrevivência e aptidão reprodutiva (WÖLL, KIM, EFFERTH, 2013). Muitos fitoquímicos têm potencial para inibir o processo da carcinogênese, interferindo em uma ou várias vias celulares e, portanto, desempenham um papel importante na quimioprevenção do câncer (SURH, 2003; WENG; YEN, 2012).

Atualmente, os fitoquímicos estão sendo classificados de acordo com a origem biossintética dos metabólitos secundários, os três grandes grupos compreendem polifenóis, terpenoides e alcaloides, que contribuem para as propriedades medicinais das plantas e fazem parte da dieta humana para fins nutracêuticos (KAUR et al., 2018), a denominação "nutracêutico" qualifica qualquer substância advinda exclusivamente de alimentos que possua propriedades terapêuticas promissoras para o tratamento de doenças (HARDY, 2000; KALRA, 2003; SHIRZAD et al., 2013; WILDMAN, 2016) .

Os fitoquímicos ainda podem ser categorizados em função da sua estrutura química, origem botânica e propriedades biológicas, existem várias bases de dados específicos para fitoquímicos dietéticos e seus efeitos de promoção da saúde, incluindo classificação pela sua eficácia em estudos pré-clínicos quimiopreventivos (SCALBERT et al., 2011), os grupos de fitoquímicos mais estudados são os compostos fenólicos, carotenoides e compostos organosulfurados (KAPINOVA et al., 2018). Agentes anticancerígenos, em particular fitoquímicos, ajudam na regulação positiva e amplificação de genes apoptóticos em células cancerígenas, seguido por indução de morte celular (KAUR et al., 2018).

Existem basicamente três maneiras pelas quais as células respondem aos efeitos danosos de fatores externos: [1] tolerar danos [2] reparar dano em células normais e [3] induzir a parada do ciclo celular ou apoptose nas células mutadas (GHOSAL; CHEN, 2013; ROOS; THOMAS; KAINA, 2015). O dano ao DNA é comumente induzido por fortes estressores, como agentes oxidantes, que podem estar presentes na comida, ar e água, ou podem se originar de vias metabólicas como disfunção mitocondrial e / ou desregulação das vias de desintoxicação (GOLUBNITSCHAJA, 2007; CEBIOGLU; SCHILD; GOLUBNITSCHAJA, 2013).

A regulação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é fundamental para manter a homeostase celular (CHIKARA et al., 2017), uma vez que, em níveis basais atuam como moléculas sinalizadoras para ativar a proliferação celular, sobrevivência, apoptose,

diferenciação, respostas imunes, motilidade e vias de resposta ao estresse (RHEE, 2006; CHEN et al., 2016; SENA; CHANDEL, 2016), entretanto, o aumento dos níveis de EROs causa injúrias ao DNA, que, se não forem reparados, causam mutações e promovem a carcinogênese (NOONAN et al., 2008).

Como uma forma de defesa, as células geralmente se direcionam a autodestruição na forma de apoptose para eliminar células com dano irreparável ao DNA (BHONDE et al., 2006; ROOS; THOMAS; KAINA, 2015). Este processo é regulado por proteínas mediadoras pró-apoptóticas e antiapoptóticas e um equilíbrio sutil deve ser mantido entre estas proteínas e sinais dentro das células (ADAMS; CORY, 2007; DE ALMAGRO; VUCIC, 2012). No entanto, este equilíbrio é desregulado nas células cancerígenas, o que leva as células a retomarem prematuramente a divisão celular, presumivelmente devido a mutações de genes supressores de tumor, evitando a apoptose e, concomitantemente, conduzindo à iniciação da carcinogênese (KUMAR et al., 2016).

O metabolismo celular em tumores está intrinsecamente ligado à produção de EROs, que atua como fator causal na estimulação de proto-oncogenes (WARIS; AHSAN, 2006; REUTER et al., 2010). A atividade inibitória de fitoconstituintes contra oncogenes pode ser alcançada pela redução de sua expressão, inativação ou supressão (WANG et al., 2012). Por outro lado, os fitoquímicos anticâncer mostram efeitos modulatórios nos genes supressores de tumor aumentando sua expressão (FLORA; FERGUSON, 2005). Alguns estudos em animais mostraram efeitos antiproliferativos aparentes de muitos fitoquímicos, diminuindo a expressão de Ki67 em células cancerígenas (KUBATKA et al., 2015; KUBATKA et al., 2016; KUBATKA et al., 2017, KIM et al., 2014). O Ki67 é considerado como um bom marcador tumoral presente nas células em crescimento e em divisão (CSERNI et al., 2014).

Em comparação com as células normais, as células cancerígenas apresentam os níveis de EROs aumentados (WANG; YI, 2008), tais condições não são prejudiciais às células tumorais, uma vez que contam com um sistema antioxidante endógeno robusto que atenua o estresse oxidativo para proliferar (MITTLER, 2017). Em células normais as vias de reparo do DNA podem ser induzidas por agentes terapêuticos que ajudam a neutralizar as condições de estresse, por outro lado, a exposição de células cancerígenas a fitoquímicos induz uma resposta sustentada ao dano ao DNA que pode levar à morte celular por apoptose (RAJEMDRAN et al., 2011; AZQUETA; COLLINS, 2016).

Dessa forma, tanto o reparo do DNA como os mecanismos de dano podem ser desencadeados por fitoquímicos, dependendo da estabilidade genômica dentro das células, que também é responsável pelo direcionamento seletivo de células cancerígenas por agentes

quimiopreventivos (KELLY et al., 2001; AZQUETA; COLLINS, 2016). A supressão de EROs utilizando fitoquímicos é crucial para a quimioprevenção do câncer, e ao mesmo tempo, também foram reconhecidos como agentes indutores de EROs em uma ampla variedade de células cancerígenas (WANG; YI, 2008).

3.5.2 Compostos Fenólicos: propriedade antioxidante e pró-oxidante

Dentre os fitoquímicos, os polifenóis são conhecidos por demonstrarem capacidade como moduladores redox (ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014), nas plantas, atuam como mecanismos de defesa (patógenos, parasitas e predadores); atrativos (polinizadores e animais dispersores de sementes); protetores (UV, flutuações temperatura); além de contribuir na coloração (LIU, 2004; DEL RIO et al., 2012). Os compostos fenólicos são geralmente classificados como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos (LIU, 2004), mais de 10.000 polifenóis já foram identificados, são compostos que contêm um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um grupo hidroxila, seu comportamento como antioxidante ou pró-oxidante depende do microambiente e da demanda de EROs já presentes nas células (FRANCO et al., 2008; ARULSELVAN et al., 2016).

A superprodução de radicais livres em humanos pode gerar estresse oxidativo e causar sérios danos a biomoléculas de células e tecidos, resultando em várias doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, obesidade, câncer e diabetes (ZHANG et al., 2015). Muitos estudos mostraram que a ingestão de alimentos ricos em fitoquímicos antioxidantes, levaria à redução do risco de doenças crônicas (KIM et al., 2013; MUNIRAH et al., 2012).

Os polifenóis derivados da dieta, através de suas propriedades antioxidantes, mostraram efeitos quimiopreventivos promissores em uma ampla variedade de tipos de câncer, além de apresentarem toxicidade mínima para o tecido saudável, tornando-os agentes quimiopreventivos ideais. Ao mesmo tempo, vários fitoquímicos exercem efeitos antiproliferativos, antimigratórios e anti-invasivos nas células cancerígenas e pode ser considerado como terapia adjuvante no câncer (CHIKARA et al., 2017).

Células normais apresentam concentração equilibrada de EROs, as quais são necessárias para atividades metabólicas, entretanto, fontes extrínsecas de EROs podem causar estresse oxidativo que pode danificar as células, dessa forma, fitoconstituintes atuam como antioxidantes em células normais para protegê-los dos efeitos prejudiciais de fatores externos (ARULSELVAN et al., 2016).

De forma contrária, as células cancerígenas já apresentam níveis elevados de EROs (particularmente H_2O_2), e são adaptadas para viver sob estas condições. Alguns fitoquímicos perturbam ainda mais esse equilíbrio, aumentando a quantidade de EROs para níveis letais, levando à ativação de várias vias e à apoptose em células cancerígenas. Alguns antioxidantes fenólicos atuam como pró-oxidantes em certas circunstâncias (pH elevado com altas concentrações de íons de metais de transição e O_2) que favorecem o início de seu processo de auto-oxidação (YORDI et al., 2012).

Dados crescentes sugerem que, em pequenas quantidades, os polifenóis podem exercer atividade farmacológica a nível celular, apresentando potencial para modular cascatas de sinalização, afetar a expressão gênica, interagir com mitocôndrias e induzir enzimas antioxidantes, além de inibir a expressão de enzimas envolvidas na geração de radicais livres (JAYASENA et al., 2013).

3.5.3 Ervas e especiarias

Especiarias são derivadas de qualquer parte de uma planta (raiz, caule, bulbo, casca, sementes), exceto folha, por outro lado, as ervas são oriundas do material folhoso, a parte frondosa da planta, em alguns casos, ervas e especiarias podem vir da mesma planta. A American Spice Trade Association (ASTA) utiliza o termo especiaria de forma abrangente para três categorias: sementes aromáticas, especiarias e ervas. Especiarias e ervas são ricas fontes de compostos fitoquímicos, muitos dos quais são biologicamente ativos com efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais (DINI, 2018).

A evidência mais antiga do uso de especiarias pelos seres humanos remonta a 5000 aC, e até hoje suas atividades biológicas têm sido extensivamente estudadas (SUNG et al., 2012). “Especiaria” tem origem na palavra latina “*species*”, que significa uma mercadoria de distinção ou valor especial (VAN DER VEEN; MORALES, 2015). Especiarias têm sido amplamente utilizadas desde os tempos antigos como meio de medicamento, agente corante, agente aromatizante e conservante (KUNNUMAKKARA et al., 2018).

Investigações científicas sobre os efeitos das especiarias na saúde humana resultaram em um grande corpo de informações na literatura mencionando suas conexões diretas ou indiretas na promoção da saúde e atuação em patologias, além do uso alimentício, os sistemas medicinais tradicionais também defendem o papel das especiarias como agentes terapêuticos (SRINIVASAN, 2005a; YASHIN et al., 2017). Nas últimas décadas, a comunidade científica está se concentrando na validação de medicamentos à base de ervas e especiarias no

desenvolvimento de novas drogas a partir desses arsenais terapêuticos naturais (BENZIE; WACHTEL-GALOR, 2011), mais de 182 nutracêuticos derivados de especiarias já foram bem documentados (AGGARWAL et al., 2009).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos relata que o consumo de especiarias no mercado Americano aumentou exponencialmente ao longo do último meio século, sobretudo, especiarias como gengibre e pimenta, estas vêm sendo usadas com mais frequência (SRINIVASAN, 2005b; BARNES; BLOOM; NAHIN, 2007; CLARKE et al., 2015).

À medida que as pessoas estão considerando o uso de especiarias para uso medicinal e terapêutico, especialmente para remediar várias condições crônicas, reduzir os sintomas da doença e ajudar no tratamento e tratamento de problemas de saúde comuns, é prudente examinar as percepções dos consumidores sobre as especiarias, considerando sua utilidade, eficácia, doses, toxicidade e preditores de utilização (BAILEY et al., 2013; CLARKE et al., 2015; SU; LI, 2011; BLACK et al., 2015).

Dentre as especiarias (extratos / constituintes) com efeitos anticarcinogênicos conhecidos em modelos animais, o gengibre se destaca por atuar através de vários mecanismos para fornecer proteção contra o câncer, além de conter várias biomoléculas naturais lipossolúveis que podem proteger contra o estresse oxidativo e a inflamação, ambos, fatores de risco para a iniciação e promoção do câncer (AGGARWAL et al., 2008; KAEFER; MILNER, 2008). Atualmente, as especiarias tornaram-se parte integrante de diversas etnias em todo o mundo. A noção de que as especiarias podem prevenir doenças e enfermidades ganhou reconhecimento global, além disso, esses produtos são menos caros, relativamente seguros e mais disponíveis do que os medicamentos convencionais (SREEDHAR; LI; ZHAO, 2018).

3.5.3.1 Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)

O Brasil é um dos países com vegetação mais diversa, apresenta aproximadamente 46.096 espécies diferentes de plantas em mais de nove ecossistemas (DO BRASIL, 2015). Plantas e produtos derivados têm sido utilizados ao longo da história para fins medicinais, onde, além do valor nutricional derivado de macro e micronutrientes, as plantas também contêm fitoquímicos (SAXENA et al., 2013), compostos biologicamente ativos que podem trazer potenciais benefícios à saúde, especialmente na quimioprevenção do câncer (AFAQ; KATIYAR, 2011), muitos dos medicamentos atuais são advindos de plantas ou seus derivados (KINGHORN et al., 2011 ; NEWMAN; CRAGG, 2012).

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (**Figura 7 A-B**) é uma planta perene herbácea da família *Zingiberaceae*, que pode atingir de trinta centímetros até um pouco mais de um metro de altura (RAVINDRAN; BABU, 2005), o rizoma é utilizado como especiaria em todo o mundo pela sua pungência especial e aroma típico (ATTOKARAN, 2017), embora seja nativa da Ásia, é cultivada na África, Índia e outras regiões tropicais (SINGLETARY, 2010), sendo uma planta historicamente utilizada na medicina complementar e alternativa (ALI et al., 2008). No Brasil, a cultura de gengibre tem grande importância, não somente para o consumo da população local, em função de seu emprego alimentar, industrial e medicinal, como também para a exportação, destinada a países ocidentais (ELPO; NEGRELLE; RUCKER, 2008).

Figura 7 - Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (A); rizoma (B)



Fonte: Dos autores.

O rizoma do gengibre cresce horizontalmente e sua membrana externa pode variar entre a coloração amarela e marrom, apresenta corpo alongado, pouco achatado, com ramos fragmentados irregularmente, de 3 a 16 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e 2 cm de espessura. O gengibre apresenta aroma atraente com sabor picante e pungência característica (PHARMACOPOEIA, 1993; ARABLOU; ARYAEIAN, 2014), embora os rizomas cresçam subterrâneos, não são considerados raízes, e sim hastes inchadas (RAVINDRAN; BABU, 2005). O gengibre é utilizado na medicina tradicional desde a antiguidade (> 2.500 anos) para tratar diferentes doenças, observa-se o interesse constante por esta especiaria medicinal, assim

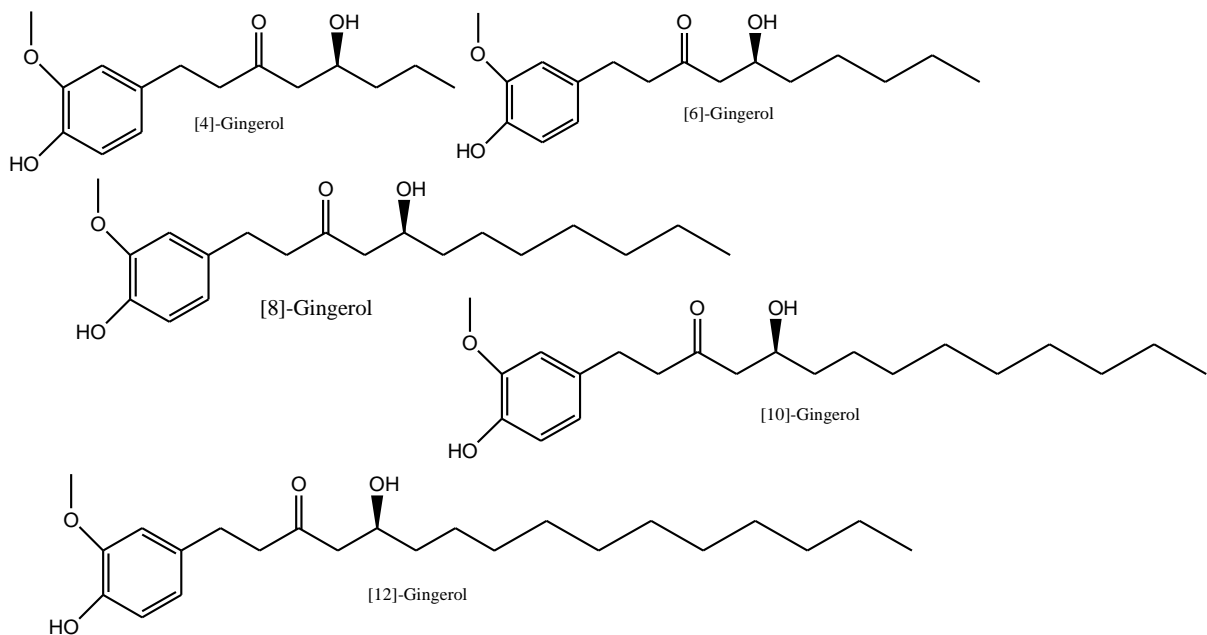
como, investigações envolvendo o isolamento e identificação dos constituintes bioativos, validação experimental, ações farmacológicas e toxicológicas do rizoma (ALI et al. 2008).

3.5.3.2 Principais bioativos do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)

O gengibre é um dos exemplos de "superalimentos", bastante consumido como condimento na cozinha tradicional asiática e européia, é uma especiaria bem conhecida em muitos países, sendo ainda amplamente utilizada como agente aromatizante em alimentos, bebidas e fragrância em cosméticos (GRZANNA; LINDMARK; FRONDOZA, 2005; ALI et al., 2008). Vários compostos ativos foram identificados e sintetizados a partir do gengibre, a análise química do rizoma aponta mais de 400 compostos biológicos (DEMIN; YINGYING, 2010).

Dentre os componentes funcionais existentes no rizoma, observa-se uma excelente fonte de constituintes biologicamente ativos (gingerol, shogaol, paradol e zingerone), os gingeróis em altas temperaturas sofrem desidratação e se transformam nos shogaios, estes últimos quando sofrem hidrogenação, formam o paradol (JOLAD et al., 2004; JOLAD et al., 2005). Os gingeróis foram identificados como os principais constituintes ativos presentes no rizoma *in natura*, estes diferem entre si pelo comprimento de suas cadeias laterais alquila não ramificadas [4]-, [6]-, [8]-, [10]- e [12]-gingerol (**Figura 8**), nesta série de fenólicos aromáticos com característica pungente, o [6]-Gingerol ((S)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3metoxifenol)-3-decanona) (6-G), é a forma mais identificada no rizoma *in natura*, o qual se apresenta como o principal composto majoritário (ALI et al. 2008; LIM, 2016; BERNARD; MCCONNERY; HOSKIN, 2017; SAMAD et al., 2017). A maioria das pesquisas sobre as atividades anticâncer dos gingeróis têm se concentrado no [6] - G (BERNARD; MCCONNERY; HOSKIN, 2017).

Figura 8 - Estrutura química dos principais gingeróis presentes no rizoma de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe).

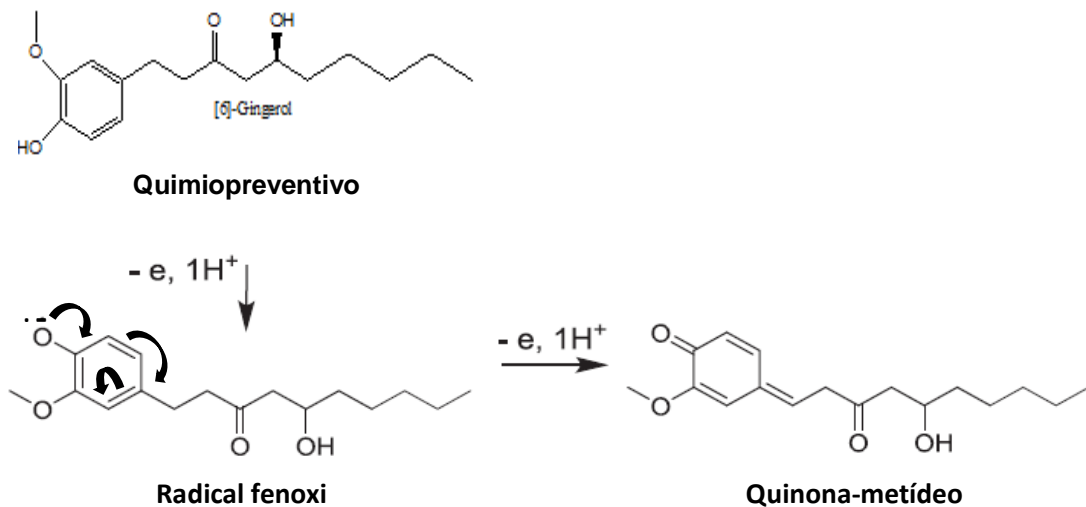


Fonte: Dos autores.

O [6]-G é apontado como sendo um excelente estabilizador do radical hidroxil (OH^\bullet) por meio da transferência de hidrogênio (TIWARI; MISHRA, 2016), o OH^\bullet é altamente reativo e desempenha um papel importante em várias reações que levam a modificações de bases de DNA, proteínas e lipídios presentes no corpo humano e em outros sistemas biológicos (HUSSAIN; HOFSETH; HARRIS, 2003; WHITE et al., 2003; JENA; MISHRA, 2005), podendo alterar qualquer estrutura celular próxima, importante frisar que o H_2O_2 , presente em níveis elevados nas células tumorais, apesar de não ser um radical livre, participa da reação de geração do OH^\bullet por meio da reação do H_2O_2 com os íons de ferro e/ou cobre (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; YORDI et al., 2012).

Na medida em que os gingeróis e seus derivados neutralizam radicais livres, tornam-se metabolicamente instáveis e facilmente oxidados em radical fenoxi, quinona-metídeo ou quinona (**Figura 9**) (GAN et al., 2013; MASON; THOMPSON, 2014).

Figura 9 - Reação de transformação do [6]-Gingerol por oxidação.



Fonte: Adaptado de DIETZ et al, 2016

As quinonas são frequentemente formadas a partir de precursores fenólicos, uma vez que são produtos da oxidação fenólica (BOLTON et al., 2000) que, participam de ciclos redox enzimáticos e/ou não-enzimáticos (SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016), e podem gerar EROs que levam a danos celulares e indução apoptótica, tais características são de extrema importância para potenciais agentes antitumorais (BOLTON et al., 2000; VALDERRAMA et al., 2008).

3.5.3.3 Propriedades funcionais do [6] – Gingerol ([6]-G)

Estudos experimentais (*in vivo*, *in vitro*) e clínicos, acerca do emprego do [6]-G frente a processos tumorigênicos, oxidativos e inflamatórios associados ao surgimento e progressão da carcinogênese, aponta relevantes ações do [6]-G (DE LIMA et al., 2018), como efeitos antioxidantes (LEE et al., 2011; LI et al., 2017), anti-inflamatórios (FAN; YANG; BI, 2015), antiproliferativos (LIN; LIN; TSAY, 2012), antitumorais (RASTOGI et al., 2014; ZHANG et al., 2017) e anti-invasivos (LEE et al., 2008) em enfermidades crônicas e carcinomas. O [6]-G também demonstrou apresentar efeito hipoglicemiante (PRIYA et al., 2010), antiemético (QIAN et al., 2016), neuroprotetor (JEONG et al., 2013; KIM et al., 2018), cardioprotetor (WANG et al., 2016), gastroprotetor (ZHU et al., 2017) e antimicrobiano (KIM et al., 2015; LEE et al., 2018).

LEE et al., 2011, ao avaliarem o efeito antioxidante do [6]-G em linhagem humana de neuroblasto (SHSY5Y) exposta ao peptídeo β -amiloide ($A\beta_{25-35}$), marcador neuropatológico para a doença de *Alzheimer*, evidenciaram que o pré-tratamento com [6]-G reduziu significativamente a citotoxicidade induzida por $A\beta_{25-35}$, além da redução dos níveis de malondialdeído (MDA), EROs, peroxinitrito ($ONOO^-$) e aumento de glutathiona (GSH) intracelular. LI et al., 2017, ao avaliarem ratos *Sprague-Dawley* com reperfusão isquêmica intestinal, observaram que o pré-tratamento com [6]-G demonstrou prevenção contra lesões intestinais, diminuição do nível de peroxidação lipídica (MDA) e regulação da diminuição dos biomarcadores com capacidade antioxidante (SOD, GSH e GSHPx), sugerindo supressão do estresse oxidativo.

Em células de hepatócito (HuH7) humano o [6]-G indicou proteger contra danos inflamatórios induzidos por $IL1\beta$, uma vez que observou-se diminuição dos níveis dos fatores $IL6$, $IL8$, SAA1 e inibição da via EROs/NF- κ B/COX-2 (LI et al., 2013). O [6]-G apresentou ainda modulação na produção de $IL-6$ em osteoblasto (MG-63) humano, fato que sugere impacto significativo na osteogênese, o $TNF-\alpha$ aumentou 25 vezes o nível de $IL-6$ em células MG-63, enquanto o tratamento com [6]-G reprimiu significativamente a elevação da $IL-6$ induzida por $TNF-\alpha$ em células MG-63 (FAN; YANG; BI, 2015).

O tratamento de células tumorais mamárias MDA-MB-231 empregando [6]-G levou a uma diminuição na migração e motilidade celular, ocorrendo de forma dependente da concentração, verificou-se ainda, que a atividade das metaloproteinases de matriz (MMP2/MMP9) apontadas como possíveis mediadores de invasão e metástase em cânceres foram diminuídas durante tratamento com [6]-G em células MDA-MB-231 (LEE et al., 2008).

Linhagens tumorais de cólon humano (LoVo) ao serem tratadas com [6]-G demonstraram redução significativa da viabilidade celular e, observou-se diminuição dos níveis de ciclina (A, B1) e CDK1, em contraste, ocorreu aumento dos reguladores negativos de ciclo celular $p27^{Kip1}$ e $p21^{Cip1}$, levando a parada do ciclo na fase G2/M, e elevação dos níveis de EROs intracelular e fosforilação de p53, sugerindo assim que [6]-G poderia promover efeitos benéficos no tratamento do câncer de cólon (LIN; LIN; TSAY, 2012). ZHANG et al. (2017), verificaram após tratamento de células Hela com [6]-Gingerol, aumento da taxa de parada celular na fase G0-G1, redução da expressão de ciclinas (A, D1, E1), relatou-se a indução de apoptose por aumento da proporção Bax:Bcl2, libertação de citocromo c, clivagem de caspase 3, 8, 9 e PARP em células tratadas.

RASTOGI et al. (2014) ao avaliarem as ações do [6]-G verificaram atividade da caspase 3 em células tratadas com [6]-G com aumento 3 (três) vezes maior entre as linhagens de

leucemia mieloide crônica (K562, LAMA84, JURLMK1) e aguda (U937, HL-60, NB4) quando comparadas a células mononucleadas de sangue periférico (PBMCs) normais, sugerindo que [6]-G poupou PBMCs saudáveis. O [6]-G ainda demonstrou indução na geração de EROs mitocondrial nas linhagens leucêmicas crônica (K562) e aguda (U937), levando a interrupção do ciclo em G2/M, além da diminuição da expressão das proteínas (ciclina B1, Cdk1, Cdc25B e Cdc25C), associadas as fases do ciclo.

PRIYA et al. (2010), verificaram ação do [6]-Gingerol na inibição de enzimas relevantes para o diabetes tipo 2, como a α -glucosidase e α -amilase, sendo relatado também por SEKIYA; OHTANI; KUSANO, (2004), aumento da captação de glicose em adipócitos responsivos a insulina após exposição ao [6]-Gingerol. Evidências indicam ainda, efeitos na redução lipídica, e consequente aumento da sensibilidade à insulina em ratos *Sprague-Dawley* diabéticos (ZHANG; TAN, 2000; SHANMUGAM et al., 2009).

Em pesquisa realizada por QIAN et al. (2016), o gingerol demonstrou eficácia a êmese induzida pelo antineoplásico cisplatina (3mg.Kg^{-1}) em ratos Wistar, por meio da inibição do aumento da dopamina (DA), receptor da dopamina (D2R) e tirosina hidroxilase, verificando-se efeitos na homeostase da transmissão da DA, estudos prévios também indicaram a ação antiemética do gingerol na inibição do vômito induzido por cisplatina (QIAN et al., 2009; QIAN et al., 2010).

O gingerol demonstrou efeito neuroprotetor na prevenção da neurotoxicidade mitocondrial de células neuronais expostas ao fragmento de proteína priônica (PrP) [PrP (106-126)], através da regulação da ativação do fator 1α (HIF- 1α) induzido por hipóxia (JEONG et al., 2013), o HIF-1 é um heterodímero envolvido na regulação do metabolismo do ferro, angiogênese e sobrevivência celular (MADAN; VARMA; COHEN, 2002; KE; COSTA, 2006), além de regular a expressão da proteína priônica para proteger os neurônios (JEONG et al., 2012). Em estudo realizado por KIM et al. (2018), o [6]-Gingerol demonstrou potenciais preventivos e / ou terapêuticos no manejo do déficit de memória e no comprometimento cognitivo em camundongos C57BL/6 com amnésia, após indução por escopolamina.

WANG et al. (2016) ao avaliarem o efeito protetor do [6]-Gingerol frente à apoptose induzida por peróxido de hidrogênio em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), verificaram aumento da expressão de Bcl-2 e redução do percentual de EROs promovida pelo agente estressor, sugerindo ser benéfico na prevenção da aterosclerose.

Estudos pré-clínicos demonstraram que os constituintes do gengibre melhoram a ulceração gástrica induzida por aspirina diária em baixa dose, ZHU et al. (2017), observaram que o [6]-G exerceu atividade anticancerígenas *in vitro* em células de câncer de cólon

humano (HCT-116; HT-29), efeitos gastroprotetores em camundongos CF1, reduzindo a lesão estomacal e inibição da expressão de ciclo-oxigenases COX-1 e COX-2.

Ao ser avaliada a ação antimicrobiana do 6-gingerol, verificou-se inibição da formação de biofilmes e redução dos fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (KIM et al., 2015; LEE et al., 2018), assim como, eficácia contra a intoxicação desencadeada pela toxina do *Vibrio cholerae* (SAHA; DAS; CHAUDHURI, 2013).

3.6 Biomarcadores toxicogênicos

3.6.1 Bioensaio de toxicidade em *Artemia salina*

O bioensaio em *Artemia salina* trata-se de um sistema teste amplamente utilizado para avaliar a toxicidade de diversas substâncias (BARAVALLIA et al., 2012), pode ser empregado como teste preliminar devido ao manuseio simples, rápido e disponibilidade comercial dos cistos, sendo ainda favorecido pela tolerância a temperatura, salinidade e alta reprodutibilidade, bastante usado para testar extratos de plantas e compostos orgânicos, onde, na maioria dos casos, correlacionam-se razoavelmente bem com as propriedades citotóxicas, antitumorais e testes de toxicidade aguda oral *in vivo* (MCLAUGHLIN; ROGERS; ANDERSON, 1998; PARRA et al., 2001; NUNES et al., 2006; ÖZÇELIK; KARTAL; ORHAN, 2011; ARCANJO et al., 2012).

A *A. salina* é um organismo regulador hipo / hiper-osmótico capaz de manter a regulação osmótica dentro de limites estreitos sobre uma gama de salinidade externa de NaCl a 0,26% em ambientes supersaturados (ATES et al., 2013). Na regulação osmótica, normalmente a pressão osmótica no organismo é mais baixa que no meio, contudo, se a salinidade do meio aumenta, a presença de hemolinfa na *A. salina* também aumenta o que permite um aumento da atividade respiratória e uma troca de água ativa entre o organismo e o meio, levando a uma maior excreção de sais (AMAT et al., 2007). Existe uma tendência para usar o ensaio de em testes toxicológicos que exibem um grande número de substâncias, incluindo extratos, drogas e produtos químicos (SANGIAN et al., 2013), o dicromato de potássio é bastante utilizado como controle positivo por ser um agente oxidante forte (WILBUR, 2000) e desmodulador do inibidor da absorção de aminoácidos, sendo observada inibição da síntese de macromoléculas em *A. salina* (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

A *A. salina* como um organismo filtrador, é capaz de filtrar todo o material dissolvido em suspensão que tenha um tamanho máximo de 50 µm (AMAT et al., 2007), apresentando-se

como um teste apropriado para determinar da concentração mínima capaz de ocasionar efeitos tóxicos e citotóxicos ao material genético (ÖZKARA et al., 2015; ROSA et al., 2016), o ensaio de letalidade para os náuplios de *A. salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com o isolamento, purificação e elucidação estrutural de substâncias naturais e sintéticas (RUIZ et al., 2005), sendo capaz de determinar valores de concentração letal média (CL50), em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (MEYER et al., 1982).

3.6.2 Ensaio *Allium cepa*

O *Allium cepa* é um bioensaio importante para avaliação dos efeitos citogenotóxicos de agentes farmacêuticos, ambientais e bioquímicos, que podem afetar o material genético (ÖZKARA et al., 2015), a facilidade de crescimento, ampla disponibilidade, plasticidade genômica, baixo custo e fácil manuseio faz do *A. cepa* um organismo com características ideais para a triagem de agentes citotóxicos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009), diferentes parâmetros como taxa de crescimento da raiz, índice mitótico e anormalidades cromossômicas podem ser usados para estimar toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade (KOMAREK et al., 2010), a análise do ciclo celular permite determinar a atividade citotóxica de compostos pela frequência da divisão celular (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

Devido sensibilidade do teste *A. cepa*, este modelo demonstra ser excelente para avaliar a citotoxicidade *in vivo* (FISKESJÖ, 1997), dentre os parâmetros avaliados, a inibição do crescimento radicular é um importante indicador de toxicidade (AHUJA et al., 2015; GOUDA; SAAD; ABDELGALEIL, 2016). O índice mitótico (IM), o qual mede o número de células presentes na fase M do ciclo celular e é um parâmetro confiável para estimar a frequência da divisão celular (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007), pesquisas indicam que o sulfato de cobre inibe o processo de divisão celular de células meristemáticas do *A. cepa*, e dessa forma é bastante utilizado como controle positivo (YILDIZ et al., 2009).

A redução do IM pode ser devido ao aprisionamento de uma ou mais fases mitóticas ou ao abrandamento da taxa de progressão celular (YUET-PING et al., 2012), esta redução pode ser associada à ação mitodepressiva da substância teste, interferindo no ciclo celular normal (SHARMA; VIG, 2012). Uma redução de 50% no IM quando comparado ao controle negativo é um valor limitante: redução <50% induz um efeito subletal e <22% causa um efeito letal (MESI; KOPLIKU, 2013).

A determinação da frequência de aberrações cromossômicas (CA) e de micronúcleos (MN), durante a mitose em células meristemáticas de *A. cepa*, consiste em um método fácil para determinar a atividade genotóxica e mutagênica de vários compostos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SOUZA et al., 2013; MAZZEO et al., 2015). As aberrações cromossômicas são indicativas de genotoxicidade (RANK; NIELSEN, 1998), enquanto que na avaliação mutagênica, os micronúcleos são indicadores mais efetivos e simples de danos citológicos (MA et al., 1995), visto que tanto os fragmentos quanto cromossomos inteiros podem ser reincorporados no núcleo principal durante o ciclo celular (FENECH et al., 2002).

3.6.3 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazólio)) tornou-se o padrão ouro para a determinação da viabilidade e proliferação celular desde o seu desenvolvimento por Mosmann em 1980 's (MOSMANN, 1983), o primeiro relatório sobre a aplicação do MTT na estimativa da viabilidade de células metabolicamente ativas descreveu a possível avaliação da resposta de linhagens celulares de mamíferos aos compostos citotóxicos (LIU et al., 1997), sendo posteriormente também utilizado para examinar interações entre compostos (ŚLIWKA et al., 2016).

A metodologia no ensaio MTT foi otimizada para uma linhagem de linfoma de camundongos e seguidamente aplicada por pesquisadores em inúmeras experiências envolvendo células eucarióticas e procarióticas. Por muitos anos, o ensaio MTT foi um dos testes mais comumente realizados em relação a suscetibilidade de células (LIU et al., 1997). Este ensaio mede a viabilidade celular em termos de atividade redutiva, como a conversão enzimática do sal de tetrazólio em cristais de formazan insolúveis em água por desidrogenases (em particular, succinato desidrogenase) presentes nas mitocôndrias de células vivas, entretanto, o MTT também pode ser reduzido por agentes redutores e enzimas localizadas no retículo endoplasmático (STOCKERT et al., 2012), assim como, dentro do citoplasma, na superfície da célula, ou mesmo no ambiente extracelular (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; WANG; HENNING; HEBER, 2010).

Durante o ensaio de MTT, o sal amarelo solúvel em água é reduzido a formazan roxo, insolúvel em água. O ensaio geralmente requer uma etapa final para extração do formazan com um solvente orgânico (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; STOCKERT et al., 2012). Os cristais de formazan são solúveis em uma variedade de solventes orgânicos comuns, como o isopropanol, DMSO ou mesmo o óleo mineral (TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987;

CARMICHAEL et al., 1987). Devido à coloração produzida, a redução enzimática do MTT pode ser usada para observações microscópicas de células vivas (KIM et al., 2007), a possibilidade de utilizar micropalcos e leitura automatizada na análise simultânea de numerosas amostras traz vantagens significativas em termos de tempo e custo (CARMICHAEL et al., 1987).

3.6.4 Ensaio Cometa

O ensaio Cometa também conhecido como Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE) ou Single-Cell Gel (SCG) é uma técnica útil para o estudo de danos e reparos ao DNA (SINGH et al., 1988; SPEIT; HARTMANN, 1999), sendo extensivamente utilizado como uma ferramenta básica em diversas pesquisas, incluindo biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo ao DNA, ecotoxicologia genética, genotoxicidade de novos produtos químicos e/ou naturais, monitoramento de doenças genéticas, danos oxidativos (GONTIJO; TICE, 2003; GANAPATHY et al., 2016), além de avaliar protocolos terapêuticos para mensuração do potencial genotóxico de drogas isoladas ou em associação (CASH et al., 2014).

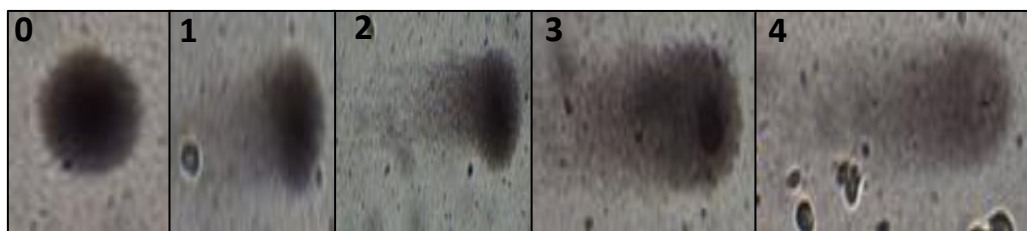
O princípio da técnica é simples: células eucarióticas são incluídas em gel sobre uma lâmina de microscopia, faz-se necessário submeter o material a eletroforese, comumente em condições de pH alcalino, onde durante a transferência da corrente elétrica, o DNA que possui carga negativa, se estiver rompido (clastogênese), migra para fora do núcleo em direção ao ânodo da cuba de eletroforese, ficando com a aparência de um cometa ou cauda, caso o DNA não seja rompido ou quebrado, este fica armazenado no núcleo, sendo muito grande para se deslocar, a corrente elétrica age proporcionando a migração dos segmentos de DNA resultantes de quebras (SINGH et al., 1988; SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Essa técnica pode ser utilizada em uma vasta gama de organismos (humanos, animais, plantas), tanto em culturas *in vitro* com *in vivo*, desde que as amostras possam ser preparadas como suspensão de células únicas (NERI et al., 2015). SINGH et al. (1988), atribuíram maior sensibilidade à técnica com a utilização de solução alcalina. (pH >13,0). Nesse caso, a desnaturação da molécula de DNA detecta quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas e sítios de reparação por excisões incompletas (CASH et al., 2014).

O ensaio cometa é bem conhecido por sua simplicidade, baixo custo, análise estatística robusta, rápida performance, exigência de pequeno número de células por amostra e alta sensibilidade para detectar baixos níveis de danos no DNA (TICE et al., 2000; SILVA;

ERDTMANN; HENRIQUES, 2003; GANAPATHY et al., 2016). As células com dano aumentado no DNA mostram um aumento na migração de DNA cromossomal do núcleo em direção ao ânodo, que se assemelha à forma de um cometa (SPEIT; HARTMANN, 1999). Na pontuação visual, os cometas são classificados em cinco níveis (0 a 4: 0 - sem dano, 1 - dano mínimo, 2 - dano leve, 3 - dano moderado e 4 - dano grave) de acordo com o grau de dano (GANAPATHY et al., 2016).

Figura 10. Classificação dos danos celulares após ensaio cometa.



Fonte: Dos autores.

Células humanas são constantemente atacadas por vários agentes nocivos gerados por processos exógenos e endógenos que levam a danos no DNA. A maioria dos danos é induzida por espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). A análise de danos ao DNA fornece informações importantes sobre os efeitos biológicos precoces de produtos químicos perigosos e informações relevantes sobre os diferentes estágios das doenças, portanto, sendo necessário um método preciso, rápido e sensível para a análise de danos no DNA é altamente exigido (JACKSON; BARTEK, 2009).

Podem ser utilizados no teste vários tipos celulares sem a necessidade de um conhecimento prévio estrutural do cariótipo e genoma, apesar do ensaio cometa detectar apenas danos ao DNA na forma de quebras de cadeia, suas modificações através de vários modelos experimentais, torna-o poderoso na averiguação de danos e/ou reparos (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2015; LANIER et al., 2015). Esse teste tem sido usado em muitos estudos para investigar danos no DNA e reparo em uma em células tumorais com uma variedade de agentes citotóxicos (LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009), a indução de danos ao DNA em células cancerígenas é uma estratégia terapêutica bem reconhecida no tratamento do câncer (OLIVE; DURAND, 2005).

3.6.5 Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese - CBMN

O teste CBMN permite a detecção de várias anormalidades celulares por intervir sobre a etapa final da divisão celular (FENECH, 2007), é um método citogenético desenvolvido inicialmente para cultura de linfócitos humanos e posteriormente adaptado para outros tipos celulares, utilizado para a avaliação de danos ao DNA (micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, brotos nucleares, apoptose e necrose), o qual se baseia na avaliação de células binucleadas, que apresentam uma divisão celular completa com bloqueio de divisão subsequente realizado pela Citocalasina-B (FENECH, 2000; PEJCHAL et al., 2011).

O emprego da Citocalasina-B inibe a polimerização da actina, que é necessário para formação dos microfilamentos que constroem o citoplasma entre os nucléolos filhos durante a citocinese, a adição da Citocalasina-B resulta no acúmulo de células em divisão no estágio binucleado a partir de células que passaram por um ciclo de divisão (DUTTA; GUPTA, 2013). A alta reprodutibilidade e baixo custo da técnica têm colaborado para sua extensa aplicação e adoção desse biomarcador em estudos *in vitro* e *in vivo* de dano ao DNA (BONASSI et al., 2007).

Os micronúcleos (MN) podem ser analisados em células tratadas ou não com bloqueio do processo de citocinese (VALENTE et al., 2017), trata-se de um tipo de dano cromossômico ou anomalia mitótica que possui origem de fragmentos cromossomais ou cromossomos inteiros, devido a lesões do DNA não reparadas ou reparadas erroneamente, ou de erros durante o fuso mitótico com separação malsucedida dos cromossomos. Durante a fase da anáfase da mitose eles não são capazes de interagir com o eixo formado na citocinese e, dessa forma, não são incorporados aos núcleos filhos (FENECH et al., 2011; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

O teste de MN permite detectar a ação de agentes clastogênicos (pequeno micronúcleo) e aneugênicos (grande micronúcleo), os MN apresentam-se envoltos por uma membrana nuclear, sendo caracterizado como um artefato nuclear, pequeno e separado (SISENANDO et al., 2011). Essa técnica ainda permite a exploração de parâmetros de genotoxicidade e cinética de divisão celular como pontes nucleoplasmáticas (PNP) e brotos nucleares (BN) (MILIC et al., 2015). As PNP representam um indicativo de disfunção dos telômeros após ausência de reparo ou quebra dupla do DNA, que gera cromossomos dicêntricos estendidos para polos opostos do fuso mitótico durante a anáfase, levando a formação de uma ponte estreita entre os dois núcleos, já os BN estão associados à amplificação do DNA, e a não segregação do núcleo, são definidos como corpos ligados ao núcleo principal, por uma junção nucleoplasmática fina (FENECH, 2011; PEJCHAL et al., 2011; BITGEN et al., 2016).

O CBMN é um bioindicador importante na avaliação de riscos (VALENTE et al., 2017). A análise da frequência de MN aplicando a metodologia CBMN em linfócitos humanos também pode auxiliar em exames preditivos para problemas na gravidez, risco de câncer e mortalidade por doença cardiovascular (BONASI et al., 2007; FEDERICI et al, 2008; FURNESS et al., 2010), esses eventos podem ser induzidos por estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos na etapa de *checkpoint* do ciclo celular e em genes de reparo do DNA (FENECH, 2002; BONASSI et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- ABDULL, R.; AHMAD, F.; NOOR, N. M. Cruciferous vegetables: dietary phytochemicals for cancer prevention. **Asian Pacific Journal of cancer prevention**, v. 14, n. 3, p. 1565-1570, 2013.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324, 2007.
- AFAQ, F. K.; KATIYAR, S. Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 14, p. 1200-1215, 2011.
- AGGARWAL, B. B.; KUNNUMAKKARA, A. B.; HARIKUMAR, K. B.; THARAKAN, S. T.; SUNG, B., ANAND, P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. **Planta medica**, v. 74, n. 13, p. 1560-1569, 2008.
- AGGARWAL, B. B.; VAN-KUIKEN, M. E.; IYER, L. H.; HARIKUMAR, K. B.; SUNG, B. Molecular targets of nutraceuticals derived from dietary spices: potential role in suppression of inflammation and tumorigenesis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 8, p. 825-849, 2009.
- AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. 425-430, 2009.
- AHUJA, N.; BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K. Herbicidal activity of eugenol towards some grassy and broad-leaved weeds. **Journal of pest science**, v. 88, n. 1, p. 209-218, 2015.
- AKRAM, M.; IQBAL, M.; DANİYAL, M.; KHAN, A. U. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological research**, v. 50, n. 1, p. 33, 2017.
- AKRAM, M.; SIDDIQUI, S. A. Breast cancer management: past, present and evolving. **Indian journal of cancer**, v. 49, n. 3, p. 277, 2012.
- ALBINI, A.; CAVUTO, S.; APOLONE, G.; NOONAN, D. M. Strategies to prevent “bad luck” in cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 10, 2015.
- ALCO, G.; IGDEM, S.; DINCER, M.; OZMEN, V.; SAGLAM, S.; SELAMOGLU, D.; YENICE, S. Vitamin D levels in patients with breast cancer: importance of dressing style. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 3, p. 1357-62, 2014.
- ALEGRE, M. M.; KNOWLES, M. H.; ROBISON, R. A.; O'NEILL, K. L. Mechanics behind breast cancer prevention-focus on obesity, exercise and dietary fat. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 4, p. 2207-2212, 2013.
- ALI, B. H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M. O.; NEMMAR, A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. **Food and chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 409-420, 2008.

ALRAWAIQ, N.; ABDULLAH, A. Dietary phytochemicals activate the redox-sensitive transcription factor Nrf2. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 11-6, 2014.

AMAT, F.; HONTORIA, F.; NAVARRO, J. C.; VIEIRA, N.; MURA, G., Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region. **Limnetica**. v. 26, n. 2, p. 387-404, 2007.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2017. Atlanta: American Cancer Society; 2017. Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html>. 2017. Acesso em: 10/10/2018.

ANGSUTARARUX, P.; LUANPITPONG, S.; ISSARAGRISIL, S. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: overview of the roles of oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, p. 1-13, 2015.

ARABLOU, T.; ARYAEIAN, N. The effect of ginger on glycemia and lipid profile: a brief review. **Razi Journal of Medical Sciences**, v. 21, n. 125, p. 94-103, 2014.

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.

ARUZULLAH, A. M.; CALHOUN, E. A.; WOLF, M.; FINLEY, D. K.; FITZNER, K. A.; HECKINGER, E. A.; GORBY, N. S.; SCHUMOCK, G.T.; BENNETT, C.L. The financial burden of cancer: estimates from a study of insured women with breast cancer. **Journal of Supportive Oncology**, v. 2, n. 3, p. 271-278, 2004.

ARULSELVAN, P.; FARD, M.T.; TAN, W.S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S.S. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

ATES, M.; DANIELS, J.; ARSLAN, Z.; FARAH, I. O. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, n. 4, p. 3339-3348, 2013.

ATTOKARAN, M. "Ginger," in *Natural Food Flavors and Colorants*. vol. 57, p. 209–214, 2017.

AUCHÈRE, F.; SANTOS, R.; PLANAMENTE, S.; LESUISSE, E.; CAMADRO, J. M. Glutathione-dependent redox status of frataxin-deficient cells in a yeast model of Friedreich's ataxia. **Human molecular genetics**, v. 17, n. 18, p. 2790-2802, 2008.

AUGUSTYNIAK, M.; GLADYSZ, M.; DZIEWIĘCKA, M. The Comet assay in Insects - Status, prospects and benefits for science. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 67-76, 2015.

AVATO, P.; MIGONI, D.; ARGENTIERI, M.; TAVA, A.; FANIZZI, F. P. Activity of saponins from medicago species against Hela and MCF-7 cell lines and their capacity to potentiate cisplatin effect. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 17, n. 11, p. 1508-1518, 2017.

AZMI, A. S. Network pharmacology for cancer drug discovery: are we there yet? **Future medicinal chemistry**, v. 4, n. 8, p. 939-941, 2012.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. Polyphenols and DNA damage: a mixed blessing. **Nutrients**, v. 8, n. 12, 2016.

BAILEY, R. L.; GAHCHE, J. J.; MILLER, P. E.; THOMAS, P. R.; DWYER, J. T. Why US adults use dietary supplements. **JAMA internal medicine**, v. 173, n. 5, p. 355-361, 2013.

BAKER S. G. A. cancer theory kerfuffle can lead to new lines of research. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 2, 2015.

BARAVALIA, Y.; VAGHASIYA, Y.; CHANDA, S. Brine shrimp cytotoxicity, anti-inflammatory and analgesic properties of *Woodfordia fruticosa* Kurz flowers. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 11, n. 3, p. 851, 2012.

BARNES, P. M.; BLOOM, B.; NAHIN, R. L. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States. Hyattsville, MD: **National Center for Health Statistics**, n. 12, 2007.

BARRE, P. V.; PADMAJA, G.; SUVASHISA R., Tiamongla. Stress and quality of life in cancer patients: Medical and psychological intervention. **Indian journal of psychological medicine**, v. 40, n. 3, p. 232, 2018.

BARTON, M. B.; KEANE, T. J.; GADALLA, T.; MAKI, E. The effect of treatment time and treatment interruption on tumour control following radical radiotherapy of laryngeal cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 23, n. 3, p. 137-143, 1992.

BENSON, I.; SCHRAG, D.; SOMERFIELD, M.; COHEN, A.; FIGUEREDO, A.; FLYNN, P. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 22, n. 16, p. 3408-3419, 2004.

BENZIE, I. F. F.; WACHTEL-GALOR, S. (Ed.). **Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects**. CRC Press, 2011.

BERNARD, M. M.; MCCONNERY, J. R.; HOSKIN D. W. [10] - Gingerol, a major phenolic constituent of ginger root, induces cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Experimental and molecular pathology**, v. 102, n. 2, p. 370-376, 2017.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, p. 127-152, 2005.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALENCAR, N. M. N.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; CHAVES, J. H.; SILVEIRA, E.

R.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from Piper species. **Journal of Applied Toxicology**, v.28, n.5, p.599-607, 2008.

BHONDE, M. R.; HANSKI, M. L.; NOTTER, M.; GILLISSEN, B. F.; DANIEL, P. T.; ZEITZ, M.; HANSKI, C. Equivalent effect of DNA damage-induced apoptotic cell death or long-term cell cycle arrest on colon carcinoma cell proliferation and tumour growth. **Oncogene**, v. 25, n. 2, p. 165, 2006.

BISSELL, M. J.; HINES, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nature medicine**, v. 17, n. 3, p. 320, 2011.

BITGEN, N.; DONMEZ-ALTUNTAS, H.; BAYRAM, F.; CAKIR, I.; HAMURCU, Z.; DIRI, H.; BASKOL, G.; SENOL, S.; DURAK, A. C. Increased micronucleus, nucleoplasmic bridge, nuclear bud frequency and oxidative DNA damage associated with prolactin levels and pituitary adenoma diameters in patients with prolactinoma. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 91, n. 2, p. 128-136, 2016.

BLACK, L. I.; CLARKE, T. C.; BARNES, P. M.; STUSSMAN, B. J.; NAHIN, R. L. Use of complementary health approaches among children aged 4–17 years in the United States: National Health Interview Survey, 2007–2012. **National health statistics reports**, n. 78, p. 1, 2015.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUGAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-29, 1992.

BOLTON, J. L.; TRUSH, M. A.; PENNING, T. M.; DRYHURST, G.; MONKS, T.J. Role of quinones in toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 13, n. 3, p. 135-160, 2000.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.

BRAHMBHATT, M.; GUNDALA, S. R.; ASIF, G.; SHAMSI, S. A.; ANEJA, R. Ginger phytochemicals exhibit synergy to inhibit prostate cancer cell proliferation. **Nutrition and cancer**, v. 65, n. 2, p. 263-272, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Sistema de informações sobre mortalidade. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 13/09/2017.

BUDISAN, L.; GULEI, D.; ZANOAGA, O. M.; IRIMIE, A. I.; CHIRA, S.; BRAICU, C.; GHERMAN, C. D.; BERINDAN-NEAGOE, I. Dietary intervention by phytochemicals and their role in modulating coding and non-coding genes in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1178, 2017.

BYRD, J. C.; MRÓZEK, K.; DODGE, R. K.; CARROLL, A. J.; EDWARDS, C. G.; ARTHUR, D. C.; PETTENATI, M. J. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients

with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4325-4336, 2002.

CALORINI, L.; BIANCHINI, F. Environmental control of invasiveness and metastatic dissemination of tumor cells: the role of tumor cell-host cell interactions. **Cell Communication and Signaling**, v. 8, n. 1, p. 24, 2010.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer research**, v. 47, n. 4, p. 936-942, 1987.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CASH, S. W.; BERESFORD, S. A. A.; VAUGHAN, T. L.; HEAGERTY, P. J.; BERNSTEIN, L.; WHITE, E.; NEUHOUSER, M. L. Recent physical activity in relation to DNA damage and repair using the comet assay. **Journal of Physical Activity and Health**, v. 11, n.4, p. 770–776, 2014.

CEBIOGLU, M.; SCHILD, H.; GOLUBNITSCHAJA, O. Cancer Predisposition in Diabetic Patients: Risk Assessment and Targeted Preventive Measures. **New Strategies to Advance Pre/Diabetes Care: Integrative Approach by PPPM**. Springer, Dordrecht, p. 355-370, 2013.

CEJALVO, J. M.; DE DUEÑAS, E. M.; GALVÁN, P.; GARCÍA-RECIO, S.; GASIÓN, O. B.; PARÉ, L.; GUERRERO-ZOTANO, Á. Intrinsic subtypes and gene expression profiles in primary and metastatic breast cancer. **Cancer research**, v. 77, n. 9, p. 2213-2221, 2017.

CHEN, X.; SONG, M.; ZHANG, B.; ZHANG, Y. Reactive oxygen species regulate T cell immune response in the tumor microenvironment. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

CHIEN, M. H.; CHOW, J. M.; LEE, W. J.; CHEN, H. Y.; TAN, P.; WEN, Y. C.; LIN, Y. W. Tricetin Induces Apoptosis of Human Leukemic HL-60 Cells through a Reactive Oxygen Species-Mediated c-Jun N-Terminal Kinase Activation Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1-14, 2017.

CHIKARA, S.; NAGAPRASHANTHA, L. D.; SINGHAL, J.; HORNE, D.; AWASTHI, S.; SINGHAL, S. S. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. **Cancer Letters**, v. 413, p. 122-134, 2017.

CLARKE, R.; LIU, M.; BOUKER, K.; GU, Z.; LEE, R.; ZHU, Y. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7316, 2003.

CLARKE, T. C.; BLACK, L. I.; STUSSMAN, B. J.; BARNES, P. M.; NAHIN, R. L. Trends in the use of complementary health approaches among adults: United States, 2002–2012. **National health statistics reports**, n. 79, p. 1, 2015.

COLLINS, J. J.; JAMMER, B.; SLADECZEK, F. M.; BODNAR, C. M.; SALOMON, S. S. Surveillance for angiosarcoma of the liver among vinyl chloride workers. **Journal of Occupational & Environmental Medicine**, v. 56, n.11, p. 1207-1209, 2014.

CSERNI, G.; VÖRÖS, A.; LIEPNIECE-KARELE, I.; BIANCHI, S.; VEZZOSI, V.; GRABAU, D.; ZOLOTA, V. Distribution pattern of the Ki67 labelling index in breast cancer and its implications for choosing cut-off values. **The Breast**, v. 23, n. 3, p. 259-263, 2014.

CULL, E. H.; ALTMAN, J. K. Contemporary treatment of APL. **Current hematologic malignancy reports**, v. 9, n. 2, p. 193-201, 2014.

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. Genética toxicológica. **Porto Alegre: Alcance**, p. 422, 2003.

DAI, X.; LI, T.; BAI, Z.; YANG, Y.; LIU, X.; ZHAN, J.; SHI, B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 10, p. 2929, 2015.

D'AMBROSIO, D. J.; LI, T.; HORWITZ, E. M.; CHEN, D. Y.; POLLACK, A.; BUYYOUNOUSKI, M. K. Does treatment duration affect outcome after radiotherapy for prostate cancer? **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 72, n. 5, p. 1402-1407, 2008.

DAVIS, A. S.; VIERA, A. J.; MEAD, M. D. Leukemia: an overview for primary care. **American Family Physician**, v. 89, n. 9, p. 731-738, 2014.

DE ALMAGRO, M. C.; VUCIC, D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. **Experimental Oncology**, v. 34, n. 3, p. 200-11, 2012.

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.

DE LIMA, R. M. T.; DOS REIS, A. C.; DE MENEZES, A. A. P. M.; SANTOS, J. V. D. O.; FILHO, J. W. G. D. O.; FERREIRA, J. R. D. O.; ALENCAR, M. V. O. B.; MATA, A. M. O. F.; KHAN, I. N.; ISLAM, A.; UDDIN, S. J.; ALI, E. S.; ISLAM, M. T.; TRIPATHI S.; MISHRA, S. K.; MUBARAK, M. S.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. Protective and therapeutic potential of ginger (*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 10, p. 1885-1907, 2018.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 2013.

DEMIN, G.; YINGYING, Z. "Comparative antibacterial activities of crude polysaccharides and flavonoids from *Zingiber officinale* and their extraction," **American Journal of Tropical Medicine**, vol. 5, p. 235-238, 2010.

DEMIR, M. Effects of Laughter Therapy on Anxiety, Stress, Depression and Quality of Life in Cancer Patients. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 7, n. 9, p. 272-273, 2015.

DHANKHAR, R.; VYAS, S. P.; JAIN, A. K.; ARORA, S.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 230-249, 2010.

DIELEMAN, J. L.; BARAL, R.; BIRGER, M.; BUI, A. L.; BULCHIS, A.; CHAPIN, A.; LAVADO, R. US spending on personal health care and public health, 1996-2013. **Jama**, v. 316, n. 24, p. 2627-2646, 2016.

DIETZ, B. M.; HAJIRAHIMKHAN, A.; DUNLAP, T. L.; BOLTON, J. L. Botanicals and their bioactive phytochemicals for women's health. **Pharmacological reviews**, v. 68, n. 4, p. 1026-1073, 2016.

DINI, I. Spices and Herbs as Therapeutic Foods. Food Quality: Balancing Health and Disease. **Handbook of Food Bioengineering**, p. 433-469, 2018.

DO BRASIL, Espécies da Flora. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Rio de Janeiro**, 2015. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 24/08/2018

DOCKERTY, J. D.; SKEGG, D. C. G.; WILLIAMS, S. M. Economic effects of childhood cancer on families. **Journal of paediatrics and child health**, v. 39, n. 4, p. 254-258, 2003.

DOYLE, L. A. Sarcoma classification: an update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. **Cancer**, v. 120, n. 12, p. 1763-1774, 2014.

DUKE, C. C.; HEATHER, A. K. Attenuation of Proinflammatory Responses by S-[6]-Gingerol via Inhibition of ROS/NF-Kappa B/COX2 Activation in HuH7 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 8, 2013.

DUMITRESCU, R. G, COTARLA, I. Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005? **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 9, n. 1, p. 208-221, 2005.

DUTTA, S.; GUPTA, M. L. Alleviation of radiation-induced genomic damage in human peripheral blood lymphocytes by active principles of Podophyllum hexandrum: an in vitro study using chromosomal and CBMN assay. **Mutagenesis**, v. 29, n. 2, p. 139-147, 2014.

EFFERTH, T.; SAEED, M. E.; MIRGHANI, E.; ALIM, A.; YASSIN, Z.; SAEED, E.; KHALID, H. E.; DAAK, S. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 50284, 2017.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 177, 2014.

ELLIS, M.; SUMAN, V.; HOOG, J.; GONCALVES, R.; SANATI, S.; CREIGHTON, C. J. Ki67 proliferation index as a tool for chemotherapy decisions during and after neoadjuvant aromatase inhibitor treatment of breast cancer: results from the American College of Surgeons

- Oncology Group Z1031 Trial (Alliance). **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 10, p. 1061, 2017.
- ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B.; RUCKER, N. G. A. Produção de gengibre no município de Morretes, PR. **Scientia Agraria**, v.8, n. 2, p. 211-217, 2008.
- ENECH, M. Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 63-67, 2011.
- ESPINA, V.; LIOTTA, L. A. What is the malignant nature of human ductal carcinoma in situ? **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 1, p. 68, 2011.
- FAN, J. Z.; YANG, X.; BI, Z. G. The effects of 6-gingerol on proliferation, differentiation, and maturation of osteoblast-like MG-63 cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 7, p. 637-643, 2015.
- FEDERICI, C.; BOTTO, N.; MANFREDI, S.; RIZZA, A.; FIANDRA, M.; ANDREASSI, M. G. Relation of increased chromosomal damage to future adverse cardiac events in patients with known coronary artery disease. **The American journal of cardiology**, v. 102, n. 10, p. 1296-1300, 2008.
- FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v. 181, p. 411-416, 2002.
- FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug discovery today**, v. 7, n. 22, p. 1128-1137, 2002.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.
- FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.
- 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.
- FERREIRA, P. M. P.; DA COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. N.; MOREIRA, D. R.; DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; FERREIRA, J. M.; DE QUEIROZ, M. G.; LEITE, A. C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 313-330, 2015.
- FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; CARVALHO, A. F. U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, n.3, p.1045-1058, 2011.

FISKESJÖ, G., Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. **Plants for environmental studies**, v. 11, p. 307-333, 1997.

FLEURY, L. F. F. J.; SANCHES, J. A. J. Primary cutaneous sarcomas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 3, p. 207-221, 2006.

FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 591, n. 1, p. 8-15, 2005.

FRANCO, D., SINEIRO, J., RUBILAR, M., SÁNCHEZ, M., JEREZ, M., PINELO, M., COSTOYA, N., NUÑEZ, M. Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 3210-3216, 2008.

FRANK, A.; ABU-LAFI, S.; ADAWI, A.; SCHWED, J. S.; STARK, H.; RAYAN, A. From medicinal plant extracts to defined chemical compounds targeting the histamine H4 receptor: Curcuma longa in the treatment of inflammation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 10, p. 923-929, 2017.

FROEHNER, M.; WIRTH, M. P. Etiologic factors in soft tissue sarcomas. **Onkologie**, v. 24, n.3, pp. 139-142, 2001.

FURNESS, D. L. F.; DEKKER, G. A.; HAGUE, W. M.; KHONG, T. Y.; FENECH, M. F. Increased lymphocyte micronucleus frequency in early pregnancy is associated prospectively with pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction. **Mutagenesis**, v. 25, n. 5, p. 489-498, 2010.

GADI, V. K.; DAVIDSON, N. E. Practical approach to triple-negative breast cancer. **Journal of oncology practice**, v. 13, n. 5, p. 293-300, 2017.

GAN, F. F.; LING, H.; ANG X.; REDDY, S. A.; LEE, S.S.; YANG, H.; TAN, S.H.; HAYES, J.D.; CHUI, W.K.; CHEW, E.H. A novel shogaol analog suppresses cancer cell invasion and inflammation, and displays cytoprotective effects through modulation of NF- κ B and Nrf2-Keap1 signaling pathways. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 272, n. 3, p. 852-862, 2013.

GANAPATHY, S., MURALEEDHARAN, A., SATHIDEVI, P. S., CHAND, P., RAJKUMAR, R. P. CometQ: An automated tool for the detection and quantification of DNA damage using comet assay image analysis. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 133, p. 143-154, 2016.

GHOSAL, G.; CHEN, J. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. **Translational cancer research**, v. 2, n. 3, p. 107, 2013.

GODET, I.; GILKES, D.M. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. **Integrative cancer science and therapeutics**, v. 4, n. 1, 2017.

GOLUBNITSCHAJA, O. Cell cycle checkpoints: the role and evaluation for early diagnosis of senescence, cardiovascular, cancer, and neurodegenerative diseases. **Amino acids**, v. 32, n. 3, p. 359-371, 2007.

GOLUBNITSCHAJA, O.; DEBALD, M.; YEGHIAZARYAN, K.; KUHN, W.; PEŠTA, M.; COSTIGLIOLA, V.; GRECH, G. Breast cancer epidemic in the early twenty-first century: evaluation of risk factors, cumulative questionnaires and recommendations for preventive measures. **Tumor Biology**, v. 37, n. 10, p. 12941-12957, 2016.

GÓMEZ-RAPOSO, C.; TÉVAR, F. Z.; MOYANO, M. S.; GÓMEZ, M. L.; CASADO, E. Male breast cancer. **Cancer treatment reviews**, v. 36, n. 6, p. 451-457, 2010.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra. p. 173-200, 2003.

GONZALEZ, K. D.; NOLTNER, K. A.; BUZIN, C. H.; GU, D.; WEN-FONG, C. Y.; NGUYEN, V. Q.; HAN, J. H.; LOWSTUTER, K.; LONGMATE, J.; SOMMER, S. S.; WEITZEL, J.N. Beyond. Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n.8, pp. 1250-1256, 2009.

GONZÁLEZ-VALLINAS, M.; GONZÁLEZ-CASTEJÓN, M.; RODRÍGUEZ-CASADO, A.; RAMÍREZ DE MOLINA, A. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. **Nutrition reviews**, v. 71, n. 9, p. 585-599, 2013.

GOUDA, N. A. A.; SAAD, M. M. G.; ABDELGALEIL, S. A. M. Pre and post herbicidal activity of monoterpenes against barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). **Weed Science**, v. 64, n. 1, p. 191-200, 2016.

GRAY, J. M.; RASANAYAGAM, S.; ENGEL, C.; RIZZO, J. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. **Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 94, 2017.

GREAVES, M. Does everyone develop covert cancer? **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 4, p. 209, 2014.

GREAVES, M. F. Aetiology of acute leukaemia. **Lancet**, v. 349, n. 9048, pp. 344-349, 1997.

GREENLEE, H.; DUPONT-REYES, M. J.; BALNEAVES, L. G.; CARLSON, L. E.; COHEN, M. R.; DENG, G.; BOYCE, L. M. Clinical practice guidelines on the evidence-based use of integrative therapies during and after breast cancer treatment. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 3, p. 194-232, 2017.

GRZANNA, R.; LINDMARK, L.; FRONDOZA, C. G. "Ginger—an herbal medicinal product with broad antiinflammatory actions". **Journal of Medicinal Food**, v. 8, no. 2, pp. 125-132, 2005.

HALLEK, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 5, pp. 446-460, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARDY, G. Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, v. 16, n. 7-8, p. 688, 2000.

HARWOOD, J. L.; ALEXANDER, J. H.; MAYERSON, J. L.; SCHARSCHMIDT, T. J. Targeted chemotherapy in bone and soft-tissue sarcoma. *Orthopedic Clinics*, v. 46, n. 4, p. 587-608, 2015.

HASSON - OHAYON, I.; GOLDZWEIG, G.; BRAUN, M.; GALINSKY, D. Women with advanced breast cancer and their spouses: diversity of support and psychological distress. *Psycho-oncology*, v. 19, n. 11, p. 1195-1204, 2010.

HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1780, n. 11, p. 1217-1235, 2008.

HILL, R. P. The changing paradigm of tumour response to irradiation. *The British journal of radiology*, v. 90, n. 1069, p. 20160474, 2016.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009.

HOUSSAMI, N.; TURNER, R.; MORROW, M. Meta-analysis of pre-operative magnetic resonance imaging (MRI) and surgical treatment for breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, v. 165, n. 2, p. 273-283, 2017.

HOWLADER, N.; NOONE, A. M.; KRAPCHO, M.; MILLER, D.; BISHOP, K.; KOSARY, C. L.; LEWIS, D. R. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. Bethesda: National Cancer Institute, 2017. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/>. Acesso em: 01/06/2018.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 4, p. 276, 2003.

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

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade – **Rio de Janeiro**: INCA, 2016.

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

INOUE, T.; MIYAZAKI, J.; ICHIOKA, D.; NARITA, S.; KAGEYAMA, S.; SUGIMOTO, M.; NOMOTO, T. A comparison of nephrotoxicity between patients with a solitary-functioning kidney and those with bilateral-functioning kidneys in cisplatin-based chemotherapy for advanced urothelial carcinoma: a Japanese retrospective multi-institutional study. **BioMed Central Cancer**, v. 18, n. 1, p. 290, 2018.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071, 2009.

JAIN, K. K. **Textbook of Personalized Medicine**. New York, NY, USA: Springer; 2009.

JAYASENA, T.; POLJAK, A.; SMYTHE, G.; BRAIDY, N.; MÜNCH, G.; SACHDEV, P. The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. **Ageing research reviews**, v. 12, n. 4, p. 867-883, 2013.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JENA, N. R.; MISHRA, P. C. Mechanisms of formation of 8-oxoguanine due to reactions of one and two OH[•] radicals and the H₂O₂ molecule with guanine: A quantum computational study. **The journal of physical chemistry B**, v. 109, n. 29, p. 14205-14218, 2005.

JEONG, J. K.; SEO, J. S.; MOON, M. H.; LEE, Y. J.; SEOL, J. W.; PARK, S. Y. Hypoxia-inducible factor-1 alpha regulates prion protein expression to protect against neuron cell damage. **Neurobiology of aging**, v. 33, n. 5, p. 1006. e1-1006. e10, 2012.

JEONG, J. K.; MOON, M. H.; PARK, Y. G.; LEE, J. H.; LEE, Y. J.; SEOL, J. W.; PARK, S. Y. Gingerol-Induced Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha Inhibits Human Prion Peptide-Mediated Neurotoxicity. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1185-1192, 2013.

JITARIU, A. A.; CÎMPEAN, A. M.; RIBATTI, D.; RAICA, M. Triple negative breast cancer: the kiss of death. **Oncotarget**, v. 8, n. 28, p. 46652, 2017.

JOLAD, S. D.; LANTZ, R. C.; CHEN, G. J.; BATES, R. B.; TIMMERMANN, B. N. Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-stimulated PGE 2 production. **Phytochemistry**, v. 66, n. 13, p. 1614-1635, 2005.

JOLAD, S. D.; LANTZ, R. C.; SOLYOM, A. M. Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): Composition and effects on LPS-induced PGE (2) production. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1937-1954, 2004.

JOSHI, P.; VISHWAKARMA, R. A.; BHARATE, S. B. Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer. **European journal of medicinal chemistry**, v. 138, p. 273-292, 2017.

KACERGIUS, T.; ABU-LAFI, S.; KIRKLIUSKIENE, A.; GABE, V.; ADAWI, A.; RAYAN, M.; RAYAN, A. Inhibitory capacity of *Rhus coriaria* L. extract and its major component methyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical

profilometry: Potential applications for oral health. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 1, p. 949-956, 2017.

KAEFER, C. M.; MILNER, J. A. The role of herbs and spices in cancer prevention. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 347-361, 2008.

KALRA, E. K. Nutraceutical-definition and introduction. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 5, n. 3, p. 27-28, 2003.

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, D. H.; PARK, N. J.; MCARDLE, T. Cancer-specific stress and mood disturbance: implications for symptom perception, quality of life, and immune response in women shortly after diagnosis of breast cancer. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012.

KANTI, V.; NUWAYHID, R.; LINDNER, J.; HILLMANN, K.; STROUX, A.; BANGEMANN, N.; GARCIA-BARTELS, N. Analysis of quantitative changes in hair growth during treatment with chemotherapy or tamoxifen in patients with breast cancer: a cohort study. **British Journal of Dermatology**, v. 170, n. 3, p. 643-650, 2014.

KAPINOVA, A.; KUBATKA, P.; GOLUBNITSCHAJA, O.; KELLO, M.; ZUBOR, P.; SOLAR, P.; PEC, M. DIETARY phytochemicals in breast cancer research: anticancer effects and potential utility for effective chemoprevention. **Environmental health and preventive medicine**, v. 23, n. 1, p. 36, 2018.

KAUR, V.; KUMAR, M.; KUMAR, A.; KAUR, K.; DHILLON, V. S.; KAUR, S. Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: Implications in cancer chemoprevention and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 564-586, 2018.

KELLY, M. R.; XU, J.; ALEXANDER, K. E.; LOO, G. Disparate effects of similar phenolic phytochemicals as inhibitors of oxidative damage to cellular DNA. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 485, n. 4, p. 309-318, 2001.

KENNARD, B. D.; STEWART, S. M.; OLVERA, R.; BAWDON, R. E.; O'HAILIN, A.; LEWIS, C. P.; WINICK, N. J. Nonadherence in adolescent oncology patients: preliminary data on psychological risk factors and relationships to outcome. **Journal of Clinical Psychology in Medical Settings**, v. 11, n. 1, p. 31-39, 2004.

KIM, C. Y.; SEO, Y. LEE, C.; PARK, G. H.; JANG, J. H. Neuroprotective Effect and Molecular Mechanism of [6]-Gingerol against Scopolamine-Induced Amnesia in C57BL/6 Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

KIM, E.; JEON, I. S.; KIM, J. W.; KIM, J.; JUNG, H. S.; LEE, S. J. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. **Oral diseases**, v. 13, n. 5, p. 495-499, 2007.

KIM, H. S.; LEE, S. H.; BYUN, Y.; PARK, H. D. 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. **Scientific reports**, v. 5, p. 8656, 2015.

KIM, H.W.; LEE, A.Y.; YEO, S.K.; CHUNG, H.; LEE, J.H.; HOANG, M.H.; JIA, Y.; HAN, S.I.; OH, S.K.; LEE, S.J.; KIM, Y.S. Metabolic profiling and biological mechanisms of body fat reduction in mice fed the ethanolic extract of black-colored rice. **Food research international**, v. 53, n. 1, p. 373-390, 2013.

KIM, J. A.; KIM, D. H.; HOSSAIN, M. A.; KIM, M. Y.; SUNG, B.; YOON, J. H.; KIM, N. D. HS-1793, a resveratrol analogue, induces cell cycle arrest and apoptotic cell death in human breast cancer cells. **International journal of oncology**, v. 44, n. 2, p. 473-480, 2014.

KINGHORN, A. D.; PAN, L.; FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of natural products**, v. 74, n. 6, p. 1539-1555, 2011.

KIRSCH-VOLDERS, M.; DECORDIER, I.; ELHAJOUJI, A.; PLAS, G.; AARDEMA M. J.; FENECH, M. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 177-184, 2011.

KLAUNIG, J. E. Chemical carcinogenesis. **Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications**, v. 259, 2014.

KOMAREK, M.; CADKOVA, E.; CHRASTNY, V.; BORDAS, F.; BOLLINGER, J. C.; Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. **Environment international**, v. 36, n. 1, p. 138-151, 2010.

KORKOLA, J. E.; DEVRIES, S.; FRIDLAND, J.; HWANG, E. S.; ESTEP, A. L.; CHEN, Y. Y.; CHEW, K. L.; DAIRKEE, S. H.; JENSEN, R. M.; WALDMAN, F. M. Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. **Cancer research**, v. 63, n. 21, p. 7167-7175, 2003.

KRESO, A.; DICK, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. **Cell stem cell**, v. 14, n. 3, p. 275-291, 2014.

KUBATKA, P.; KAPINOVÁ, A.; KRUŽLIAK, P.; KELLO, M.; VÝBOHOVÁ, D.; KAJO, K. Antineoplastic effects of *Chlorella pyrenoidosa* in the breast cancer model. **Nutrition**, v. 31, n. 4, p. 560-569, 2015.

KUBATKA, P.; KELLO, M.; KAJO, K.; KRUZLIAK, P.; VÝBOHOVÁ, D.; MOJŽIŠ, J. Oregano demonstrates distinct tumour-suppressive effects in the breast carcinoma model. **European journal of nutrition**, v. 56, n. 3, p. 1303-1316, 2017.

KUBATKA, P.; KELLO, M.; KAJO, K.; KRUZLIAK, P.; VÝBOHOVÁ, D.; ŠMEJKAL, K. Young barley indicates antitumor effects in experimental breast cancer in vivo and in vitro. **Nutrition and cancer**, v. 68, n. 4, p. 611-621, 2016.

KUMAR, M.; KAUR, V.; KUMAR, S.; KAUR, S.J. Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 531-563, 2016.

KUNNUMAKKARA, A. B.; SAILO, B. L.; BANIK, K.; HARSHA, C.; PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; BHARTI, A.C.; AGGARWAL, B. B. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? **Journal of translational medicine**, v. 16, n. 1, p. 14, 2018.

LANIER, C.; MANIER, N.; CUNY, D.; DERAM, A. The comet assay in higher terrestrial plant model: review and evolutionary trends. **Environmental pollution**, v. 207, p. 6-20, 2015.

LAW, S.; SANYAL, S.; CHATTERJEE, R.; LAW, A.; LAW, A.; CHATTOPADHYAY, S. Therapeutic management of peritoneal ascitic sarcomatosis by *Ruta graveolens*: A study in experimental mice. **Pathology-Research and Practice**, v. 214, n. 9, p. 1282-1290, 2018.

LEE, C.; PARK, G. H.; KIM C.Y.; JANG, J. H. [6]-Gingerol attenuates β -amyloid-induced oxidative cell death via fortifying cellular antioxidant defense system. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1261-1269, 2011.

LEE, H. S.; SEO, E. Y.; KIM, W. K. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 5, p. 313-319, 2008.

LEE, J. H.; KIM, Y. G.; CHOI, P.; HAM, J.; PARK, J. G.; LEE, J. Antibiofilm and antivirulence activities of 6-gingerol and 6-shogaol against *Candida albicans* due to hyphal inhibition. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, 2018.

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.

LEVINE, A. J.; PUZIO-KUTER, A. M. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1340-1344, 2010.

LI, H. X.; MCGRATH, K. C. Y.; VAN, H.; TRAN, V.; H.; LI, Y. M.; LI, Y.; XU, B.; XU, M.; CHEN, D.; XIONG, Y.; LIAN, M.; SUN, Y.; TANG, Z.; WANG, L.; JIANG, C.; LIN, Y. 6-Gingerol protects intestinal barrier from ischemia/reperfusion-induced damage via inhibition of p38 MAPK to NF- κ B signalling. **Pharmacological research**, v. 119, p. 137-148, 2017.

LI, J.; ZHU, H.; HU, J.; MI, J.; CHEN, S.; CHEN, Z.; WANG, Z. Progress in the treatment of acute promyelocytic leukemia: optimization and obstruction. **International journal of hematology**, v. 100, n. 1, p. 38-50, 2014.

LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p. 46-53, 2009.

LIM, T. K. *Zingiber officinale*. In: **Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants**. Springer, Cham, p. 469-560, 2016.

LIN C. B.; LIN C. C.; TSAY G. J. 6-Gingerol inhibits growth of colon cancer cell LoVo via induction of G2/M arrest. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479S-3485S, 2004.

LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **Journal of food science**, v. 78, n. s1, p. A18-A25, 2013.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of neurochemistry**, v. 69, n. 2, p. 581-593, 1997.

LO-COCO, F.; CICONI, L. History of acute promyelocytic leukemia: a tale of endless revolution. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 3, n. 1, 2011.

LOGAN, G. J.; DABBS, D. J.; LUCAS, P. C.; JANKOWITZ, R. C.; BROWN, D. D.; CLARK, B. Z.; MCAULIFFE, P. F. Molecular drivers of lobular carcinoma in situ. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 76, 2015.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MADEO, F.; HERKER, E.; MALDENER, C.; WISSING, S.; LÄCHELT, S.; HERLAN, M.; FEHR, M.; LAUBER, K.; SIGRIST, S. J.; WESSELBORG, S.; FRÖHLICH, K. U. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. **Molecular cell**, v. 9, n. 4, p. 911-917, 2002.

MAGALHÃES, H. I. F.; FERREIRA, P. M. P.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. In vitro and in vivo antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.2, p.407-416, 2010.

MAGALOVA, T. Nutrition and female breast tumors. **Bratislavske lekarske listy**, v. 100, n. 9, p. 503-514, 1999.

MAGNUSSON, S.; GISSELSSON, D.; WIEBE, T.; KRISTOFFERSSON, U.; BORG, Å.; OLSSON, H. Prevalence of germline TP53 mutations and history of Li-Fraumeni syndrome in families with childhood adrenocortical tumors, choroid plexus tumors, and rhabdomyosarcoma: a population-based survey. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 59, n. 5, pp. 846-853, 2012.

MAHDIPOUR-SHIRAYEH, A.; Kaveh, K.; Kohandel, M.; Sivaloganathan, S. Phenotypic heterogeneity in modeling cancer evolution. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0187000, 2017.

MAJUMDER, D.; DAS, A.; SAHA, C. Catalase inhibition an anti cancer property of flavonoids: A kinetic and structural evaluation. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, p. 929-935, 2017.

- MAN, R. X. G.; LACK, D. A.; WYATT, C. E.; MURRAY, V. The effect of natural disasters on cancer care: a systematic review. **The Lancet Oncology**, v. 19, n. 9, p. e482-e499, 2018.
- MARY, J. S.; VINOTHA, P.; PRADEEP, A. M. Screening for in vitro cytotoxic activity of seaweed, *Sargassum* sp. against Hep-2 and MCF-7 cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 12, p. 6073-6076, 2012.
- MASON, J. K.; THOMPSON, L. U. Flaxseed and its lignan and oil components: can they play a role in reducing the risk of and improving the treatment of breast cancer? **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 6, p. 663-678, 2013.
- MASOOD, S. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancers. **Women's Health**, v. 12, n. 5, p. 480-491, 2016.
- MASOUD, V.; PAGÈS, G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. **World journal of clinical oncology**, v. 8, n. 2, p. 120, 2017.
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological indicators**, v. 56, p. 60-69, 2015.
- MCGUIRE, A.; BROWN, J.A.; MALONE, C.; MCLAUGHLIN, R.; KERIN, M.J. Effects of age on the detection and management of breast cancer. **Cancers (Basel)**, v. 7, n.22, pp. 908-929, 2015.
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug information journal**, v. 32, n. 2, p. 513-524, 1998.
- 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
- MENG, X.; SUN, H.; YANG, L.; YIN, R.; QI, L. A hydroxylated flavonol, fisetin inhibits the formation of a carcinogenic estrogen metabolite. **Steroids**, v. 119, p. 53-56, 2017.
- MESI, D. A.; KOPLIKU, 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.
- MILIC, M; ROZGAJ, R; KASUBA, V; JAZBEC, A. M; STARCEVIC, B; LYZBICKI, B; RAVEGNINI, G; ZENESINI, C; MUSTI, M; HRELIA, P; ANGELINI, S. Polymorphisms in DNA repair genes: CBMN cytome assay in workers chronically exposed to low doses of ionising radiation. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 66, n. 2, p. 109-120, 2015.
- MILLER, D. M.; THOMAS, S. D.; ISLAM, A.; MUENCH, D.; SEDORIS, K. C-myc and cancer metabolism, **Clinical cancer research**, v. 18, n 20, p. 5546-5553, 2012.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in plant science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

MORRISON, B. A. Soft tissue sarcomas of the extremities. In: **Baylor University Medical Center Proceedings**. Taylor & Francis, 2003. p. 285-290.

MOORMAN, A.V.; CHILTON, L.; WILKINSON, J.; ENSOR, H. M.; BOWN, N.; PROCTOR, S. J. A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 206-214, 2010.

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.

MUNIRAH, M. Y. N.; SHAFURAH, A. S.; NORAZMIR, M. N.; HAYATI, M. A. M.; AJAU, D. Roles of whole grains-based products in maintaining treatment targets among type 2 diabetes mellitus patients. **Asian Journal of Clinical Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 67-76, 2012.

NEAL, R. D.; THARMANATHAN, P.; FRANCE, B.; DIN, N. U.; COTTON, S.; FALLON-FERGUSON, J.; HAMILTON, W.; HENDRY, A.; HENDRY, M.; LEWIS, R.; MACLEOD, U.; MITCHELL, E. D.; PICKETT, M.; RAI, T.; SHAW, K.; TORRING, M. L.; WILKINSON, C.; WILLIAMS, B.; WILLIAMS, N.; EMERY, J. Is increased time to diagnosis and treatment in symptomatic cancer associated with poorer outcomes? Systematic review. **British journal of cancer**, v. 112, n. s1, p. S92, 2015.

NERI, M.; MILAZZO, D.; UGOLINI, D.; MILIC, M.; CAMPOLONGO, A.; PASQUALETTI, P.; BONASSI, S. Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 155-163, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NGO, D.C.; VERVERIS, K.; TORTORELLA, S.M.; KARAGIANNIS, T.C. Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 4, p. 819-823, 2015.

NICHOL, J. N.; GARNIER, N.; MILLER J. R.; WILSON, H. Triple A therapy: the molecular underpinnings of the unique sensitivity of leukemic promyelocytes to anthracyclines, all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide. **Best practice & research Clinical haematology**, v. 27, n. 1, p. 19-31, 2014.

NIKBAKHSI, N.; MOUDI, S.; ABBASIAN, S.; KHAFRI, S. Prevalence of depression and anxiety among cancer patients. **Caspian journal of internal medicine**, v. 5, n. 3, p. 167, 2014.

NOONAN, D. M.; BARBARO, A. D. L.; VANNINI, N.; MORTARA, L.; ALBINI, A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 27, n. 1, p. 31-40, 2008.

NORTON, K. A.; WININGER, M.; BHANOT, G.; GANESAN, S.; BARNARD, N.; SHINBROT, T. A 2D mechanistic model of breast ductal carcinoma in situ (DCIS) morphology and progression. **Journal of theoretical biology**, v. 263, n. 4, p. 393-406, 2010.

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.

NOUNOU, M. I.; ELAMRAWY, F.; AHMED, N.; ABDELRAOUF, K.; GODA, S.; SYED-SHA-QHATTAL, H. Breast cancer: conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies. **Breast cancer: basic and clinical research**, v. 9, p. BCBCR. S29420, 2015.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; VAN, S. G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental pollution**, v. 144, n. 2, p. 453-462, 2006.

OHRI, N.; RAPKIN, B. D.; GUHA, C.; KALNICKI, S.; GARG, M. Radiation therapy noncompliance and clinical outcomes in an urban academic cancer center. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 95, n. 2, p. 563-570, 2016.

OLIVE, P. L.; DURAND, R. E. Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. **Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 66, n. 1, p. 1-8, 2005.

OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, P.; LUIS, F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **Anais da academia brasileira de ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

OLIVEIRA-JR JR, CHESCHINI JJ, HUMANES AC, MORELLI S, SILVEIRA-LACERDA EP. Caracterização citogenética de uma linhagem celular tumoral (Sarcoma 180) de *Mus Musculus*. In: **51º Congresso Brasileiro de Genética-2005-São Paulo, Brasil**. 2005.

ONITILO, A. A.; ENGEL, J. M.; GREENLEE, R. T.; MUKESH, B. N. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. **Clinical medicine & research**, v. 7, n. 1-2, p. 4-13, 2009.

ÖZÇELİK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 4, p. 396-402, 2011.

ÖZKARA, A., AKYIL, D.; EREN, Y.; ERDOGMUS, S. F. Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay. **Cytotechnology**, v. 67, n. 5, p. 783-791, 2015.

PACHE, R. A.; CEOL, A.; ALOY, P. NetAligner—a network alignment server to compare complexes, pathways and whole interactomes. **Nucleic acids research**, v. 40, n. W1, p. W157-W161, 2012.

PAPACCIO, F.; PAINO, F.; REGAD, T.; PAPACCIO, G.; DESIDERIO, V.; TIRINO, V. Concise review: cancer cells, cancer stem cells, and mesenchymal stem cells: influence in cancer development. **Stem cells translational medicine**, v. 6, n. 12, p. 2115-2125, 2017.

PARK, J. H.; QIAO, B.; PANAGEAS, K. S.; SCHYMURA, M. J.; JURCIC, J. G.; ROSENBLAT, T. L.; TALLMAN, M. S. Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid. **Blood**, p. blood-2011-04-346437, 2011.

PARK, H.; CHANG, S. K.; KIM, J. Y.; LEE, B. M.; SHIN, H. S. Risk factors for distant metastasis as a primary site of treatment failure in early-stage breast cancer. **Chonnam medical journal**, v. 50, n. 3, p. 96-101, 2014.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PEARSON, R.; MILLIGAN, R.; CAIN, H. Radioactive iodine-125 seed localisation of breast carcinoma in advance of the day of surgery reduces pre-operative anxiety levels. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 43, n. 5, p. S7, 2017.

PEJCHAL, J.; VASILIEVA, V.; HRISTOZOVA, M.; VILASOVÁ, Z.; VÁVROVÁ, J.; ALYAKOV, M.; KUBELKOVÁ, K. Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay/CBMN cytome assay in human lymphocytes after in vitro irradiation and its use in biodosimetry. **Mil Med Sci Lett**, v. 80, p. 28-37, 2011.

PEREIRA, C.; COUTINHO, I.; SOARES, J.; BESSA, C.; LEO, M.; SARAIVA, L. New insights into cancer-related proteins provided by the yeast model. **The FEBS journal**, v. 279, n. 5, p. 697-712, 2012.

PHARMACOPOEIA, BRITISH. International edition. **HMSO Publication London**, v. 483, p. 1808, 1993.

PHIPPS, A. I.; LI, C. I. Breast cancer biology and clinical characteristics. In: **Breast cancer epidemiology**. Springer, New York, NY, 2010. p. 21-46.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 11, p. 3155-3163, 2007.

PRIYA, R., M.; PADMAKUMARI, K. P.; SANKARIKUTTY, B.; LIJO CHERIAN, O.; NISHA, V. M.; RAGHU, K. G. Inhibitory potential of ginger extracts against enzymes linked to type 2 diabetes, inflammation and induced oxidative stress. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 2, p. 106-110, 2011.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006.

QIAN, Q. H.; YUE, W.; WANG, Y. X.; YANG, Z. H.; LIU, Z. T.; CHEN, W. H. Gingerol inhibits cisplatin-induced vomiting by down regulating 5-hydroxytryptamine, dopamine and substance P expression in minks. **Archives of pharmacal research**, v. 32, n. 4, p. 565-573, 2009.

QIAN, Q. H.; WANG, Y.; CHEN, W. H.; YANG, Z. H.; LIU, Z. T.; WANG, Y. X. Effect of gingerol on substance P and NK1 receptor expression in a vomiting model of mink. **Chinese medical journal**, v. 123, n. 4, p. 478-484, 2010.

QIAN, W.; CAI, X.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHAO, H.; QIAN, Q.; HASEGAWA, J. Effect of Gingerol on Cisplatin-Induced Pica Analogous to Emesis Via Modulating Expressions of Dopamine 2 Receptor, Dopamine Transporter and Tyrosine Hydroxylase in the Vomiting Model of Rats. **Yonago acta medica**, v. 59, n. 2, p. 100, 2016.

QUESADA, J.; AMATO, R. The molecular biology of soft-tissue sarcomas and current trends in therapy. **Sarcoma**, v. 12, p. 849-856, 2012.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 418, n. 2, p. 113-119, 1998.

RASHID, N.; KOH, H. A.; BACA, H. C.; LI, Z.; MALECHA, S.; ABIDOYE, O.; MASAQUEL, A. Clinical impact of chemotherapy-related adverse events in patients with metastatic breast cancer in an integrated health care system. **Journal of managed care & specialty pharmacy**, v. 21, n. 10, p. 863-871b, 2015.

RASK-ANDERSEN, M.; ZHANG, J.; FABBRO, D.; SCHIOTH, H. B. Advances in kinase targeting: current clinical use and clinical trials. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 11, p. 604-620, 2014.

RASTOGI, N.; GARA, R. K.; TRIVEDI, R.; SINGH, A.; DIXIT, P.; MAURYA, R.; MISHRA, D. P. (6)-Gingerol-induced myeloid leukemia cell death is initiated by reactive oxygen species and activation of miR-27b expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 288-301, 2014.

RAVINDRAN, P. N.; BABU, K. N. **Ginger, the genus Zingiber: Medicinal and Aromatic Plants** – Industrial Profiles. Flórida, USA: CRC Press, 2005. 576p.

RAYAN, A.; RAIYN, J.; FALAH, M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187925, 2017.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RHEE, S. G. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1882-1883, 2006.

RICE, K. L.; DE THÉ, H. The acute promyelocytic leukaemia success story: curing leukaemia through targeted therapies. **Journal of internal medicine**, v. 276, n. 1, p. 61-70, 2014.

ROOS, W. P.; THOMAS, A. D.; KAINA, Bernd. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 20, 2016.

ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016.

RUBINO, C.; SHAMSALDIN, A.; LÊ, M. G.; LABBÉ, M.; GUINEBRETIERE, J. M.; CHAVALUDRA, J.; DE VATHAIRE, F. Radiation dose and risk of soft tissue and bone sarcoma after breast cancer treatment. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 89, n. 3, pp. 277-288, 2005.

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). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 98-102, 2005.

RUTKOWSKI, M. R.; SVORONOS, N.; PERALES-PUCHALT, A.; CONEJO-GARCIA, J. R. The tumor macroenvironment: cancer-promoting networks beyond tumor beds. In: **Advances in cancer research**. Academic Press, 2015. p. 235-262.

SAHA, P.; DAS, B.; CHAUDHURI, K. Role of 6-Gingerol in the reduction of cholera toxin activity in vitro and in vivo. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 00122-13, 2013.

SAMAD, M. B.; MOHSIN, N. A. B.; RAZU, B. A.; HOSSAIN, M. T.; MAHZABEEN, S.; UNNOOR, N.; MUNA, I. A.; AKHTER, F.; KABIR, A. U. L.; HANNAN, J. M. A. [6]-Gingerol, from *Zingiber officinale*, potentiates GLP-1 mediated glucose-stimulated insulin secretion pathway in pancreatic β -cells and increases RAB8/RAB10-regulated membrane presentation of GLUT4 transporters in skeletal muscle to improve hyperglycemia in *Lepr db/db* type 2 diabetic mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 395, 2017.

SANGIAN, H.; FARAMARZI, H.; YAZDINEZHAD, A.; MOUSAVI, S. J.; ZAMANI, Z.; SAXENA, M.; SAXENA, J.; NEMA, R.; SINGH, D.; GUPTA, A. Phytochemistry of medicinal plants. **Journal of pharmacognosy and phytochemistry**, v. 1, n. 6, 2013.

SCALBERT, A.; ANDRES-LACUEVA, C.; ARITA, M.; KROON, P.; MANACH, C.; URPI-SARDA, M.; WISHART, D. Databases on food phytochemicals and their health-promoting effects. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4331-4348, 2011.

SCHMIDT, F.; EFFERTH, T. Tumor heterogeneity, single-cell sequencing, and drug resistance. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 2, p. 33, 2016

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. São Paulo, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SCHON, K.; TISCHKOWITZ, M. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. **Breast cancer research and treatment**, p. 1-7, 2017.

SEELINGER, M.; POPESCU, R.; GIESSRIGL, B.; JARUKAMJORN, K.; UNGER, C.; WALLNÖFER, B.; FRISCH, R. Methanol extract of the ethnopharmaceutical remedy *Smilax spinosa* exhibits anti-neoplastic activity. **International journal of oncology**, v. 41, n. 3, p. 1164-1172, 2012.

SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Molecular cell**, v. 48, n. 2, p. 158-167, 2012.

SEKIYA, K.; OHTANI, A.; KUSANO, S. Enhancement of insulin sensitivity in adipocytes by ginger. **Biofactors**, v. 22, n. 1-4, p. 153-156, 2004.

SHANMUGAM, K. R.; RAMAKRISHANA, C. H.; MALLIKARJUNA, K.; SATHYAVELU R. K. The impact of ginger on kidney carbohydrate metabolic profiles in STZ induced diabetic rats. **Asian Journal of Experimental Sciences**, v. 23, n. 1, p. 127-134, 2009.

SHARMA, S.; VIG, A. P. Genotoxicity of atrazine, avenoxan, diuron and quizalofop-P-ethyl herbicides using the *Allium cepa* root chromosomal aberration assay. **Terrestrial and aquatic environmental toxicology**, v. 6, n. 2, p. 90-95, 2012.

SHIRZAD, M.; KORDYAZDI, R.; SHAHINFARD, N.; NIKOKAR, M. A Does Royal jelly affect tumor cells? **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 2, n. 2, 2013.

SHMOOKLER, B.; BICKELS, J.; JELINEK, J.; SUGARBAKER, P.; MALAWER, M. Bone and soft-tissue sarcomas: epidemiology, radiology, pathology and fundamentals of surgical treatment. In: **Musculoskeletal cancer surgery**. Springer, Dordrecht, 2004. p. 3-35.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7–30, 2018.

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G. A.; CASSALI, G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich Cell proliferation markers for evaluating the growth of solid and ascitic forms of Ehrlich tumor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 658-661, 2006.

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. **Breast Care**, v. 8, n. 2, p. 149-154, 2013.

SISENANDO, H. A.; DE MEDEIROS, S. R. B.; SALDIVA, P. H.; ARTAXO, P.; HACON, S. S. Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by *Tradescantia* micronucleus bioassay: a toxicity assessment study. **Environmental Health**, v. 10, n. 1, p. 41, 2011.

SIVE, J. I.; BUCK, G.; FIELDING, A.; LAZARUS, H. M.; LITZOW, M. R.; LUGER, S.; ROWE, J. M. Outcomes in older adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): results from the international MRC UKALL XII/ECOG 2993 trial. **British journal of haematology**, v. 157, n. 4, p. 463-471, 2012.

SKUBITZ, K. M.; D'ADAMO, D. R. Sarcoma. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2007. p. 1409-1432.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAEULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochimica et biophysica acta**, v. 77, p. 383-393, 1963.

ŚLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; MILCZAREK, M.; MIELCZAREK, S.; LUBLIN, C.; CIERPIAŁ, T.; ŁYŻWA, P.; KIEŁBASIŃSKI, P.; JAROMIN, A.; FLIZ, A.; CHILMONCZYK, Z. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0155772, 2016.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

SOUZA, T. S.; HEINCKLEIN, F. A.; ANGELIS, D. F.; FONTANETTI, C. S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, n. 2, p. 1627-1636, 2013.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: **DNA repair protocols**. Met. Mol. Biol., v. 113, p. 203-212, 1999.

SPROUFFSKE, K.; ATHENA A. C.; RADICH, J. P.; CARROLL, M.; NEDELCO, A. M.; MALEY, C. C. An evolutionary explanation for the presence of cancer nonstem cells in neoplasms. **Evolutionary applications**, v. 6, n. 1, p. 92-101, 2013.

SREEDHAR, A.; LI, J.; ZHAO, Y.. Next-Gen Therapeutics for Skin Cancer: Nutraceuticals. **Nutrition and cancer**, p. 1-13, 2018.

SRINIVASAN, K. Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. **Food Research International**, v. 38, n. 1, p. 77-86, 2005a.

SRINIVASAN, K. Role of spices beyond food flavoring: Nutraceuticals with multiple health effects. **Food Reviews International**, v. 21, n. 2, p. 167-188, 2005b.

STEFFNER, R. J.; JANG, E. S. Staging of Bone and Soft-tissue Sarcomas. **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 26, n. 13, p. e269-e278, 2018.

STEWART, BW.; WILD, CP., editors. **World Cancer Report 2014**. International Agency for Research on Cancer; Lyon: 2014

STEIN, E. M.; TALLMAN, M. S. Provocative pearls in diagnosing and treating acute promyelocytic leukemia. **Oncology (Williston Park, NY)**, v. 26, n. 7, p. 636, 2012.

STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785-796, 2012.

SU, D.; LI, L. Trends in the use of complementary and alternative medicine in the United States: 2002–2007. **Journal of health care for the poor and underserved**, v. 22, n. 1, p. 296-310, 2011.

SUNG, B.; PRASAD, S.; YADAV, V. R.; AGGARWAL, B. B. Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals. **Nutrition and cancer**, v. 64, n. 2, p. 173-197, 2012.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768, 2003.

SURMAN, M.; JANIK, M. E. Stress and its molecular consequences in cancer progression. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 71, n.1, pp. 485-499, 2017.

SWIERZEWSKI, S. J. Leukemia Basics: Remedy Health Media; 1999
<http://www.healthcommunities.com/leukemia/types.shtml>. Acesso em: 15/06/2018.

SZCZEPAŃSKI, T.; VAN-DER-VELDEN, V.H.; VAN DONGEN, J.J. Classification systems for acute and chronic leukaemias. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 16, n. 4, p. 561-582, 2003.

TACHI, T.; TERAMACHI, H.; TANAKA, K.; ASANO, S.; OSAWA, T.; KAWASHIMA, A.; TSUCHIYA, T. The impact of outpatient chemotherapy-related adverse events on the quality of life of breast cancer patients. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124169, 2015.

TANAKA, T.; SUGIE, S. Inhibition of colon carcinogenesis by dietary non-nutritive compounds. **Journal of toxicologic pathology**, v. 20, n. 4, p. 215-235, 2007.

THOMPSON, E.; TAUBE, J. M.; ELWOOD, H.; SHARMA, R.; MEEKER, A.; WARZECHA, H. N.; EMENS, L. A. The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. **Modern Pathology**, v. 29, n. 3, p. 249, 2016.

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

TIRINO, V.; DESIDERIO, V.; PAINO, F.; DE ROSA, A.; PAPACCIO, F.; FAZIOLI, F.; PAPACCIO, G. Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 6, p. 2022-2030, 2011.

TIWARI, M. K.; MISHRA, P. C. Anti-oxidant activity of 6-gingerol as a hydroxyl radical scavenger by hydrogen atom transfer, radical addition and electron transfer mechanisms. **Journal of Chemical Sciences**, v. 128, n. 8, p. 1199-1210, 2016.

TONETO, M. G.; LUCCHESI, I. C.; REICHEL, C. L. Lipossarcoma Gigante de Retroperitônio. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.59, n.2, p.255-260, 2013.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R.L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

TRAN, G.; ZAFAR, S. Y. Financial toxicity and implications for cancer care in the era of molecular and immune therapies. **Annals of translational medicine**, v. 6, n. 9, 2018.

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British journal of cancer**, v. 56, n. 3, p. 279, 1987.

- VALDERRAMA, J. A.; COLONELLI, P.; VÁSQUEZ, D.; GONZÁLEZ, M. F.; RODRIGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C. Studies on quinones. Part 44: Novel angucyclinone N-heterocyclic analogues endowed with antitumoral activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 24, p. 10172-10181, 2008.
- VALENTE, D., COSTA-AMARAL, I. C., CARVALHO, L. V. B. D., SANTOS, M. V. C. D., CASTRO, V. S. D., RODRIGUES, D. D. R. F., MOREIRA, J. C. Use of genotoxicity biomarkers and gene expression on the evaluation of gas station attendants exposed to gasoline fumes. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.
- VAN DER VEEN, M.; MORALES, J. The Roman and Islamic spice trade: New archaeological evidence. **Journal of ethnopharmacology**, v. 167, p. 54-63, 2015.
- VAN NIJNATTEN, T. J. A.; MOOSSDORFF, M.; DE MUNCK, L.; GOORTS, B.; VANE, M. L. G.; KEYMEULEN, K. B. M. I.; SMIDT, M. L. TNM classification and the need for revision of pN3a breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 79, p. 23-30, 2017.
- VARMUS, H.; KUMAR, H. S. Addressing the growing international challenge of cancer: a multinational perspective. **Science translational medicine**, v. 5, n. 175, p. 175cm2-175cm2, 2013.
- VARRICCHI, G.; AMERI, P.; CADEDDU, C.; GHIGO, A.; MADONNA, R.; MARONE, G.; PIROZZI, F. Antineoplastic Drug-Induced Cardiotoxicity: A Redox Perspective. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 167, 2018.
- VASCONCELLOS, M. C.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; MACHADO, M. S.; GUECHEVA T. N.; VILLELA, I.; IMMICH, B. F.; MONTENEGRO, R. C.; FONSECA, A. M.; LEMOS, T. L. G.; MORAES, M. E. A.; SAFFI, J.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; HENRIQUES, J. A. P. Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1, 4 o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 10, p. 799-810, 2010.
- VOGEL, V. G.; FISHER, R. E. Epidemiology and etiology of leukemia. **Current Opinion in Oncology**, v. 5, n. 1, 1993.
- VÁZQUEZ, J.; GONZÁLEZ, B.; SEMPERE, V.; MAS, A.; TORIJA, M. J.; BELTRAN, G. Melatonin reduces oxidative stress damage induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1066, 2017.
- VORA, A.; GOULDEN, N.; WADE, R.; MITCHELL, C.; HANCOCK, J.; HOUGH, R. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. **The lancet oncology**, v. 14, n. 3, p. 199-209, 2013.
- VORA, A.; GOULDEN, N.; MITCHELL, C.; HANCOCK, J.; HOUGH, R.; ROWNTREE, C.; WADE, R. Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 8, p. 809-818, 2014.

WALTHER Z.; SKLAR J. Molecular tumor profiling for prediction of response to anticancer therapies. **Cancer journal**. 2011; 17:71-79.

WANG, H.; OO, K.T.; SHU, L.; SU, Z.Y.; FUENTES, F.; LEE, J.H.; TONY, K.A.N. Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 12, n. 10, p. 1281-1305, 2012.

WANG, J.; YI, J. Cancer cell killing via ROS To increase or decrease, that is the question. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, p. 1875-1884, 2008.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10202, 2010.

WANG, S.; SUN, X.; JIANG, L.; LIU, X.; CHEN, M.; YAO, X.; YANG, G. 6-Gingerol induces autophagy to protect HUVECs survival from apoptosis. **Chemico-biological interactions**, v. 256, p. 249-256, 2016.

WANG, Y.; PROBIN, V.; ZHOU, D. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury: mechanisms of induction and implication for therapy. **Current cancer therapy reviews**, v. 2, n. 3, p. 271-279, 2006.

WARD, E.; DESANTIS, C.; ROBBINS, A.; KOHLER, B.; JEMAL, A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 2, p. 83-103, 2014.

WARIS, G.; AHSAN, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. **Journal of carcinogenesis**, v. 5, p. 14, 2006.

WATTS, J. M.; TALLMAN, M. S. Acute promyelocytic leukemia: what is the new standard of care? **Blood reviews**, v. 28, n. 5, p. 205-212, 2014.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature reviews cancer**, v. 5, n. 8, p. 591, 2005.

WENG, C.J.; YEN, G.C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. **Cancer treatment reviews**, v. 38, n. 1, p. 76-87, 2012.

WEST, A. K. V.; WULLKOPF, L.; CHRISTENSEN, A.; LEIJNSE, N.; TARP, J. M.; MATHIESEN, J.; ODDERSHEDE, L. B. Division induced dynamics in non-Invasive and invasive breast cancer. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 3, p. 123a, 2017.

WHITE, B.; SMYTH, M. R.; STUART, J. D.; RUSLING, J. F. Oscillating formation of 8-oxoguanine during DNA oxidation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 22, p. 6604-6605, 2003.

WILBUR, S. B. **Toxicological profile for chromium**. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000.

WILDMAN, R. E. Nutraceuticals and. **Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods**, p. 1, 2016.

WÖLL, S.; KIM, S. H.; EFFERTH, T. Animal plant warfare and secondary metabolite evolution. **Natural products and bioprospecting**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2013.

WONG, W.; YIM, Y. M.; KIM, A.; CLOUTIER, M.; GAUTHIER-LOISELLE, M.; GAGNON-SANSCHAGRIN, P.; GUERIN, A. Assessment of costs associated with adverse events in patients with cancer. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0196007, 2018.

WRIGHT, G. D. Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic discovery. **Natural product reports**, v. 34, n. 7, p. 694-701, 2017.

WURZ, G. T.; KAO, C. J.; WOLF, M.; DEGREGORIO, M. W. Tecemotide: an antigen-specific cancer immunotherapy. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 10, n. 11, p. 3383-3393, 2014.

XU, X.; FARACH-CARSON, M. C.; JIA, X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. **Biotechnology Advances**, v. 15, n.32, p. 1256-1268, 2014.

YADAV, V. R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 295-309, 2011.

YAGMURCA, M.; BAS, O.; MOLLAOGLU, H.; SAHIN, O.; NACAR, A.; KARAMAN, O.; SONGUR, A. Protective effects of erdosteine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats. **Archives of medical research**, v. 38, n. 4, p. 380-385, 2007.

YASHIN, A.; YASHIN, Y.; XIA, X.; NEMZER, B. Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A Review. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 70, 2017.

YEE, M.K.; SEREIKA, S.M.; BENDER, C.M.; BRUFISKY, A.M.; CONNOLLY, M.C.; ROSENZWEIG, M.Q. Symptom incidence, distress, cancer-related distress, and adherence to chemotherapy among African American women with breast cancer. **Cancer**, v. 123, n. 11, p. 2061-2069, 2017.

YILDIZ, M.; CIGERCI, I. H.; KONUK, M.; FIDAN, A. F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 934-938, 2009.

YIN, C. C.; MEDEIROS, L. J.; BUESO-RAMOS, C. E. Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms—comments on the 2008 WHO classification. **International journal of laboratory hematology**, v. 32, n. 5, p. 461-476, 2010.

YORDI, E. G.; PÉREZ, E. M.; MATOS, M. J.; VILLARES, E. U. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. In: **Nutrition, well-being and health**. InTech, 2012.

YUET-PING, K.; DARAH, I.; YUSUF, U. K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7782-7791, 2012.

ZAFAR, S. Y.; PEPPERCORN, J. M.; SCHRAG, D.; TAYLOR, D. H.; GOETZINGER, A. M.; ZHONG, X.; ABERNETHY, A. P. The financial toxicity of cancer treatment: a pilot study assessing out-of-pocket expenses and the insured cancer patient's experience. **The oncologist**, v. 18, n. 4, p. 381-390, 2013.

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

ZHANG, Y. J.; GAN, R. Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; LI, A. N.; XU, D. P.; LI, H. B. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21138-21156, 2015.

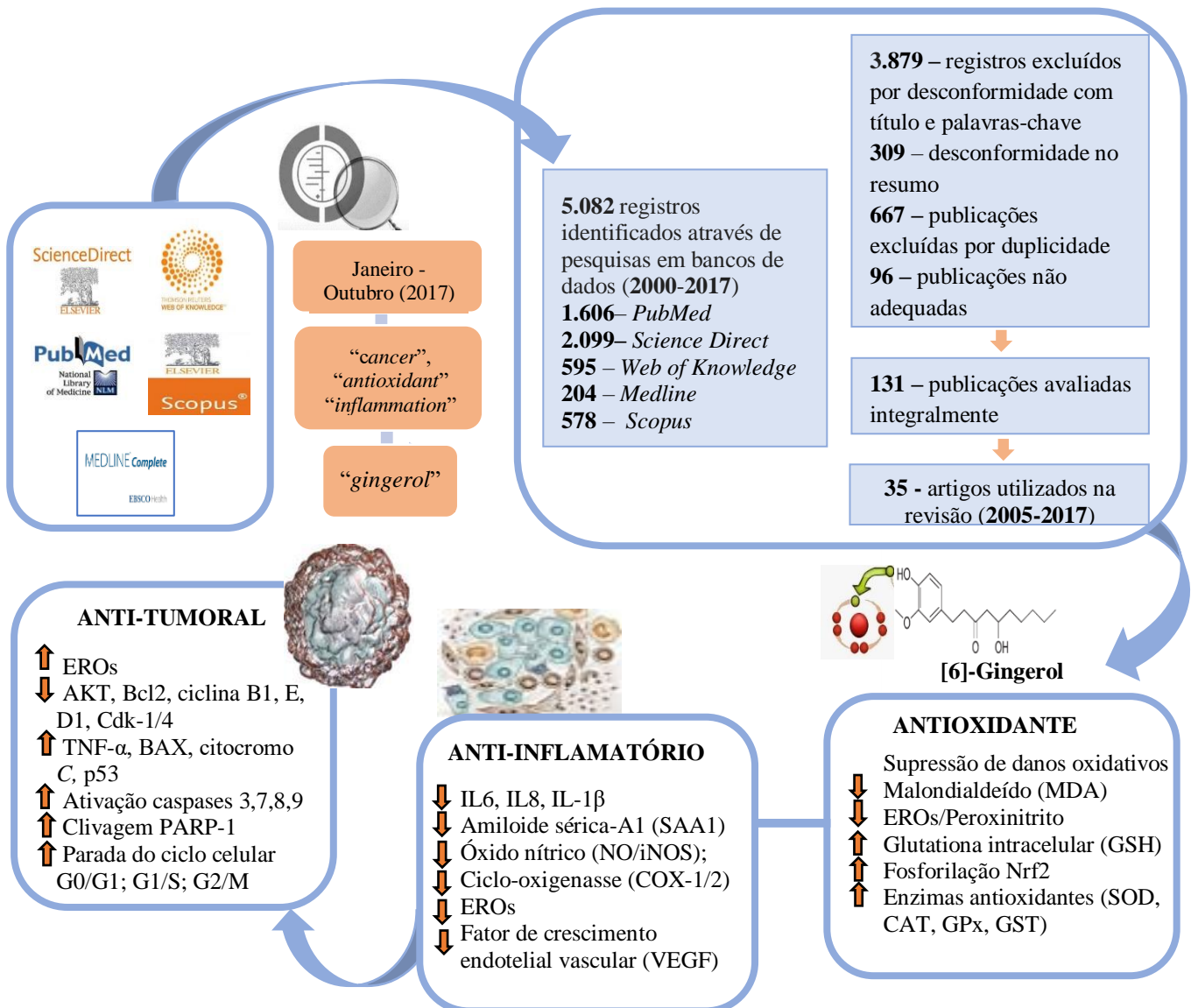
ZHANG, X. F.; TAN, B. K. H. Effects of an ethanolic extract of *Gynura procumbens* on serum glucose, cholesterol and triglyceride levels in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Singapore Medical Journal**, v. 41, n. 1, p. 9-13, 2000.

ZHU, Y.; WANG, F.; ZHAO, Y.; WANG, P.; SANG, S. Gastroprotective [6]-gingerol aspirinate as a novel chemopreventive prodrug of aspirin for colon cancer. **Scientific reports**, v. 7, p. 40119, 2017.

ZHU, Y. Y.; ZHOU, L.; JIAO, S. C.; XU, L. Z. Relationship between soy food intake and breast cancer in China. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 11, p. 2837-40, 2011.

ZIRAK, M. R.; RAHIMIAN, R.; GHAZI-KHANSARI, M.; ABBASI, A.; RAZMI, A.; MEHR, S. E.; DEHPOUR, A. R. Tropisetron attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. **European journal of pharmacology**, v. 738, p. 222-229, 2014.

CAPÍTULO 1



Potencial protetor e terapêutico do extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) e [6]-gingerol no câncer: Uma revisão abrangente

Protective and therapeutic potential of ginger (*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: A comprehensive review

Rosália Maria Tôrres de Lima; Antonielly Campinho dos Reis; Ag-Anne Pereira Melo de Menezes; José Victor de Oliveira Santos; José Williams Gomes de Oliveira Filho; José Roberto de Oliveira Ferreira; Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar; Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata; Ishaq N. Khan; Md. Amirul Islam; Shaikh Jamal Uddin; Eunüs S. Ali; Muhammad Torequl Islam; Swati Tripathi; Siddhartha Kumar Mishra; Mohammad S. Mubarak; Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante

Artigo publicado no periódico
Phytotherapy Research (ANEXO A)
QUALIS B1 – Biotecnologia (Fator de Impacto: 3.349)

Resumo

Agentes dietéticos naturais têm atraído considerável atenção devido às suas propriedades na promoção da saúde, incluindo a supressão do câncer. O gengibre apresenta em sua composição química, componentes pungentes que são constituintes biologicamente ativos desta espécie, o fitoquímico [6]-Gingerol se sobressai dentre tais compostos. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática por meio do levantamento de evidências em estudos experimentais e clínicos acerca do emprego do extrato de gengibre e [6]-Gingerol frente a processos tumorigênicos, oxidativos e inflamatórios associados ao surgimento e progressão da carcinogênese, com ênfase na identificação dos mecanismos de ação envolvidos nas principais vias de sinalização, a fim de investigar a performance protetora/terapêutica dos derivados do gengibre na regulação oxidativa e inflamatória durante o distúrbio metabólico, bem como propriedades antiproliferativas e anticancerígenas, que podem efetuar uma atribuição determinante na patogênese do câncer. Os dados extraídos dos estudos experimentais (*in vitro/in vivo*) e clínicos abordados na presente revisão indicam que o extrato de gengibre e/ou [6]-Gingerol atuam em mecanismos de resposta promissores, intervindo em importantes mediadores e vias de sinalização celular, incluindo Bax/Bcl2, p38/MAPK, Nrf2, p65/NF-K β , TNF- α , ERK1/2, SAPK/JNK, EROs/NFK β /COX-2, caspases-3,-9, p53, p21, p27, clivagem PARP, citocromo C, MMP2, MMP9, PI3K/AKT/MAPK/mTOR, ERK1/2, tais evidências sugerem que os derivados do gengibre, na forma de extrato ou isolado, apresentam relevantes efeitos antiproliferativos, antitumorais, anti-invasivos e anti-inflamatórios em enfermidades crônicas e carcinomas.

Palavras-chave: gengibre, extrato de gengibre, atividade anti-câncer, [6]-Gingerol.

1 INTRODUÇÃO

O câncer continua sendo um grave problema global, e apesar do surgimento de inúmeros aperfeiçoamentos tecnológicos e farmacêuticos nas últimas duas décadas (SEYED et al., 2016), estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), indicam que cerca de 600 mil novos casos de câncer poderão ser notificados no Brasil entre 2016 e 2017. Excluindo os casos de câncer de pele não-melanoma, os tipos mais frequentes em homens são próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%), enquanto em mulheres destacam-se mama (28,1%), intestino (8,6%), colo uterino (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) (INCA, 2016).

O câncer é um conjunto de instabilidades genéticas heterogêneas ligadas por alterações comuns nas múltiplas vias de sinalização celular (LUO et al., 2009), dessa forma, numerosos marcadores foram identificados como importantes mediadores em células cancerígenas, a evasão apoptótica é uma das principais mudanças que determinam o crescimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, outras características podem ser incluídas, como autossuficiência na sinalização de crescimento, incompatibilidade de energia celular, angiogênese sustentada, evasão da detecção imune e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LUO et al., 2009).

Os métodos de tratamento do câncer incluem cirurgia, radioterapia e drogas citotóxicas (quimioterapia), além de outras técnicas especializadas, pesquisas indicam que aproximadamente 90% -95% dos cânceres são devido ao estilo de vida, como consumo de álcool, obesidade, poluição e aditivos alimentares, sendo que 5% a 10% dos casos são ligados a fatores genéticos (RAUF et al., 2018). A terapia do câncer busca melhorar a qualidade de vida, prolongar a sobrevida do paciente e diminuir os efeitos colaterais. Assim, surgiu o conceito de “sobrevivência com câncer” (QI et al., 2015). Durante anos, as civilizações utilizaram a terapia complementar (ervas ou agentes dietéticos) para tratar diferentes tipos de câncer ao passo que podem interferir na sinalização de células tumorais (MARTIN, 2006), compostos naturais, em especial, advindos de especiarias e ervas, vislumbra a atenção de pesquisadores para o emprego de drogas alternativas no tratamento do câncer (KAEFER; MILNER, 2008).

Os principais constituintes fitoquímicos que apresentam atividades promissoras são os metabólitos secundários, estes são amplamente distribuídos no reino vegetal e têm apresentado grande importância como fonte preventiva e terapêutica na medicina, incluindo moléculas de fármacos anticâncer (KAUR et al., 2016). A utilização de fitoquímicos extraídos de plantas

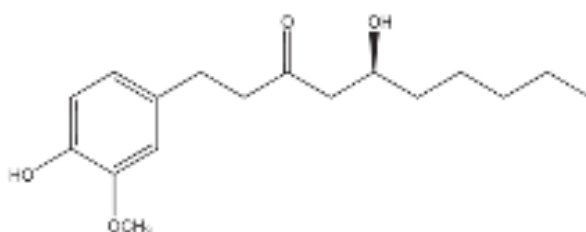
medicinais como agentes terapêuticos têm sido extensivamente estudados em vários países para tratar enfermidades que incluem inflamação, hipertensão, problemas renais, imunodeficiência e câncer (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Neste contexto, numerosos relatos indicam que as substâncias encontradas no gengibre podem ser eficazes na atenuação dos sintomas de distúrbios inflamatórios crônicos, bem como agentes antitumorais, antioxidantes, bactericidas e antivirais (MANASA; SRINIVAS; SOWBHAGYA, 2013), podendo fornecer uma ampla gama de opções preventivas e terapêuticas contra diferentes tipos de câncer. Além disso, as infusões preparadas a partir do gengibre (*Zingiber officinale*) são populares em vários países no tratamento de doenças (KHAKI; FATHIAZAD, 2012).

O gengibre é utilizado na medicina tradicional no tratamento de enfermidades gastrintestinais, como náuseas, vômitos, desconfortos abdominais e diarreia, e no tratamento de artrite, reumatismo, dor, desconforto muscular, doenças cardiovasculares e metabólicas, além dessas propriedades documentadas, estudos revelaram que o gengibre exibe propriedades anticancerígenas em uma ampla variedade de modelos experimentais (TUNTIWECHAPIKUL et al., 2010). Mais de uma centena de substâncias foram relatadas a partir do gengibre, estas são usadas na composição de produtos alimentícios, como bebidas gaseificadas, além de formulações farmacêuticas, o [6]-Gingerol, a principal substância encontrada no rizoma do gengibre tem mostrado várias atividades farmacológicas e fisiológicas interessantes, exibindo efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e cardiotônicos (KUBRA; RAO, 2012).

Os constituintes biologicamente ativos do gengibre incluem gingerol, shogaol, paradol e zingerona, sendo o [6]-Gingerol (**Figura 1**), reconhecido como o principal componente ativo, disponível em quantidades significativas no rizoma fresco, o [6]-Gingerol é responsável pela maioria das atividades farmacológicas descritas anteriormente (YOUNG; CHEN, 2002; CHANG; KUO, 2015). Por outro lado, o shogaol pode ser derivado dos gingeróis pela eliminação do hidroxilo C-5 e conseqüente formação de uma dupla ligação C-4 e C-5 (JIANG, 2005; SHUKLA; SINGH, 2007; BENZIE; WACHTEL-GALOR, 2011).

Figura 1 - Estrutura do [6]-Gingerol



JU e colaboradores observaram que a administração do [6]-Gingerol inibe o crescimento tumoral em vários tipos de tumores murinos, como melanoma (B16F1), células tumorais renais (RENCA) e cólon (CT26), em camundongos (JU et al., 2012). Uma mistura de extratos aquosos de cúrcuma, gengibre e alho mostraram potencial na eliminação de radicais livres e propriedades anticancerígenas em linhagens tumorais humanas de pulmão (MCF-7, ZR-75 e MDA-MB 231), a mistura de extratos também induziu apoptose em linhagens de câncer mamário, alterando a expressão de marcadores apoptóticos (p53 e caspase 9), além de apresentar um efeito pró-apoptótico sinergicamente melhorado quando combinado com o tamoxifeno em comparação ao extrato isolado (VEMURI et al., 2017).

A desregulação das vias de sinalização celular, causada pelo aumento ou diminuição da expressão de seus constituintes proteicos, pode desencadear o descontrole de eventos fisiológicos e desencadear vários tipos de doenças, incluindo o câncer, a transdução de sinal ocorre através de vias de sinalização, que geralmente são compostas de proteínas envolvidas na regulação de eventos celulares, como proliferação, migração e diferenciação celular (SOUZA et al., 2014). Componentes do gengibre quando usados em formulações de produtos para fins farmacológicos podem auxiliar na prevenção de doenças.

Com base nas informações supracitadas, e devido à ampla gama de opções preventivas e terapêuticas do gengibre frente a vários tipos de câncer, esta revisão enfoca no conhecimento atual da capacidade quimiopreventiva e terapêutica dos extratos de gengibre (EG) e [6]-Gingerol ([6]-G) contra diferentes tipos de câncer, juntamente com os mecanismos de ação envolvidos. Além disso, a presente revisão avalia os possíveis efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios associados ao desenvolvimento do tumor.

2 MÉTODOS

2.1 Estratégia de busca

Os estudos foram rastreados a partir das bases de dados eletrônicas *Science Direct*, *PubMed*, *Web of Knowledge*, *Medline* e *Scopus* no período de Janeiro a Outubro de 2017, empregando descritores de pesquisa, que incluem “*cancer*”, “*antioxidant*” e “*inflammation*” combinado com “*gingerol*”. As publicações que continham no título ou nas palavras-chave os termos descritos acima foram apreciados.

2.2 Seleção dos estudos para inclusão na revisão sistemática

Os estudos foram incluídos na revisão sistemática, se cumpridos os seguintes critérios: a) o estudo foi experimental *in vitro/in vivo*; b) o estudo foi clínico; c) o método de estudo incluiu a utilização do extrato de gengibre e/ou [6]-Gingerol; d) o método de estudo indicou as concentrações/doses empregadas e forma de administração; e) o estudo apontou os mecanismos de ação associados ao tratamento do extrato e isolado derivados do gengibre.

2.3 Extração de dados

Os dados de cada publicação que preencheram os critérios de inclusão foram extraídos quanto ao: sobrenome do primeiro autor, ano de publicação, tipo e método do estudo, substância isolada e/ou extrato de gengibre, concentrações testadas, mecanismo molecular envolvido e principais resultados obtidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estratégia de busca identificou 5.082 publicações, provenientes das bases de dados *PubMed* (1.606), *Science Direct* (2.099), *Web of Knowledge* (595), *Medline* (204) e *Scopus* (578). Três mil, oitocentos e setenta e nove (3.879) foram excluídos por análise do título e palavras-chave, por não estarem em conformidade com a combinação dos descritores, seiscentos e sessenta e sete (667) foram excluídos por duplicidade.

Na revisão sistemática (síntese qualitativa), cento e trinta e uma (131) publicações foram lidas integralmente, destas, noventa e seis (96) não estavam adequadas a proposta da revisão, uma vez que não apresentavam os mecanismos de ação associados ao tratamento do extrato e gengibre e [6]-Gingerol, trinta e cinco (35) artigos foram utilizados na presente revisão sistemática. Os estudos avaliados apresentaram intervalo de tempo entre 2000 – 2017, já os estudos que se enquadraram nos critérios pré-estabelecidos na referida revisão dataram de 2005 – 2017, expostos em ordem crescente do ano de publicação.

Procedimentos comuns na obtenção do extrato de gengibre envolvem hidrodestilação, destilação a vapor e extração com solvente. A extração com solvente empregando acetona resulta em alto teor de oleoresina de gengibre, que possui óleos essenciais, bem como os princípios pungentes e outros compostos não voláteis do gengibre (MCLAUGHLIN, 2005). Além disso, a obtenção de extrato de gengibre com acetona ou etanol resulta numa maior

quantificação de gingeróis (cerca de 33%); a extração empregando solventes com éter etílico, acetona e solventes hexânicos foi estabelecida o método preferido. Por outro lado, o extrato de gengibre obtido com acetato de etila mostrou ter potente atividade antioxidante, da mesma forma, a extração do gingerol assistida por microondas também é um processo eficiente, o que resulta em um aumento no conteúdo total de polifenóis e atividade antioxidante do extrato seco de gengibre quando comparado ao método de fluxo cruzado (KUBRA; RAO, 2012). Além disso, um estudo com foco nos procedimentos de extração de gingerol demonstrou que a temperatura de extração (50-80 °C) e o tempo de extração (2-4 h) também são aspectos importantes (GHASEMZADEH; JAAFAR; RAHMAT, 2015).

3.1 Papel das EROs no organismo e estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um papel intrigante em células de fenótipo normal ou atípico através de vários mecanismos. Em condições fisiológicas normais, a geração limitada de EROs auxilia na manutenção da homeostase celular com a ajuda de insulina, citocinas e muitos fatores de crescimento (SUNDARESAN et al., 1995), levando à regulação de cascatas de sinalização clássica, como ERK extracelular, JNK e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), incluindo as vias PI3-K / Akt, PLC- γ 1 e JAK / STAT (DROGE, 2002), essas vias, por sua vez, exercem seus efeitos fenotípicos, em grande parte, modulando as atividades dos fatores centrais de transcrição, incluindo NF- κ B, AP1, Nrf2, FoxOs, HIF-1 α e p53 (HAMANAKA; CHANDEL, 2010; TRACHOOTHAM et al., 2008), além disso, as atividades de enzimas como catalase, glutathiona peroxidase e peroxirredoxinas reguladas por quinases e fosfatases são suscetíveis à modificação oxidativa, criando assim uma rede de regulação (FLOHE, 2010; YU, 1994). Em altos níveis, as EROs podem promover danos a várias moléculas, incluindo o DNA, que podem desencadear o desenvolvimento da carcinogênese (LIOU; STORZ, 2010; SUNDARESAN et al., 1995; WARIS; AHSAN, 2006).

Em pacientes com câncer, o estresse oxidativo altera a expressão de genes que inibem a progressão do ciclo celular (chamados genes supressores de tumor) e, assim, aumenta a proliferação de células cancerígenas (AFANAS, 2014). Além disso, as EROs promovem a expressão de proteínas envolvidas no controle da inflamação, transformação celular, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase de células cancerígenas, desempenhando um papel importante na transformação de células normais em tumorais, a este respeito, níveis mais elevados de EROs foram identificados nas células tumorais quando comparados com células normais, em contrapartida, as espécies reativas de oxigênio

desempenham um duplo papel, podem matar as células cancerígenas ou promover a sobrevivência do tumor (GUPTA et al., 2012; KRYSTONA et al., 2011). Elevadas quantidades de EROs são detectadas em quase todos os tipos de câncer, onde promovem muitos aspectos relacionados ao desenvolvimento do tumor (LIOU; STORZ, 2010). Embora as EROs sejam pró-tumorigênicas, sua alta concentração pode ser tóxica até mesmo para as células cancerígenas. No entanto, as células tumorais também mantêm níveis elevados de expressão de proteínas antioxidantes que desintoxicam o excesso de EROs, isso indica um equilíbrio necessário de processos intracelulares de geração e extinção de ROS (NOGUEIRA; HAY, 2013).

3.2 Efeito antioxidante do [6]-Gingerol e EG

Os antioxidantes são quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações quando comparadas ao substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz, podendo ser encontrados naturalmente no organismo humano e em alimentos. Estes são responsáveis pela proteção do organismo contra a ação oxidativa dos radicais livres (DIAS; MOURA; D'ANGELIZ, 2010; MACHADO et al., 2008). Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicalares (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (KOURY; DONANGELO, 2003; CLARKSON; THOMPSON, 2000). Os radicais gerados a partir de antioxidantes não são reativos a ponto de propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; OMONI; ALUKO, 2005).

De acordo com seu método de ação, os antioxidantes ainda podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam suspendendo reação em cadeia dos radicais livres, por meio da concessão de hidrogênio ao radical e neutralização de elétrons, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis. Os antioxidantes secundários, por sua vez, agem retardando as etapas de iniciação da autooxidação, por diferentes mecanismos que incluem a retenção de oxigênio, complexação de metais, decomposição de hidroperóxidos para gerar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou inativação de oxigênio singletes (SOUSA et al., 2007).

No sistema enzimático de defesa antioxidante, estão presentes as enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, essas, podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos, reagindo com compostos oxidantes e protegendo as células e os tecidos do estresse oxidativo (GIUSTARINI et al., 2009). Em relação aos componentes não-enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se alguns minerais, como o cobre, manganês, zinco, selênio e ferro; vitaminas, tais como ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A; carotenoides, como o betacaroteno, licopeno e a luteína; bioflavonoides, como a genisteína e a quercetina (PAPAS, 1999).

Os produtos naturais contêm grande parte dos fitoquímicos e compostos fenólicos que estão associados a baixa ocorrência de câncer em humanos, e diversos estudos mostram que o consumo de alimentos com ação antioxidante é capaz de produzir uma ação efetiva contra processos oxidativos (YILDRIN; MAVI; KARA, 2001). O uso de extratos brutos e fitoquímicos isolados de plantas medicinais está se tornando mais aceitável e preferível devido possivelmente ao custo de produção, disponibilidade e acessibilidade, bem como menor toxicidade na maioria dos casos (YEHYA et al., 2017). Um grande número de antioxidantes naturais foi isolado de diferentes tipos de materiais vegetais, tais como sementes oleaginosas, cereais, legumes, frutas, folhas, raízes, temperos, ervas aromáticas, entre outras (JAYAKUMAR; THOMAS; GERALDINE, 2009). O [6]-Gingerol, um fenol de ocorrência natural obtido a partir do gengibre comestível (*Zingiber Officinale*), possui efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, eliminação de radicais livres de oxigênio, atividade antitumoral e antiendócrina, imunomoduladores, antiosteoartrite e efeitos antimicrobianos (OYAGBEMI; SABA; AZEEZ, 2010; SRINIVASAN, 2014; PRASAD; TYAGI, 2015).

Com base nos mecanismos antioxidantes, a **Tabela 1**, apresenta os efeitos protetores do extrato de gengibre (EG) e [6]-Gingerol ([6]-G), em estudos experimentais (*in vivo*, *in vitro*) e clínicos frente aos impactos decorrentes de agentes oxidantes. LEE et al., 2011, ao avaliarem o efeito do [6]-G em linhagem humana de neuroblasto (SHSY5Y) exposta ao peptídeo β -amilóide ($A\beta_{25-35}$), envolvido na formação de placas senis e marcador neuropatológico típico para a doença de *Alzheimer*, evidenciaram que o pré-tratamento com [6]-G (10 μ M) reduziu significativamente a citotoxicidade induzida por $A\beta_{25-35}$, verificou-se também redução dos níveis de malondialdeído (MDA), EROs, peroxinitrito ($ONOO^-$) e aumento de glutathione (GSH) intracelular, apontando dessa forma, supressão dos danos oxidativos e / ou nitrosativos induzidos pelo excesso de $A\beta_{25-35}$.

Verificou-se ainda, que o pré-tratamento com [6]-G suprimiu efetivamente o aumento da relação de Bax/ Bcl2 e reduziu a ativação de caspase-3, foi evidenciado aumento da

fosforilação, translocação nuclear e subsequente ativação transcricional do eritróide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) / elemento de resposta antioxidante (ARE) (LEE et al., 2011). Estes resultados sugerem que o [6]-G apresenta potencial preventivo e terapêutico que pode ser utilizado para o manejo da doença de *Alzheimer* por meio de sua atividade antioxidante.

Tabela 1 - Efeito antioxidante do extrato de gengibre (EG) e componente fitoquímico biologicamente ativo [6]-Gingerol ([6]-G).

Forma de utilização	Método de Estudo Dose/Concentração	Mecanismo de ação EG e/ou [6]-G	Estudo, ano
EG	<i>In vivo</i> – Ratos Wistar machos (N - 50) efeito do gengibre nos estágios de iniciação e pós-iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela 1,2dimetilhidrazina (DMH) – 15 semanas – via intraperitoneal Administração de EG (50 mg / kg / dia) - 28 dias – via oral - tubo gástrico	↓ peroxidação lipídica ↑ GSx, GST, GR, SOD e CAT;	MANJU; NALINI, (2005)
[6]-G	<i>In vitro</i> – Exposição da linhagem SHSY5Y ao A β ₂₅₋₃₅ , (2,5; 7,5; 20 μ M) e tratamento com [6]-G (10 μ M)	↓ citotoxicidade induzida por A β ₂₅₋₃₅ ↓ MDA, EROs, ONOO ⁻ , relação Bax/ Bcl2, caspase-3 ↑ GSH; Nrf2/ARE	LEE et al. (2011)
EG	<i>In vivo</i> – Ratos albinos Wistar (N - 8) machos com fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl ₄). Indução: CCl ₄ (0,5 mL.kg ⁻¹) via intraperitoneal, 6 semanas consecutivas, 2 vezes na semana Grupo EG: 200 mg.kg ⁻¹ – via oral	↑ GSH, SOD, SDH, LDH, G6Pase, AP e 5'NT ↓ MDA, AST, ALT, ALP, GGT e bilirrubina total	MOTAWI et al. (2011)
EG	<i>In vitro</i> – Tratamento da linhagem de cardiomiócito (H9c2) com extrato de gengibre (6-200 μ g.mL ⁻¹) + DOX (5 μ g.mL ⁻¹)	↓ MDA, EROs ↓ Apoptose induzida por DOX	HOSSEINI et al. (2014)
EG	<i>In vitro</i> – Tratamento da linhagens HaCaT e BJ empregando extrato de gengibre (40 μ g.mL ⁻¹)	↑ Nrf2 ↑ GSTP1 na linhagem BJ	SCHADICH et al. (2016)
EG	<i>In vivo</i> – Ratos Wistar machos (N - 10) Exposição à aflatoxina B1 (AFB1) 200 μ g.kg ⁻¹ – 28 dias alternados – via intraperitoneal Tratamento de EG (100 e 250 mg /kg/ dia) - 28 dias – via oral - tubo gástrico	↑ Nrf2, HO-1 ↑ enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST) ↓ MDA	VIPIN et al. (2017)
EG	<i>In vitro</i> – efeito do EG frente à aflatoxina B1 (AFB1) em linhagem de hepatoma humano HepG2. Pré-tratamento HepG2 com EG (0-200 μ g.mL ⁻¹) Exposição HepG2 a AFB1 (0-50 μ M)	↓ EROs	VIPIN et al. (2017)
[6]-G	<i>In vivo</i> – Ratos Sprague-Dawley (N-8) com lesão de reperfusão isquêmica intestinal (I/R) Pré tratamento com [6]-G 25 mg.kg ⁻¹ – 3 dias seguidos prévios a reperfusão – via oral	Inibição da via p38 MAPK ↑ SOD, GSH e GSHPx ↓MDA	LI et al. (2017)
[6]-G	<i>In vitro</i> - efeitos do [6]-Gingerol em linhagens Caco-2 e IEC-6 em condições de hipoxia/ reoxigenação (H/R) Pré-tratamento Caco-2 e IEC-6 com [6]-G (5, 10, 20, 40, 80 e 160 μ M)	↓ EROs Inibição da fosforilação de p38 MAPK, p65 NF-K β e MLCK.	LI et al. (2017)
EG / [6]-G padronizado	Clínico - 43 pacientes recém diagnosticados com câncer (19-grupo gengibre, 24-placebo) Administração de 2 cápsulas 2g/ dia - 3 dias-via oral anteriores ao primeiro ciclo e durante a quimioterapia até o quarto ciclo.	↑ enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GSH / GSSG) ↓ MDA ↓ NO2/NO3	DANWILAI et al. (2017)

Legenda: β -amiloide ($A\beta_{25-35}$), Glutaciona (GSH), glutaciona peroxidase (GSx), Glutaciona S-Transferase (GST), glutaciona redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), malondialdeído (MDA), peroxinitrito ($ONOO^-$), fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), elemento de resposta antioxidante (ARE), succinato desidrogenase (SDH), lactato desidrogenases (LDH), glucose-6-fosfatase (G6Pase), fosfatase ácida (AP), 5'nucleotidase (5'NT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamil transferase (GGT), doxorubicina (DOX), glutaciona-S-transferase P1 (GSTP1), catalase (CAT), glutaciona peroxidase-1 (GPx-1), miosinaquinase (MLCK), NO_2^- / NO_3^- (Nitrito / Nitrato).

Sob condições basais, Nrf2 é regulado principalmente pelo complexo Kelch-like ECH associado à proteína 1 (Keap1) Culina (Cul3) – Rbx 1 E3 ubiquitina ligase que medeia a degradação proteasomal de Nrf2. O estresse oxidativo leva a mudanças conformacionais no complexo Nrf2-Keap1-Cul3, que ativam Nrf2. O Nrf2 ativado transloca-se para o núcleo e se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) localizado na região promotora de genes alvo do Nrf2. A ligação de Nrf2 ao ARE resulta na ativação sincronizada de uma bateria de enzimas de desintoxicação e antioxidantes. Observou-se que os fitoquímicos presentes nos alimentos reagem especificamente com os resíduos de cisteína de Keap1, levando a uma alteração conformacional, o que resulta numa marcação diminuída de Nrf2 para a proteólise (NITURE; JAISWAL, 2012; DUAN et al., 2016). A expressão de Nrf2 e seus genes a jusante é aumentada pelo tratamento com fenóis (gingerol/shogaol) de gengibre (BAK et al., 2012).

Ao avaliar os efeitos dos fenóis presentes no extrato de gengibre sobre a ativação da via Nrf2-ARE e a expressão da enzima de desintoxicação de fase II glutaciona-S-transferase P1 (GSTP1) em células de queratinócitos imortalizados (HaCaT) e fibroblastos de prepúcio (BJ), SCHADICH et al. (2016) verificaram aumento significativo do nível de atividade do Nrf2. Entretanto, em contraste aos níveis aumentados tanto de Nrf2 como de sua enzima efetora GSTP1 alvo a jusante em células BJ tratadas com extrato de gengibre, o nível aumentado de Nrf2 em células HaCaT tratadas não foi associado a um nível aumentado da enzima GSTP1.

A regulação de Nrf2 independente da expressão de GSTP1 em células HaCaT pode ter evoluído seletivamente com elevada capacidade de proliferação durante a imortalização. Como a imortalização é também um primeiro passo de carcinogênese e uma variedade de células de câncer humanas, incluindo células cancerígenas de mama, cólon, rim, pulmão e ovário, compartilham instabilidade genômica, perda de genes de senescência, mutação da p53 e alta taxa de proliferação, mas também a expressão constitutivamente alta de GSTP1 (HOWELLS et al., 2004; TIDEFELT et al., 1992; YAMAMOTO et al., 2013), o papel de GSTP1 em células HaCaT pode ser distinto das células normais (SCHADICH et al., 2016).

Embora a citoproteção fornecida pela ativação de Nrf2 seja importante para a quimioprevenção do câncer em tecidos normais e pré-malignos, nas células tumorais, a atividade de Nrf2 proporciona vantagem de crescimento ao aumentar a quimiorresistência do câncer e aumentar o crescimento de células tumorais. A proteína Nrf2, constitutivamente

abundante, causa maior expressão de genes envolvidos no metabolismo do fármaco, aumentando assim a resistência a medicamentos quimioterápicos e à radioterapia. Além disso, o alto nível de proteína Nrf2 está associado a um mau prognóstico no câncer (SPORN; LIBY, 2012). O Nrf2 hiperativo também afeta a proliferação celular direcionando glicose e glutamina para caminhos anabolizantes, aumentando a síntese de purina e influenciando a via de fosfato de pentose para promover a proliferação celular (MITSUISHI et al., 2012).

O equilíbrio metabólico do oxigênio no meio intracelular é mantido por enzimas antioxidantes, conhecidas também como enzimas de fase II de desintoxicação, como a enzima heme oxigenase 1 (HO-1). A produção dessas enzimas ocorre por meio da ativação da via de sinalização antioxidante Nrf2 / ARE, por meio de diversas substâncias pesquisadas com potencial antioxidante (LEE et al., 2015; XIA et al., 2015). VIPIN et al. (2017), demonstraram que o tratamento prévio com EG protege as células HepG2 contra a citotoxicidade induzida por aflatoxina B1 (AFB1), por meio da inibição da geração de EROs, danos ao DNA e morte celular. Similarmente, modelos experimentais com ratos Wistar machos demonstraram efeitos protetores do EG contra a hepatotoxicidade induzida por AFB1, através da melhoria dos níveis de enzimas antioxidantes e o up-regulation da via Nrf2 / HO-1. As propriedades hepatoprotetoras do EG podem ser devido a efeitos sinérgicos de diferentes compostos fenólicos presentes na mesma. De acordo com WANG et al. (2016) as substâncias antioxidantes atuam inibindo a produção excedente de EROs.

A indução da sinalização Nrf2 é associada com a prevenção da hepatotoxicidade tanto *in vivo* como *in vitro*. Nrf2 é principalmente expressa em órgãos metabolicamente ativos, como o fígado. Portanto, Nrf2 é considerado como um alvo terapêutico chave para a prevenção e tratamento de doenças hepáticas (LEE; SURH, 2005), (EGGLER; GAY; MESECAR, 2008), (ZHU et al., 2016). Além disso, o Nrf2 é importante em doenças crônicas que envolvem estresse oxidativo, como doenças inflamatórias, neurodegenerativas e câncer (KENSLER et al., 2007, KASPAR, 2010).

O estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na lesão intestinal H/R (WEN et al., 2013). As EROs podem ser geradas em células e tecidos danificados e desencadeiam a ativação de uma variedade de vias de sinalização, promovendo reação inflamatória, e danificando a função de barreira da mucosa intestinal no processo de H/R (BHATTACHARYYA et al., 2014; WEN et al., 2013). A via de sinalização da proteína quinase p38 ativada por mitogénio (p38 MAPK) medeia a resposta inflamatória, apoptótica e diferenciação em condições de estresse, incluindo lesões H/R (COULTHARD et al, 2009; YONG et al., 2009; ZHANG et al., 2007).

Em condições de estresse, a p38 intracelular pode ser transferida para o núcleo e a expressão dos genes envolvidos na regulação dos fatores de transcrição é regulada pela fosforilação (WEHNER et al., 2009; YANG et al., 2015). A cinase de cadeia leve de miosina (MLCK) é uma proteína quinase estreitamente relacionada com a função de barreira. A fosforilação da cadeia leve da miosina mediada por MLCK está intimamente relacionada com a contração do citoesqueleto e a disfunção da junção estanque, podendo prejudicar a função de barreira da mucosa intestinal (CUNNINGHAM; TURNER, 2012; SU et al., 2013; AL-SADI et al., 2013). A via p38 MAPK encontra-se envolvida na modulação mediada por MLCK na função de barreira (AL-SADI et al., 2013; ARAKI et al., 2005; ZOU et al., 2015).

A expressão das proteínas NF- κ B, MAPK e MLCK foi significativamente aumentada em células Caco2 (adenocarcinoma de cólon humano) e IEC6 (epitélio intestinal normal murino) sob condições H/R, no entanto, o pré-tratamento com [6]-G exerceu efeitos inibitórios dependentes da concentração. A fosforilação da p65 que é uma subunidade crítica na modulação da translocação nuclear de NF- κ B, foi suprimida por [6]-G, também foi observado supressão da expressão da proteína MLCK e na fosforilação de P38 MAPK em células Caco2 e IEC6 pré tratadas com [6]-G de forma dependente da concentração, implicando o papel importante na supressão de p38 MAPK induzida por [6]-G em modelo H/R. As evidências indicam que fármacos que possuem as propriedades na melhoria do estresse oxidativo, aliviando a inflamação e dor, inibindo o crescimento de bactérias e modulando a disfunção de barreira são benéficos para a melhoria da lesão intestinal (LI et al., 2017).

Os níveis de superóxido dismutase (SOD), glutathiona (GSH) e glutathiona peroxidase (GSHPx) foram significativamente diminuídos e o nível de MDA aumentou acentuadamente no grupo (Reperfusão Intestinal) I / R sem tratamento em comparação com os grupos tratados com [6]-G (50 mg.kg⁻¹), este diminuiu o nível de peroxidação lipídica (MDA) e regulou a diminuição dos biomarcadores de capacidade antioxidante como SOD, GSH e GSHPx, sugerindo que a supressão do estresse oxidativo está envolvida em prevenção induzida por [6]-G contra lesões intestinais (LI et al., 2017).

O Tetracloreto de Carbono (CCl₄) é uma conhecida hepatotóxina muito usada na indução de lesão hepática tóxica em animais de laboratório (LEE et al., 2007; AMÁLIA, 2007; PEREIRA-FILHO et al., 2008). A fase inicial envolve o metabolismo do CCl₄ pelo Citocromo P-450 à radical triclorometil, parte do radical triclorometil gera o radical triclorometil-peroxil, que conduz a peroxidação lipídica (AMÁLIA, 2007). Em avaliação *in vivo* realizada por MOTAWI et al., (2011), o tratamento empregando EG em ratos Wistar com fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄), evidenciou-se aumento significativo nos níveis

GSH, SOD, SDH, LDH, G6Pase, AP e 5'NT. No entanto, MDA, AST, ALT, ALP, GGT e bilirrubina total foram significativamente diminuídas. A suplementação com gengibre nos estádios de iniciação e pós-iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela 1,2 dimetilhidrazina (DMH), aumentou significativamente as concentrações antioxidantes não enzimáticas e enzimáticas em comparação ao grupo não suplementado com extrato de gengibre (MANJU; NALINI, 2005).

Em estudo empregando cápsula de EG padronizada com 5 mg de [6]-G (1,4% p / p de extracto de gengibre), onde pacientes distribuídos aleatoriamente receberam duas cápsulas de [6]-G/5 mg ou duas cápsulas de placebo duas vezes por dia a partir de 3 dias prévios ao primeiro ciclo de quimioterapia e continuaram a administração até quarto ciclo de quimioterapia, evidenciou-se que os parâmetros de atividade antioxidante, incluindo SOD, CAT, GPx e GSH / GSSG, estavam significativamente aumentados no dia 64 no grupo de gengibre em comparação com os do grupo de placebo, enquanto MDA e $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ níveis foram significativamente menores. O suplemento diário de extrato de gengibre iniciado 3 dias antes da quimioterapia demonstrou elevar significativamente a atividade antioxidante e reduzir os níveis de marcador oxidativo em pacientes que receberam quimioterapia com potencial emetogênico de moderado a alto em comparação com o placebo (DANWILAI et al., 2017).

A doxorubicina (DOX) é um componente importante na terapia multimodal dos vários protocolos combinados de antineoplásicos na quimioterapia, no entanto, apesar da alta eficácia, o principal efeito secundário da DOX é a cardiotoxicidade, o que tem dramaticamente impedido o seu uso clínico por um período prolongado. Existem muitas evidências que mostram os efeitos protetores de compostos naturais contra a cardiotoxicidade relacionada à lesão oxidativa, tais compostos diminuem alguns efeitos secundários de agentes quimioterapêuticos em células normais, reduzindo a sua genotoxicidade (WU et al., 2002; BRYANT et al., 2007). Em pesquisa realizada por HOSSEINI; SHAFIEE-NICK; MOUSAVI (2014), sobre os efeitos protetores do extrato de gengibre contra a toxicidade induzida por DOX em cardiomiócitos (H9c2), foi possível verificar redução do nível de peroxidação lipídica, ERO e supressão apoptótica em H9c2 induzida pela doxorubicina.

3.3 Inflamação e câncer

A inflamação trata-se de uma resposta imune protetora de um organismo vascular que auxilia na remoção de estímulos nocivos internos e/ou externos e opera na manutenção da homeostase do tecido (SERHAN, 2014). A reação inflamatória compreende basicamente dois mecanismos de defesa: uma resposta inespecífica (resposta inata) e uma resposta imune específica (resposta adquirida) (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). No início da resposta inflamatória devido a uma agressão do tecido, as células inflamatórias invasivas produzem vários mediadores pró-inflamatórios que aumentam o grau da inflamação local e sistêmica (MELO et al., 2007) que vai depender do tipo de infecção (bacteriana, viral ou parasitária) (MEDZHITOV, 2010).

Uma infecção ou uma lesão local em qualquer tecido atrai de forma rápida as células brancas do sangue para a região afetada como parte da resposta inflamatória, que ajuda a combater a infecção ou cicatrização da lesão (ALBERTS et al., 2010). Contudo, nem sempre a resposta inflamatória inicial é suficiente e o processo pode evoluir para um estado de inflamação crônica (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Se o agente que provocou a infecção não é completamente eliminado pela resposta inflamatória aguda, ou persiste por alguma razão, talvez a fase de resolução não tenha sido devidamente induzida, podendo resultar um estado de inflamação crônica. Este estado pode ser causado por infecções crônicas, alergênicos persistentes ou partículas estranhas (MEDZHITOV, 2010).

Embora os sintomas e sinais de inflamação crônica não sejam tão severos quanto os da inflamação aguda, a inflamação crônica é tipicamente mais arriscada, pois pode causar danos adicionais, como fibrose, e pode causar doenças crônicas e sistêmicas, como artrite reumatóide, asma, diabetes, inflamação intestinal, doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos (*Alzheimer*), degeneração muscular relacionada à idade e câncer (MANTOVANI et al., 2008; BALKWILL, 2008; SERHAN; PETASIS, 2011).

A inflamação crônica está ligada a várias fases da tumorigênese, como proliferação celular, transformação, evasão de apoptose, sobrevivência, invasão, angiogênese e metástase (DEMARIA et al., 2010; MANTOVANI et al., 2008; AGGARWAL et al., 2006). A inflamação também é conhecida por contribuir com a carcinogênese através da geração de EROs e espécies de nitrogênio reativo que podem danificar o DNA no local do tumor (OHNISHI et al., 2013).

O meio inflamatório promove um microambiente celular que favorece a expansão das aberrações genômicas e a iniciação da carcinogênese (MANTOVANI, 2009). Estudos sugerem que aproximadamente 25% dos cânceres têm origem etiológica na inflamação e/ou infecção

crônica (KUNDU; SURH, 2012). No microambiente tumoral, as células inflamatórias são induzidas para acelerar a progressão do câncer, metástases e respostas imunes contra radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (GAJEWSKI; SCHREIBER; FU, 2013). Portanto, a direção do microambiente inflamatório é uma direção razoável para o tratamento do câncer (ZHANG; ZHU; LI, 2017).

3.4 Mediadores do processo inflamatório no microambiente tumoral

A inflamação aguda procura reparar tecidos lesionados e eliminar elementos indesejados, o resultado ideal da inflamação aguda é uma resolução completa e rápido retorno à homeostase do tecido. Em condições normais, as células imunes, incluindo macrófagos, granulócitos, mastócitos, células dendríticas, linfócitos inatos e células Natural Killer (NK) servem como defesa na linha de frente contra patógenos (COUSSENS; ZITVOGEL; PALUCKA, 2013; SERHAN, 2014). No entanto, quando esses processos são iniciados no microambiente do tumor, estes não são solucionados, o que leva à inflamação crônica do tecido "danificado" (tumor). Dessa forma, enquanto a inflamação aguda normalmente suporta e equilibra duas necessidades opostas para o reparo de tecidos danificados (apoptose e cicatrização de feridas), a inflamação crônica representa uma perda desse equilíbrio e a resultante confluência de fatores tem implicações deletérias para o sistema imunológico (KHATAMI, 2009).

Os mecanismos pelos quais a inflamação contribui para a carcinogênese são inúmeros, e para além destes processos bioquímicos que se encontram alterados, poderá existir uma expressão elevada, superprodução ou ativação anormal de diversos mediadores inflamatórios, com as citocinas, quimiocinas, ciclo-oxigenase-2, prostaglandinas (PGs), óxido nítrico-sintase (iNOS), óxido nítrico (NO) e produtos de glicosilação avançada (KUNDU; SURH, 2012).

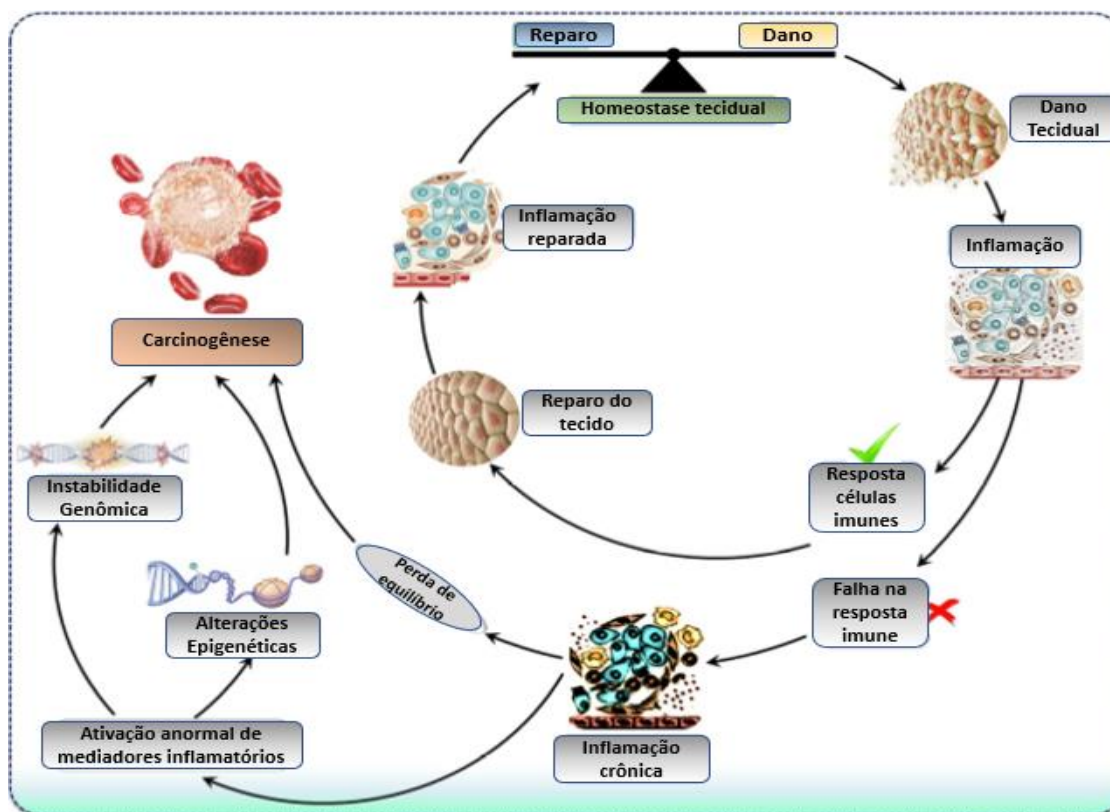
As respostas inflamatórias crônicas associadas aos ambientes tumorais têm um papel multifacetado na carcinogênese. De fato, a inflamação crônica contribui para a aquisição de diferentes características de marca registrada por neoplasmas incipientes. As células inflamatórias podem induzir instabilidade genômica, alterações nos eventos epigenéticos e conseqüente expressão genética inapropriada (COLOTTA et al., 2009; KUNDU; SURH, 2008). Durante a progressão do tumor, as células imunes e inflamatórias produzem citocinas e quimiocinas, o que facilita a sobrevivência e a proliferação de células cancerígenas, além da promoção da angiogênese e crescimento tumoral (MANTOVANI, 2005). Citocinas e quimiocinas também induzem recrutamento adicional e diferenciação de células imunes no

microambiente do tumor (LIN; KARIN, 2007). A regulação genética que leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias a partir de uma variedade de células é geralmente dependente da ativação transcricional do fator nuclear-kappa B (NF- κ B) (FREIRE; VAN DYKE, 2014), este fator poderia ser considerado como um "núcleo" na tumorigênese que liga a senescência celular, inflamação e câncer (AGGARWAL; GEHLOT, 2009).

A inflamação é caracterizada por um aumento geral nos níveis plasmáticos e na capacidade celular para produzir citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), aumento subsequente dos principais marcadores inflamatórios, como a proteína C-reativa (CRP) e a amiloide sérica A (A-SAA) (FRANCESCHI et al., 2000; FRANCESCHI, 2007). O fator de necrose tumoral (TNF - Tumor Necrosis Factor) conhecido pela sua citotoxicidade tumoral trata-se de um relevante mediador de inflamação e apresenta inúmeras funções fisiológicas. Este fator está presente no tratamento de inúmeras doenças inflamatórias humanas, sendo uma citocina envolvida em inflamações sistêmicas e estimulam a reação de fase aguda (SEDDER; MCDERMOTT, 2014).

Os produtos derivados da COX-2, principalmente prostaglandina (PG) E2 (que se pensava ser o principal produto derivado de COX-2 tumorigênico), são conhecidos por atuar não apenas em caminhos clássicos de sinalização de câncer para promover a carcinogênese em células tumorais primárias, mas também no microambiente tumoral que contém múltiplas células residentes e infiltrantes (incluindo células imunes), bem como os fatores de crescimento e citocinas liberados por eles (HANAHAN; WEINBERG, 2011; BONACCIO et al., 2014). Conseqüentemente, a relação entre a inflamação e o câncer que promove tumores é importante considerar. O fator inibidor da migração de macrófagos, a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), NF- κ B, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), Akt e quimiocinas são alvos importantes que podem ser adequados para um abordagem terapêutica multifacetada na supressão da inflamação (BLOCK et al., 2015). No geral, os mecanismos que envolvem ativação anormal da inflamação mediadores que contribuem para o desenvolvimento do microambiente tumoral estão representados na **Figura 2**.

Figura 2 - Mecanismos envolvendo ativação anormal de mediadores inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento do microambiente tumoral.



Com base nos mecanismos anti-inflamatórios, a **Tabela 2**, apresenta os efeitos supressores do EG e [6]-G na resposta do processo inflamatório associado a doenças crônicas e sistêmicas, com ênfase na carcinogênese, em estudos experimentais (*in vivo*, *in vitro*) e clínico frente aos impactos oriundos de fatores liberados durante o quadro de inflamação crônica, HABIB et al., 2008, observaram que o EG reduziu significativamente a expressão elevada de NF- κ B e TNF- α em ratos do tipo Wistar com câncer hepático, sugerindo que o gengibre pode atuar como um agente anticancerígeno e anti-inflamatório inativando o NF- κ B através da supressão do TNF- α pró-inflamatório. Embora este fator esteja expresso em um estado inativo na maioria das células, as células cancerígenas expressaram uma forma ativada de NF- κ B, que foi induzida por vários estímulos inflamatórios e carcinogênicos (LIN; KARIN, 2003). TNF α , interleucinas, COX2 e outras quimiocinas também podem ser reguladas pelo fator de transcrição NF- κ B (BALKWILL, 2002). Muitos estudos associaram a via de sinalização NF- κ B e sua regulação com a resposta inflamatória (LIN; KARIN, 2003; ESCARCEGA et al., 2007). A inibição da via de sinalização NF- κ B pode ser uma estratégia terapêutica em conjunto com o uso de agentes quimiopreventivos, assim como o gengibre (SURH, 2003; KIM et al., 2004).

Tabela 2 - Efeito anti-inflamatório do extrato de gengibre (EG) e componente fitoquímico biologicamente ativo [6]-Gingerol ([6]-G).

Forma de Utilização	Método de Estudo Dose/Concentração	Mecanismo de ação	Estudo, ano
EG	<i>In vivo</i> – efeito do gengibre em hepatocarcinogênese induzida por etionina, ratos Wistar machos (N - 6) Indução de câncer hepático com etionina – 15 semanas – via intraperitoneal Controle ração/azeite; EG (100 mg.kg⁻¹); dieta (CDE) deficiente em colina + 0,1% etionina; gengibre +CDE. 8 semanas- via oral	↓NF-κβ ↓TNF-α	HABIB et al. (2008)
EG	<i>In vivo</i> – caracterizar os possíveis efeitos anti-inflamatórios do extrato de gengibre induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos fêmeas (N-5) Pré tratamento com Extrato de gengibre 100, 1000 mg.Kg⁻¹ – 3 dias seguidos - via oral 3º dia – administração LPS - 35mg.kg ⁻¹ - via intraperitoneal	↓ ativação IFNγ, IL-6, NF-κB, IκB-α ↓ expressão MAPKs (ERK1/2, SAPK/JNK e p38) ↓ expressão iNOS e COX-2	CHOI et al. (2013)
EG	Clínico – verificar a eficácia do EG na regulação de PGE ₂ em pacientes com risco normal e aumentado de CRC Administração de 8 cápsulas 250 mg/cada por 28 dias, seguida de biópsia tecido cólon Grupo normal (N-30); risco aumentado – CRC (N-20)	↓ COX1 (grupo com risco aumentado CRC);	JIANG et al. (2013)
[6]-G	<i>In vitro</i> – efeito do [6]-G em linhagem de hepatócito (HuH7) humana, viabilidade celular [6]-G (50, 100 e 200 μ M) HuH7 exposta a citocina IL1β (8 ng / mL) e tratada com [6]-G (100 μM)	↓ IL6, IL8, SAA1, COX, NF-κ B, ERO Inibição via EROs / NFκB / COX-2	LI et al. (2013)
[6]-G	<i>In vitro</i> – Efeitos do [6]-G em linhagem tipo osteoblasto MG63 humano Exposição da linhagem MG63 (1 x 10 ⁵) ao pré tratamento TNF-α (10 ng.mL ⁻¹) e tratamento [6]-Gingerol (0, 1, 5, 10, 50 μM)	↑ enzima ALP	FAN; YANG; BI, (2015)
EG padronizado com 5% 6-G	<i>In vivo</i> - Ratos albinos Wistar de ambos os sexos (N-15) Indução diabetes: dose única de STZ 45 mg / kg – via intraperitoneal Tratamento: 75 mg / kg / dia / 24 semanas - via oral	Grupo tratado EG/5% [6]-G ↓ TNFα ↓ NF-κβ p65 ↓ VEGF	DONGARE et al. (2016)
[6]-G	<i>In vitro</i> – efeito do [6]-Gingerol frente ao LTA 4 H em linhagem tumoral humana (HCT116) e células normais (TIG1 e HF19) expostas a [6]-G (6,25; 12,5; 25,5 e 100 μM)	Inibição da atividade LTA 4H	EL-NAGGAR et al. (2017)

[6]-G	In vivo –caracterizar os possíveis efeitos protetores do [6]-G em lesão de reperfusão intestinal (I/R). Ratos Sprague-Dawley (N=40) Pré tratamento com [6]-G 25 mg.kg⁻¹ - via intragástrica – 3 dias seguidos antes da reperfusão	Inibição da via p38 MAPK Inibição de citocinas inflamatórias (TNF α , IL-1 β e IL6) e mediadores (NO / iNOS)	LI et al. (2017)
-------	--	--	------------------

Legenda: Leucotrieno A 4 hidrolase (LTA 4H), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL6), óxido nítrico sintase (iNOS), óxido nítrico (NO), fosfatase alcalina (ALP), Ciclo-oxigenase-1 (COX-1), Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), câncer colorretal (CRC), Interferon-gama (IFN- γ), fator nuclear kappa B (NF- κ B), Inibidor kappa B (I κ B α), interleucina 8 (IL 8), Amiloide sérica A (SAA1); estreptozotocina (STZ); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), prostaglandina E₂ (PGE₂)

O lipopolissacarídeo (LPS), principal constituinte da parede celular externa das bactérias Gram-negativas, tem sido amplamente utilizado para examinar os mecanismos de inflamação que produzem necrose hepática típica seguida de insuficiência hepática fulminante (VINCENT et al., 2002). Foi relatado que, sob a estimulação do LPS, células de Kupffer liberam citocinas pró-inflamatórias (BOLLING et al., 2001). A ativação do fator nuclear B (NF- κ B) induzida por LPS medeia as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e posteriormente regula as expressões de ciclo-oxigenase (COX- 2), bem como as expressões induzíveis de óxido nítrico sintase (iNOS) (MESTRE et al., 2001). Além disso, a expressão de COX-2 e iNOS provou contribuir com doenças inflamatórias (JACOBS; IGNARRO, 2001). Portanto, essas citocinas representam um alvo ideal para a neutralização do LPS (WYCKOFF et al., 1998). A utilização prolongada de medicamentos anti-inflamatórios está associada a efeitos colaterais como febre, rubor facial e músculos doloridos. A utilização de um produto natural para tratar doenças inflamatórias pode ser mais efetivo e ter menos efeitos colaterais (WONG et al., 2003).

Níveis elevados de prostaglandina E (PGE) no tecido, produzida por ciclo-oxigenase (COX) é um evento precoce no câncer colorretal (CRC). JIANG et al.(2013) observaram não haver diferença significativa na expressão da proteína COX1 entre os grupos de gengibre e placebo para os participantes de risco normal. Entretanto, os resultados indicam que, para os pacientes com risco aumentado de CRC, a expressão protéica de COX1 nas biópsias do cólon foi significativamente inibida pelo consumo de extrato de raiz de gengibre após 28 dias de intervenção em comparação com o grupo placebo.

Células normais e tumorais compartilham a mesma origem, por isso, é difícil desenvolver medicamentos seletivos que são baseados em diferenças bioquímicas entre células tumorais e normais. Pesquisadores precisam de uma nova perspectiva e, por essa razão, as vias de sinalização estão sendo investigadas intensamente para ganhar terreno na luta contra o câncer. A inibição da prostaglandina E2 sintase-1 microsomal (mPGES1) e a antagonização dos receptores do seu produto prostaglandina E2 (PGE2) são consideradas alvos terapêuticos

potenciais para células cancerígenas que super expressam a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (READER et al., 2011). Eventualmente a carcinogênese é promovida pela PGE 2 por via de GSK3 β / β catenina, dessa forma, espera-se que a diminuição do nível de PGE-2 utilizando inibidores de mPGES-1 podem mostrar efeito anticancerígeno promissor (RUANA; SO, 2014).

Em estudo realizado por LI et al. (2013), onde células humanas de hepatócito HuH7 foram estimuladas com IL-1 β para estabelecer um modelo inflamatório hepático *in vitro*, verificou-se que o fitoquímico [6]-G atenuou a inflamação induzida pela IL-1 β e o estresse oxidativo nas células HuH7, como evidenciado pela diminuição dos níveis dos fatores inflamatórios IL6, IL8 e SAA1, além da supressão na geração de EROs. O [6]-G também reduziu a regulação positiva de COX-2 induzida por IL-1 β , bem como a atividade de NF- κ B. O efeito protetor do [6]-G com a resposta inflamatória induzida por IL-1 β foi semelhante ao da BHT, um eliminador de EROs. Dessa forma o [6]-G demonstrou proteger células HuH7 contra danos inflamatórios induzidos por IL1 β por meio da inibição da via EROs / NF κ B / COX2.

FAN; YANG; BI, (2015), ao investigarem se o [6]-G apresenta modulação sobre a produção de IL-6 em osteoblastos, fato que sugere impacto significativo na osteogênese, observaram que o TNF- α aumentou 25 vezes no nível de IL-6 em células MG-63, enquanto o tratamento com [6]-G reprimiu significativamente a elevação da IL-6 induzida por TNF- α em células MG-63. As análises de imunotransferência mostraram que o TNF- α induziu um aumento significativo na translocação nuclear de NF- κ B p65 em células MG-63, no entanto, o [6]-G (5, 10 e 50 μ M) inibiu o aumento da translocação nuclear NF- κ B p65. Os efeitos do [6]-G sobre a diferenciação de osteoblastos foi verificado medindo a expressão e a atividade enzimática da fosfatase alcalina ALP, que está envolvida no estágio de maturação dos osteoblastos. O tratamento com [6]-G aumentou a atividade enzimática de ALP em células MG-63 de uma maneira dependente da dose, enquanto, a atividade de ALP foi significativamente reduzida em resposta à estimulação de TNF- α (10 ng.mL⁻¹).

Em investigação a respeito da eficácia do EG padronizado com 5% de [6]-G, DONGARE et al. (2016), evidenciaram atenuação das alterações microvasculares da retina em ratos albinos Wistar diabéticos induzidos por estreptozotocina. A administração oral do extrato reduziu os níveis do marcador pró-inflamatório TNF α , expressão de NF κ B e VEGF no tecido da retina do grupo tratado com [6]-G em comparação com o grupo diabético.

Durante o processo de carcinogênese, as células inflamatórias infiltrantes de tumores produzem vários tipos de citocinas. Foi proposto que citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL 1 β , IL-6 e Interferão- γ (IFN- γ) contribuem para a carcinogênese influenciando a sobrevivência, crescimento, mutação, proliferação, diferenciação e movimento de células

tumorais. Muitas citocinas pró-inflamatórias podem ativar o fator de transcrição NFκB, enquanto alguns dos efeitos de citocinas pró-inflamatórias podem ser mediadas através da via NFκB. TNF-α foi implicado na promoção do tumor em vários modelos experimentais de carcinogênese (PHILIP; ROWLEY; SCHREIBER, 2004; AGGARWAL, 2003).

Os efeitos protetores do pré-tratamento com [6]-G em citocinas pró-inflamatórias (TNFα, IL6, IL1β) e infiltração de neutrófilos (MPO) foram observados em tecidos intestinais com lesão de reperfusão isquêmica (IR). O pré-tratamento com [6]-G atenuou significativamente estas citocinas de uma forma dependente da dose, inibiu a expressão de mediadores inflamatórios, inibindo a fosforilação de p38 e a subsequente ativação de NFκB regulando negativamente a expressão de MLCK (LI et al., 2017).

O [6]-G vem exibindo uma ampla gama de atividades bioquímicas e farmacológicas (AFZAL et al., 2001; ALI et al., 2008; BODE; DONG, 2011). A quimioprevenção derivada de plantas e / ou fitoquímicos dietéticos emergiram como uma estratégia disponível e promissora para o controle e manejo do câncer com vários mecanismos, incluindo o direcionamento da leucotrieno LTA 4 H (HOUSSEN; RAGAB; MESBAH, 2010; BADRIA, 1994; SURH, 2003).

A leucotrieno A 4 hidrolase (LTA 4H) é uma metaloenzima bifuncional dependente de zinco com as atividades de epóxido hidrolase e aminopeptidase. Como uma hidrolase de epóxido, LTA 4 H catalisa o último passo limitante da velocidade na biossíntese de leucotrienos B 4 (LTB 4), um potente quimioatraente que induz uma resposta inflamatória e está relacionado no desenvolvimento do câncer (JEONG et al., 2009; CHEN et al., 2004). EL-NAGGAR et al. (2017) ao realizarem triagem computacional virtual de [6]-G e outros derivados deste isolado frente a LTA 4 H, observaram que o [6]-G compartilha sobreposição no sítio catalítico da LTA 4 H entre bestatina (um clássico LTA 4 inibidor de H) e 4BS (4 amino N [4 (benziloxi) fenilbutanamida), outro inibidor de LTA 4 H.

Várias características estruturais do [6]-G relacionadas com LTA 4 H, foram identificadas por EL-NAGGAR et al. (2017) . Em primeiro lugar, o [6]-G apresentou conformação molecular de L, semelhante ao do leucotrieno A4 (LTA 4), o substrato natural de LTA4 H, que se encaixam na cavidade hidrofóbica em forma de L em LTA4 H. Em segundo lugar, o grupamento fenólico -OH do [6]-G indicou ser essencial para a inibição das atividades de ambas as LTA4 H, devido à sua articulação com o zinco metálico, fator que pode explicar a inibição da atividade da aminopeptidase da enzima. Em terceiro lugar, o grupo OH no C5 do [6]-G que tem configuração *S* forma uma ligação de hidrogênio com Asp375 que é essencial, e especificamente necessário para a atividade de epóxido hidrolase de LTA4H.

3.5 Plantas medicinais

Utilizadas como fonte na descoberta de fármacos, as plantas medicinais vêm sendo fortemente abordadas desde 1805, quando a morfina se tornou o primeiro composto farmacologicamente ativo a ser isolado de uma planta para a forma pura, embora sua estrutura não tenha sido elucidada até 1923 (SALIM et al., 2008). Fármacos naturais são aplicados por ampla parcela da população em diversos países para tratar doenças como inflamação, hipertensão, problemas renais, deficiência imunológica e câncer (CRAGG; NEWMAN, 2013), destacando sua importância medicinal, por milênios, as plantas medicinais têm sido uma fonte valiosa de agentes terapêuticos e ainda muitos dos medicamentos atuais são oriundos de plantas ou seus derivados (KINGHORN et al., 2011; NEWMAN; CRAGG, 2012). Os polifenóis, metabólitos secundários vastamente difundidos no reino vegetal são agentes conhecidos por proporcionar proteção contra agentes patogênicos e parasitas, bem como reduzir o risco de doenças induzidas por danos crônicos e oxidativos, incluindo câncer (ABOUL ENEIN et al., 2013).

A elucidação das vias moleculares e efeitos secundários são cruciais antes da realização de testes no ambiente clínico. O desafio reside no fato dos fitoquímicos serem estruturalmente complexos, sendo a extração de isolados ativos extensivamente laboriosa. Muitas drogas sintéticas são inspiradas da estrutura de moléculas ativas de plantas, destacando o enorme potencial no desenvolvimento de fármacos baseados em plantas com ações terapêuticas contra o câncer (YEHYA et al., 2017).

Muitos estudos identificaram mais de 5000 fitoquímicos individuais e este número está aumentando continuamente devido à introdução de técnicas atuais e eficientes de isolamento e caracterização. Estes novos agentes são amplamente classificados como compostos fenólicos, alcaloides, carotenoides, organossulfurados e compostos contendo azoto (ASIF et al., 2016). Tais moléculas podem atuar como antioxidantes, estimular atividade enzimática, mimetizar hormônios, interferir na replicação do DNA, proteger as células da radiação, dentre outros processos anormais durante a tumorigênese. Além disso, estudos também destacaram os efeitos sinérgicos de compostos medicinais baseados em plantas como agentes antiangiogênicos quando usados em combinação com outros fármacos antineoplásicos (LACHUMY et al., 2013 ; LU et al., 2016).

O câncer é uma patologia complexa e multifatorial, sua etiologia presume mutações genéticas que conferem capacidade ilimitada de proliferação celular, perda de resposta a fatores de inibição de crescimento, evasão de apoptose, possibilidades de invadir outros tecidos

corpóreos (metástases) e produção de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (INCA, 2014; HERCOS et al., 2014; ARAÚJO; GALVÃO, 2010). Alguns fitoquímicos demonstraram efeitos secundários relativamente baixos, e mesmo limitaram a incidência de efeitos colaterais associados a agentes quimioterapêuticos ou antiangiogênicos (WANG et al., 2015).

As especiarias desempenham um papel importante como agente aromático na dieta e são utilizadas em várias regiões do planeta. Inúmeros fitoquímicos presentes em especiarias têm sido reconhecidos por possuir benefícios na promoção da saúde e desempenhar um papel preventivo em doenças crônicas (KAEFER; MILNER, 2008; FERRUCCI et al., 2010). A maioria dos fitoquímicos demonstrou possuir promissoras atividades antiangiogênicas de largo espectro em modelos *in vitro* e *in vivo* (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000).

3.6 *Zingiber officinale* Roscoe e câncer

Uma das mais antigas especiarias domesticadas na história, o gengibre (*Zingiber officinale*), é comumente empregado como aditivo alimentar (especiarias) e utilizado como componente chave na medicina herbal tradicional, sendo o seu potencial intensamente explorado nos benefícios direcionados a saúde, o gengibre também é considerado seguro como um suplemento de ervas por diferentes autoridades reguladoras (BUTT; SULTAN, 2011; SHUKLA; SINGH, 2007; AL-SUHAIMI; ALRIZIZA; AL ESSA, 2011). Os componentes bioativos do gengibre incluem óleos voláteis, antocianinas, taninos e compostos de fenólicos pungentes conhecidos como gingeróis, shogaóis e sesquiterpenos (SEMWAL et al., 2015). A maior parte da investigação acerca das atividades antitumorais dos gingeróis tem se concentrado no [6]-Gingerol, embora tenha sido efetuada pouca atenção aos gingeróis com cadeias laterais de alquilo mais longas não ramificadas (SEMWAL et al., 2015). Estudos sugerem que o gengibre e seus componentes bioativos pungentes, que incluem gingeróis e shogaóis, podem ser utilizados na prevenção e tratamento do câncer (WANG et al., 2015).

O [6]-Gingerol demonstrou possuir atividade modulatória em NF- κ B, STAT3, Rb, MAPK, PI3K, Akt, ERK, cIAP1, ciclina A, Cdk, cathepsina D e caspase-3/7 (PRASAD; AMIT, 2015), considerando os efeitos antiproliferativos, antitumorais e anti-invasivos em testes experimentais (*in vitro/in vivo*) e clínicos do extrato de gengibre e [6]-Gingerol, a **tabela 3** apresenta os mecanismos moleculares envolvidos na supressão tumoral, assim como os mediadores envolvidos nas vias de sinalização celular em diferentes tipos de carcinomas e linhagens tumorais.

Em pesquisa realizada por YUSOF et al (2009), na qual determinou-se o efeito anticancerígeno do EG em ratos Wistar com carcinoma hepático, uma dieta deficiente em colina combinada com etionina foi utilizada na indução do câncer. Em animais tratados com dieta deficiente em colina + 0,1% etionina (CDE), a incidência tumoral foi de 100% e o tamanho médio do tumor foi de 0,51 cm, no entanto, nos grupos controle (ração normal e azeite) não houve surgimento de tumor. O tratamento com gengibre no grupo CDE conseguiu reduzir a incidência do tumor para 17%. Embora não houvesse alterações significativas observadas nos níveis de malondialdeído (MDA) em ratos tratados com CDE quando comparados com os grupos controle, a suplementação de gengibre diminuiu significativamente os níveis de MDA no grupo tratado com CDE quando comparado ao grupo CDE sozinho. Observou-se ainda, um aumento significativo na atividade da catalase no grupo CDE tratado com EG quando comparado com o grupo CDE sozinho.

Tabela 3 - Efeito antitumoral do extrato de gengibre (EG) e componente fitoquímico ativo [6]-Gingerol ([6]-G).

Forma de Utilização	Método de Estudo Dose/Concentração	Mecanismo de ação	Estudo, ano
[6]-G	<i>In vitro</i> – examinar os efeitos do [6]-G na adesão, invasão e motilidade em células MDA-MB-231 (câncer de mama humano) a [6]-G (0, 2,5, 5 e 10 µM)	↓ atividade de MMP-2 e MMP-9	LEE et al. (2008)
EG	<i>In vivo</i> – Ratos Wistar machos (N - 6) efeito do gengibre em hepatocarcinogênese induzida por etionina Indução de câncer hepático com etionina – 15 semanas – via intraperitoneal Controles ração/azeite; EG (100 mg.kg ⁻¹); dieta (CDE) deficiente em colina + 0,1% etionina; gengibre +CDE. 8 semanas-via oral	Grupo tratado com gengibre: ↓ incidência tumor ↑ CAT ↓ MDA	YUSOF et al. (2009)
[6]-G	<i>In vitro</i> – explorar os mecanismos do [6]-G em células HeLa (carcinoma cervical humano) a [6]-G (25, 50, 75, 100, 125, 150 e 175 µg.mL ⁻¹)	Indução da apoptose Up-regulation TNFα, Bax e citocromo c. Down-regulation NF-kβ, AKT e Bcl2	CHAKRABORTY et al. (2012)
EG	<i>In vitro</i> – investigar capacidade citotóxica e apoptótica em células MPC11 (mieloma) humano e WiDr (câncer colorretal) murino. Administração de EG (500 - 7,81 µg.mL ⁻¹)	Indução da apoptose ↑p53	EKOWATI et al. (2012)
EG	<i>In vitro</i> - potencialidade antiproliferativa do EG (0,0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 mg.mL ⁻¹) em linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e linhagem epitelial normal mamária (MCF-10A). Ensaios viabilidade (200 × 10 ³), cometa (1 × 10 ⁶), apoptose (2 × 10 ⁴) células / mL	↑apoptose, Bax, caspases-3, PARP, IκBα ↓ NF-kβ, Bcl2, BclX, Mcl-1, survivina, ciclina D1, Cdk-4, hTERT	ELKADY et al. (2012)
EG	<i>In vitro</i> - exposição das linhagens de câncer de próstata, LNCaP, C4-2, C4-2B, DU145, PC-3 e PrEC (normal) a EG (1, 10, 100, 1000 µg.mL ⁻¹) para viabilidade celular Citometria de fluxo: Linhagem PC-3 tratada com EG (50, 100, 250, 500, 1000 µg.mL ⁻¹)	Parada ciclo celular G1 e S ↑ população sub-G1, p21, JC-1, BAX, citocromo c mitocondrial, clivagem PARP, caspase 3	KARNA et al. (2012)

	Western blot, imuno-histoquímica, atividade de Caspase3/7: PC-3 a EG (250 µg.mL⁻¹)	↓Ki67, ciclina D1, E, Cdk-4, Bcl2	
EG	In vivo - Camundongo Nude macho (N-6) xenoenxerto PC-3. Indução câncer de próstata (PC-3/ 1x10 ⁶) – via subcutânea Administração de EG (100 mg.Kg⁻¹ – 8 semanas) – via oral	↓ Ki67, ciclina B, ciclina D1, ciclina E ↑ p21, caspase-3, PARP	KARNA et al. (2012)
[6]-G	In vitro – investigar os efeitos antitumorais do 6-gingerol em células de câncer de cólon humano (LoVo) LoVo (4 x 10 ⁴) a [6]-G (0, 5, 10, 15 µg.mL⁻¹)	Parada ciclo celular fase G2 / M ↓ ciclina A, B1, CDK1 ↑ p27 ^{Kip1} , p21 ^{Cip1} , EROs	LIN; LIN; TSAY, (2012)
[6]-G	In vitro – examinar o efeito do [6] -Gingerol em metástases de câncer pancreático e investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas em linhagem PANC1 (1 x 10 ⁴) a [6]-G (0, 5, 10, 15 ou 20 µM)	↑TER, níveis proteínas TJ, ZO-1, accludina, E-caderina ↓ MMP-2,-9, claudina-4, NF-κ B / Snail, ERK	KIM; KIM, (2013)
EG	In vitro – Exposição de linhagem celular de melanoma B164A5 (1 x 10 ³ células) a Extrato de gengibre (0, 20, 60, 80, 100 µg.mL⁻¹)	↑Apoptose	DANCIU et al. (2014)
EG	In vitro – Exposição da linhagem celular de glioma U251 (1x10 ⁴) a extrato de gengibre, viabilidade (0, 50, 100, 150, 200 µg.mL⁻¹); marcadores (0; 75) µg.mL ⁻¹	↑ citocromo c mitocondrial, relação Bax:Bcl-2, caspases-3, -9, clivagem PARP-1, p53, p21, Noxa ↓ NF-κBp65 nuclear, survivina, XIAP, ciclina D1	ELKADY; HUSSEIN; ABU-ZINADAH, (2014a)
EG	In vitro – Exposição da linhagem celular de câncer colorretal humano HCT116 (5x10 ⁴) a extrato de gengibre, viabilidade (0, 50, 75, 100, 125 µg.mL ⁻¹); marcadores (0; 75) µg.mL ⁻¹	↑ citocromo c mitocondrial, relação Bax:Bcl-2, caspases-3, -9, clivagem PARP-1, p53, p21, p27, Noxa ↓ Bcl2, BclX, Mcl1, survivina, XIAP, ciclina D1, Cdk-4, c-Myc	ELKADY; HUSSEIN; ABU-ZINADAH, (2014b)
[6]-G	In vitro – Exposição de linhagem glioblastoma humano U87 (1 x 10 ⁵ células) a [6]-G Viabilidade/apoptose (10-100 µM); Marcadores/modulação (0-50 µM)	↑EROs, DR5, p53, clivagem Bid, BAX ↓ expressão survivina, cFLIP, Bcl2 e XIAP	LEE et al. (2014)
[6]-G	In vitro – avaliar a capacidade antiproliferativa em linhagens tumorais de leucemia mieloide aguda e crônica a [6]-G (0, 10, 25, 50, 100, 200 µM) Analisar os mecanismos apoptóticos do [6]-G em células LMC (K562) e LMA (U937) a [6]-G (50 µM)	Indução da atividade da caspase 3 Clivagem PARP Geração de EROs mitocondrial Interrupção do ciclo celular G2 / M Diminuição da expressão de proteínas (ciclina B1, Cdk1, Cdc25B e Cdc25C) Aumento expressão de miR27b	RASTOGI et al. (2014)
[6]-G	Ex vivo – investigar os efeitos do [6]-G em células PBMCs, obtidos a partir de pacientes com LMA (N-40); LMC (N-7) e normais (N-6) a [6]-Gingerol (50 µM)	Indução de apoptose nos grupos LMA e LMC	RASTOGI et al. (2014)
[6]-G	In vivo – Camundongo Nude (N-24). Modelo tumoral xenotransplante induzido por K562 (3x10 ⁶). Administração [6]-G (5 mg.kg⁻¹) - 45 dias alternados - via intraperitoneal	↓ PCNA, Bcl2, BclXL e XIAP ↑ Bax, Bak, clivagem de PARP e ativação de caspase 3	RASTOGI et al. (2014)

[6]-G	<i>In vitro</i> – efeitos citotóxicos em linhagens tumorais humana SW-480, HCT 116 (5×10^3) e células primárias de cólon murino normal (5×10^4) a [6]-G (5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 μM), evidenciar possíveis mecanismos de ação em (SW 480)	Ativação de caspases-8, 9, 3, 7 e clivagem de PARP Inibição via ERK1 / 2, JNK, AP-1	RADHAKRISHNAN et al. (2014)
EG	<i>In vitro</i> - investigar os efeitos do extrato de gengibre em linhagens de câncer pancreático humano PANC1, AsPC1, BxPC3, CAPAN2, CFPAC1, MIAPaCa2 e SW1990 e célula de câncer pancreático murino Panc02 empregando EG (SSHE) - 25, 50, 100, 200 μg.mL⁻¹	Detenção na fase G0 / G1 do ciclo celular Indução de autose \uparrow EROs	AKIMOTO et al. (2015)
E G	<i>In vivo</i> - Camundongo C57BL/6 machos (N-8). Indução câncer pancreático Panc02-Luc-ZsGreen (5×10^5 células) – via intraperitoneal Administração de EG (SSHE) (80 mg.Kg⁻¹ - 20 dias consecutivos logo após a indução) – via intraperitoneal	\downarrow incidência tumor \downarrow viabilidade celular	AKIMOTO et al. (2015)
[6]-G	<i>In vitro</i> – linhagem tumoral HepG2 humana Exposição de linhagens tumorais HepG2 a [6]-G (0,01; 0,1; 0,2; 0,3;0,4;0,5 nM)	Indução Apoptose Parada ciclo: Go / G1, S – 24 h; G2 / M - 48 h \uparrow ERO Down-regulation FASN	IMPHENG et al. (2015)
EG	<i>In vitro</i> – Exposição de linhagem derivada linfoma Burkitt humano Raji (1×10^6 células) a EG (0,1%, 0,01% e 0,001%)	\downarrow viabilidade	PARVIZZADEH et al. (2014)
[6]-G	<i>In vitro</i> – explorar o mecanismo de ação do [6]-G (50 μM) em células de câncer cervical humano positivo para HPV (HeLa, CaSki e SiHa)	Indução da apoptose Reativação de p53 independente da inibição da oncoproteína (E6/E7) em linhagens HeLa e CaSki. \uparrow p53, P21, EROs Indução da parada do ciclo celular G2/M	RASTOGI et al. (2015)
[6]-G	<i>In vivo</i> - indução tumoral (xenotransplante) empregando célula HeLa (3×10^6) em Camundongo Nude (N-6) – via intraperitoneal Administração de [6]-G (2,5 e 5,0 mg.Kg⁻¹) - 45 dias alternados	Indução da apoptose Reativação e aumento dos níveis de p53	RASTOGI et al. (2015)
EG	<i>In vitro</i> – Exposição de linhagem tumoral colorretal HT29 (1×10^6 células) a EG (2-10 mg.mL⁻¹)	Indução apoptose Down regulation KRAS, ERK, AKT, Bcl-xL, p65NFkB \uparrow p regulation caspase 9	TAHIR et al. (2015)
[6]-G	<i>In vitro</i> – Exposição das linhagens Hela a [6]-G (100; 200 μM), avaliar o potencial antitumoral e sua sinergia com fármacos 5FU (50 μ M); Ptx.	Parada do ciclo celular G0 / G1 Regulação da apoptose na via PI3K / AKT / MAPK / mTOR A sinergia com os antineoplásicos 5FU e Ptx levou a 83,2% e 52% de inibição	ZHANG et al. (2017)

Legenda: Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), metaloproteinases de matriz (MMPs), malondialdeído (MDA), catalase (CAT), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), NF- κ B (factor nuclear kappa β), Cyclin-dependent kinases (CDKs), JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboianina), Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), resistência elétrica transepitelial (TER), junção apertada (TJ), zonula occludens (ZO-1), XIAP (cromossomo X-ligado ao Inibidor de Apoptose), receptor de morte 5 (DR5), c-FLIP

(proteína inibidora de FLICE), Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Mieloide Crônica (LMC), enzima ácido graxo sintase (FASN), fosfatidilinositol 3-quinases (PI3-K), 5-fluorouracil (5-FU); paclitaxel (Ptx).

A metástase do câncer consiste em uma cascata complexa de eventos que, em última instância, permitem a fuga de células tumorais e criação de ambientes ectópicos (YOON; KIM; CHUNG, 2001), os efeitos do [6]-G na adesão, invasão e motilidade em células MDA-MB-231, indicam não haver efeito sobre a adesão celular na concentração de 5 μ M, mas resultou em uma redução de 16% a 10 μ M. O tratamento de células MDA-MB-231 com concentrações crescentes de [6]-G levou a uma diminuição dependente da concentração na migração celular e motilidade. As atividades de MMP2 ou MMP9 em células MDA-MB-231 foram diminuídas no tratamento com [6]-G e ocorreram de uma forma dependente da dose (LEE et al., 2008).

LIN; LIN; TSAY (2012), ao investigarem os efeitos anticancerígenos do [6]-G em linhagens tumorais de cólon humano (LoVo), observaram redução significativa da viabilidade celular de forma dependente da dose. A análise empregando citometria de fluxo mostrou que o [6]-G induziu significativamente a parada do ciclo celular na fase G2/M, porém pouca influência na fase sub-G1 em células LoVo. Ao serem avaliadas as ciclinas envolvidas na fase S-G2/M, observou-se que os níveis de ciclina A, ciclina B1, e CDK1 foram diminuídos, em contraste, os níveis dos reguladores negativos do ciclo celular, p27^{Kip1} e p21^{Cip1}, aumentaram em resposta ao tratamento com [6]-G, também verificou-se elevação dos níveis de EROs e fosforilação de p53. Esses resultados indicam que a exposição de células LoVo ao [6]-G pode induzir EROs intracelular e aumentar os níveis de p53, p27^{Kip1} e p21^{Cip1}, levando ao consequente decréscimo de CDK1, ciclina A e ciclina B1 como resultado da parada do ciclo celular em células LoVo, sugerindo assim que [6]-G poderia promover efeitos benéficos no tratamento do câncer de cólon.

A geração de EROs induzida por [6]-G é conhecida por levar a danos ao DNA em células cancerígenas (OYAGBEMI; SABA; AZEEZ, 2010); (LIN; LIN; TSAY, 2012). Para investigar os mecanismos moleculares que medeiam as ações apoptóticas do [6]-G em células de leucemia mielóide, RASTOGI et al. (2014) selecionaram linhagens de leucemia mielóide crônica (K562) e aguda (U937). Os resultados indicaram que 50 μ M de [6]-G induziu a geração de EROs, em ambas as células, os níveis de EROs foram aumentados em 5,7 e 6,4 vezes após 12 h e 7,2 e 7,7 vezes após 24 h de tratamento com [6]-G em células K562 e U937, respectivamente. Estes dados indicaram claramente que o tratamento com [6]-G alterou o status oxidante celular, induzindo a geração de EROs mitocondrial, levando a interrupção do ciclo celular G2/M, além da diminuição da expressão das proteínas (ciclina B1, Cdk1, Cdc25B e Cdc25C), associadas as fases do ciclo.

Em pesquisa realizada por KARNA et al. (2012), foi investigado o efeito do EG em células PC3, LNCaP, C42, C42B e DU145, estas são representantes bem caracterizadas de receptores andrógenos (LNCaP) e andrógenos independentes (PC3, C42 e C42B) do câncer de próstata humano, constatou-se, que o EG inibiu a proliferação celular das linhagens, com IC 50 na ordem de C42 ($512 \mu\text{g.mL}^{-1}$) > PC3 ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) > C42B ($240 \mu\text{g.mL}^{-1}$) > DU145 ($95 \mu\text{g.mL}^{-1}$) > LNCaP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados mostraram que a viabilidade de PrEC ou HDF não foi significativamente afetada pelo tratamento com EG em concentrações entre 100-750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a escolha de linhagens celulares baseou-se no fato de que PrEC (células epiteliais prostáticas normais) e HDF (fibroblastos primários) apresentarem características mais consistentes com as células epiteliais de origem prostática e dérmica, respectivamente. No ensaio *in vivo*, verificou-se uma redução na carga tumoral em cerca de 56% após 8 semanas de alimentação oral de 100 mg/kg/dia e a diferença entre os volumes finais médios de tumor em animais recebendo EG e os que receberam veículo (azeite) por via oral foi estatisticamente significativa. O tratamento com EG foi bem tolerado e os animais mantiveram ganho de peso normal, não mostrando sinais de desconforto durante o regime de tratamento.

A infecção por HPV está associada à maioria dos cânceres cervicais (TAN et al., 2012). RASTOGI et al. (2015), ao avaliarem o efeito do [6]-G em células de câncer cervical positivo para HPV (HeLa, CaSki e SiHa) observaram que o [6]-G induziu a inibição dependente da dose e do tempo na viabilidade celular nas linhagens tumorais testadas. Na concentração de 50 μM , o [6]-G inibiu o crescimento e proliferação de células HeLa (20%), CaSki (23%) e SiHa (28%) após 24 horas de tratamento, ainda observou-se aumento da porcentagem de células apoptóticas, HeLa (25,22%), CaSki (29,19%) e SiHa (35,48%) nas fases precoce e tardia de apoptose, indicando morte celular por apoptose. Ao avaliar a seletividade do [6]-G em células não tumorais HACAT, HEK293 e PBMCs humanas na dose de 50 μM , verificou-se que não houve indução da citotoxicidade em linhagens normais. Com base nos resultados, realizaram-se estudos mecanísticos detalhados utilizando células HeLa (HPV18 positivo) e CaSki (HPV16 positivo).

A restauração da função p53 é consequentemente crítica para o direcionamento terapêutico efetivo e o manejo do câncer cervical (HORNER et al., 2004). RASTOGI et al. (2015), relataram que o [6]-G inibiu o proteassoma, induziu a reativação de p53 e a morte celular apoptótica em células de câncer cervical. [6]-G também potencializou os efeitos citotóxicos do quimioterápico tradicional cisplatina. Em conjunto, resultados sugerem que [6]-G pode ser usado como um único agente ou em combinação com drogas quimioterápicas

convencionais, e apresenta-se como uma promissora estratégia terapêutica para a gestão e tratamento de cânceres cervicais.

O silenciamento transcricional de oncoproteínas de HPV, E6 e E7 é conhecido por inibir a proliferação de células de câncer cervical (TAN et al., 2012). O tratamento com [6]-G não afetou a expressão dos níveis de E6 e E7 em células HeLa e CaSki, entretanto, os níveis de p21 foram significativamente aumentados em ambas as células, fato que explica o envolvimento da p53 no processo apoptótico nestas células. Ao serem examinados os efeitos de [6]-G na geração de EROs em células de câncer cervical foi observado aumento na produção de EROs em células tratadas com [6]-G (50 μ M) que começaram logo após 2 horas de tratamento com [6]-G. A geração de EROs intracelular induzida por [6]-G conduz à morte celular apoptótica levando a danos ao DNA e parada do ciclo celular G2 / M mediada por p53 / p21 em células de câncer cervical (RASTOGI et al., 2015).

Animais (camundongos) que receberam indução tumoral com célula HeLa foram tratados com [6]-G (2,5 e 5,0 mg.kg⁻¹) durante 6 semanas e apresentaram uma redução significativa no volume tumoral (cerca de 65%). Consistente com os resultados *in vitro*, observou-se inibição proteossomal e aumento dos níveis de p53 nos xenoenxertos de ratinhos tratados. A expressão dos reguladores do ciclo celular e outros marcadores apoptóticos foram também observados de acordo com os estudos *in vitro*. O potente efeito antiproliferativo de [6]-G *in vivo* é mediado por inibição proteossômica e reativação com p53 conduzindo à inibição da proliferação e indução da morte celular apoptótica (RASTOGI et al., 2015).

Em pesquisa realizada por CHAKRABORTY et al. (2012), verificou-se que o [6]-G apresentou potencial em reduzir a viabilidade celular da linhagem HeLa (carcinoma cervical humano) de uma forma dependente da dose e do tempo, sendo os valores de IC50 126,89 e 114,58 μ g.mL⁻¹, por 24 e 48 horas, respectivamente. Alterações morfológicas foram detectadas em células tratadas com [6]-G, incluindo morfologia celular e nuclear alterada, encolhimento celular e blebbing de membrana, que são as características da morte celular apoptótica, ainda foi observado condensação da cromatina e fragmentação de células HeLa, que aumentou ao longo da dose aumentada de [6]-G durante o tratamento.

A metástase é o principal motivo de morte em pacientes com câncer e é um processo de múltiplas etapas envolvendo invasão e migração. No câncer, a degradação da matriz extracelular e da membrana basal através da ativação de MMPs e remodelação de tecido através da perda de proteínas TJ, por sua vez, promove a migração de células tumorais. Os efeitos do [6]-G sobre resistência elétrica transepitelial (TER) e permeabilidade paracelular de células foram então investigados usando a linhagem celular PANC-1. O estudo indicou que o [6]-G

restaurou a formação de TJ e, portanto, suprimiu a permeabilidade paracelular em comparação com a das células não tratadas. Os resultados revelaram que TER aumentou significativamente, no entanto, claudina-4 e MMP-9 diminuíram em comparação ao controle. Os níveis de proteína TJ, incluindo zonula occludens (ZO-) 1, occludina e E-caderina, aumentaram em células tratadas com [6]-G, que se correlacionaram com a diminuição do fluxo paracelular e da atividade de MMP-2,-9. Além disso, a translocação nuclear de NF- κ B / Snail foi suprimida através da downregulation da via de cinase regulada por sinal extracelular (ERK) em resposta ao tratamento com [6]-G. Portanto, [6]-G pode suprimir a atividade invasiva das células PANC-1 (KIM; KIM, 2013).

Em estudo realizado por ELKADY et al. (2012), linhagens tumorais de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231 mostraram-se significativamente mais sensíveis à supressão do crescimento que a linhagem mamária normal MCF-10A quando tratadas com o extrato de gengibre. A porcentagem de células apoptóticas marcadas foi aumentada em aproximadamente 25 (MCF-7) e 20 vezes (MDA-MB-231) após 0,1 mg / mL de tratamento com extrato de gengibre e por 40- (MCF-7) e 30 vezes (MDA-MB-231) após 0,2 mg.mL⁻¹ do tratamento com extrato, em comparação com culturas tratadas com controle. A potencialidade antiproliferativa do gengibre pode ser atribuída à sua indução de apoptose através do aumento da relação Bax / Bcl-2. Os mecanismos inibitórios de crescimento dependentes do gengibre podem envolver, pelo menos em parte, a regulação negativa de moléculas celulares principais, incluindo NF- κ B, Bcl-X, Mcl-1, Survivina, ciclina D1, CDK-4, c-Myc, hTERT e upregulation do I κ B α e p21. Como a inibição de c-Myc e hTERT são alvos específicos de câncer para terapia de câncer, o extrato de gengibre pode revelar-se um agente quimiopreventivo ou terapêutico ideal para o câncer de mama.

LEE et al. (2014), identificaram que o gingerol funciona como um agente sensibilizador para induzir a apoptose mediada por TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral) em células de glioblastoma resistentes à apoptose por sinalização TRAIL. Especialmente, em concentrações não citotóxicas o gingerol induziu eficientemente morte celular por TRAIL em linhagens celulares de glioblastoma, revelou-se que a função sensibilizante do gingerol foi evidenciada com a elevação do nível de expressão do receptor de morte (DR) 5, diminuindo a expressão de proteínas antiapoptóticas (survivina, cFLIP, Bcl2 e XIAP) e induzindo aumento dos níveis de proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bid) dependentes de p53 e EROs, ainda sendo possível sugerir que as concentrações não citotóxicas do gingerol possam ser utilizadas como um agente antitumoral que possa servir como uma das terapias de combinação com TRAIL em pacientes com glioblastoma resistente a TRAIL. O gingerol pode

sensibilizar a morte celular do glioblastoma resistente a TRAIL modulando a sinalização apoptótica mediada por TRAIL através de DR5, proteínas pró-apoptóticas e proteínas anti-apoptóticas.

No tratamento das células de glioblastoma humano (U251) com extrato de gengibre foi observado por ELKADY; HUSSEIN; ABU-ZINADAH (2014a), redução da viabilidade celular, indução de apoptose mediada por liberação de citocromo *c* mitocondrial, aumento da relação Bax:Bcl-2, atividade das caspases-3, -9 e clivagem PARP-1. Houve ainda, redução dos níveis de expressão do NF- κ Bp65 nuclear, survivina, XIAP e ciclina D1 e aumento dos níveis de expressão de proteínas pró-apoptóticas p53, p21 e Noxa.

A célula cancerígena HCT116 (colorretal) humana, tratada com extrato de gengibre exibiu características morfológicas e bioquímicas da morte celular apoptótica. A indução da apoptose foi associada à liberação do citocromo *c* mitocondrial, aumento da proporção Bax:Bcl2, ativação das caspases 3 e 9 e clivagem PARP, os tratamentos diminuíram os níveis de expressão de proteínas antiapoptóticas incluindo Bcl2, BclX, Mcl1, survivina e XIAP, elevaram os níveis de expressão das proteínas oncosupressoras, p53, p21 e p27, além de reduzir a expressão de ciclina D1, cinase dependente de ciclina Cdk-4 e diminuição da expressão de *c-Myc* (ELKADY; HUSSEIN; ABU-ZINADAH, 2014b).

Ao analisar um possível potencial anticancerígeno do EG contra a linhagem de melanoma murino B164A5, DANCIU et al. (2014), constataram atividade antiproliferativa e pró-apoptótica do EG na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente a linhagem B164A5, também considerando a avaliação da viabilidade, PARVIZZADEH et al. (2014), ao investigarem células Raji derivadas do linfoma de Burkitt humano (não Hodgkin), frente ao EG observaram alto efeito citotóxico.

RASTOGI et al. (2014) verificaram atividade da caspase 3 em células tratadas com [6]-G e observaram um aumento 3 vezes superior na atividade desta caspase entre as linhagens de leucemia mielóide crônica (K562, LAMA84, JURLMK1) e leucemia mielóide aguda (U937, HL-60 e NB4) quando comparadas a células mononucleadas de sangue periférico PBMCs normais. Estes resultados sugeriram que [6]-G na concentração de 50 μM inibiu a proliferação celular e induziu a atividade de caspase-3 em células de leucemia mielóide enquanto poupava as PBMCs normais. A caspase-3 é um alvo molecular de [6]-G e a ativação de proteases tipo caspase-3 está envolvida na morte celular apoptótica (OYAGBEMI; SABA; AZEEZ, 2010). O [6]-G é conhecido por induzir a fragmentação do DNA (OYAGBEMI; SABA; AZEEZ, 2010). As experiências de transferência de Western mostraram claramente clivagem de PARP, caracterizada por níveis elevados de fragmento de PARP clivado, em células de leucemia

mielóide tratadas com 50 μ M de [6]-G. Os níveis de PARP clivados foram elevados, na ordem de 5,3, 4,9, 5,8, 5,5, 5,9 e 5,4 vezes em células K562, LAMA84, JURLMK1, U937, NB4 e HL-60, respectivamente, ao passo que não se observou tal efeito nas PBMCs normais (RASTOGI et al., 2014).

Estudos demonstraram que os compostos naturais também induzem a inibição das células de leucemia primária (SHARIF et al., 2012). RASTOGI et al. (2014) ao investigarem os efeitos de 6-[G] em células mononucleadas de sangue periférico PBMCs, obtidos a partir de 40 pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA), 7 pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) e 6 doadores saudáveis, cada uma dessas culturas primárias de leucemia foi exposta a 50 μ M de 6-[G] durante 48 horas e a ligação de anexina V (marcador de apoptose) foi medida por citometria de fluxo individualmente. Os efeitos ótimos de [6]-G na indução da apoptose em células LML e CML foram atingidos no tempo de 48 h (pós-tratamento). A apoptose mediada por [6]-G foi observada em 30 das 40 amostras de LMA e 6 das 7 amostras testadas LMC, o tratamento com [6]-G não afetou de forma acentuada a viabilidade de PBMCs normais. Os resultados coletivamente sugeriram que o [6]-G foi eficaz na indução de apoptose em ambas as células de LMA e CML.

O estresse oxidativo devido à acumulação de EROs é conhecido por induzir mudanças na expressão de miRNA em vários tipos de células (LIN et al., 2009) ; (SIMONE et al., 2009) ; (WANG et al., 2010) ; (MAGENTA et al., 2011); (LEE et al., 2009). (RASTOGI et al. 2014) ao avaliarem as alterações na expressão de miRNA nas linhagens celulares de leucemia mielóide K562 e U937 após a acumulação de EROs induzida por 6G, mostraram que a expressão de miR27b foi aumentada em 4,8 e 4,9 vezes mais elevada nas células K562 e U937 tratadas com 6G em comparação com as células não tratadas. Estes resultados indicaram que o miR27b pode estar relacionado com os efeitos pró-apoptóticos de 6G, os resultados sugerem que expressão de miR27b é crítica na mediação dos seus efeitos pró-apoptóticos em células de leucemia.

Para validar ainda mais os resultados obtidos in vitro, determinou-se se [6]-G poderia inibir o desenvolvimento de tumores num modelo de tumor de xenoinxerto murino in vivo. Os resultados mostraram que o tratamento com [6]-G reduziu significativamente as proteínas antiapoptóticas (PCNA, Bcl2, BclXL e XIAP) e aumentou as proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, clivagem de PARP e ativação de caspase 3) em comparação com os grupos controle, anti miR27b + 6G e NAC + 6G correspondentes. O [6]-G não afetou negativamente os parâmetros hematológicos ou pesos corporais, indicando o seu potencial quimioterapêutico (RASTOGI et al., 2014).

O [6]-G demonstrou toxicidade em ambas as células tumorais SW-480 e HCT-116 de uma forma dependente da dose, com citotoxicidade proeminente em concentrações mais elevadas produzem um IC₅₀ de $205 \pm 5 \mu\text{M}$ e $283 \pm 7 \mu\text{M}$, respectivamente. A viabilidade celular em células normais permaneceu inalterada. Esses resultados sugerem a especificidade do [6]-G na indução de citotoxicidade em células cancerígenas sem ser tóxico para células normais, mesmo em concentrações mais elevadas. Em células SW-480 tratadas com [6]-G, observou-se clivagem significativa da pro-caspase -8 e -9 aos seus fragmentos ativos (p43/41), (p35/37), respectivamente. A ativação das caspases efetoras 3 e 7 também foi induzida por [6]-G de forma dependente da dose, ocorrendo clivagem da pro-caspase-3 e -7 aos seus respectivos fragmentos ativos (p17/19) e (p20). Verificou-se também clivagem da proteína PARP, que é um substrato de caspase-3. No tratamento das células com 200 e 300 μM de [6]-G, a forma de 116-kDa de PARP foi dividida em 89 fragmento kDa, confirmando uma apoptose mediada por caspase (RADHAKRISHNAN et al., 2014).

AKIMOTO et al. (2015), ao examinarem a atividade anticâncer do EG frente a células de câncer pancreático *in vitro/ in vivo* e investigarem o seu potencial mecanismo, observaram em células PANC1, redução do crescimento tumoral e viabilidade celular, principalmente através de autose mediada por EROs, uma forma de caracterizar morte celular. O tratamento de células PANC1 com EG durante 20 horas resultou numa detenção na fase G₀ / G₁ do ciclo celular. Células normais tais como HUVEC e HPAEpiC foram mais resistentes ao EG em comparação com células Panc, mostrando a seletividade do EG. Nos estágios posteriores a morte celular das células PANC1, a ruptura focal da membrana plasmática e o encolhimento do núcleo foram evidentes. O EG aumentou significativamente a relação LC3-II/LC3-I, um indicador da formação de autofosomas, de forma dependente da dose e do tempo. O EG também diminuiu os níveis de proteína SQSTM1 / p62, um dos substratos específicos degradados através da via autofágica-lisossomal, nas células PANC-1.

O EG ativou o MAPK, um regulador positivo da autofagia e inibiu o mTOR, um regulador autofágico negativo. Os inibidores de autofagia 3-metiladenina e cloroquina impediram parcialmente a morte celular. Morfologicamente, as células tratadas com EG mostraram vacuolização maciça do citoplasma aproximadamente 24 horas após o tratamento. Esses vacúolos citoplasmáticos eram provavelmente autofosomas porque a ponta GFP-LC3 apareceu após o tratamento com EG. As mudanças na geração de EROs, após o tratamento de células PANC-1 com EG mostraram um padrão bifásico. Nos estágios iniciais (aproximadamente 10h), a geração de EROs foi inibida por EG. No entanto, o tratamento prolongado resultou em um aumento robusto na geração de EROs, sendo observado também

aumento da produção de superóxido mitocondrial. Estes resultados sugeriram a geração de EROs como causa da morte celular induzida por EG (AKIMOTO et al., 2015).

A obesidade está associada à síndrome metabólica e à desregulação da síntese de novos ácidos graxos (FASN), levando a inúmeras conseqüências, incluindo tumorigênese e progressão tumoral (AMEER et al., 2014). Muitos estudos têm proposto as ações benéficas de polifenóis na redução da acumulação de gordura hepática, excesso de peso, e os níveis de obesidade inibindo a síntese lipídica que leva a reduzir o risco de carcinogênese sem perturbar o apetite por alimentos (HUANG et al., 2014; KANG et al., 2013; FIGAROLA et al., 2013). Para promover rápida proliferação e sobrevivência, o câncer também reorienta a enzima acetilcoenzima A (acetilCoA) na fosforilação oxidativa (OXPHOS) para desenvolver sobre-expressão da via de síntese de novo de ácidos graxos (RODRIGUEZ-ENRIQUEZ et al., 2009). As enzimas que participam na síntese de novo ácidos graxos são reguladas ou constitutivamente expressas na maioria dos tipos de células cancerígenas (FERREIRA, 2010; HOPPERTON et al., 2014; ZAIDI et al., 2013).

IMPHENG et al. (2015), demonstraram que o [6]-G reduz a síntese de ácidos graxos, resultando em disfunção mitocondrial e culminando em morte celular de HepG2, uma consequência precoce desde a geração aumentada de EROs, os quais se manifestam devido a citotoxicidade induzida por [6]-G. Uma acumulação de malonil-CoA após depleção de níveis de ácidos graxos por [6]-G seguida da inibição da atividade de carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1), levou a supressão da oxidação β em células HepG2. A primeira descoberta de [6]-G como um novo inibidor FASN forneceu uma potencial perspectiva nos tratamentos anticancerígenos e inibidores da lipogênese para proteger a carcinogênese induzida pela obesidade.

ZHANG et al. (2017) verificaram após tratamento das células Hela com [6]-G, aumento da taxa de parada celular na fase G0-G1 no período de 48h (58,64% - 100 μ M e 63,45% - 200 μ M durante 24 h) e (57,92% - 100 μ M e 63,80% - 200 μ M durante 48 h). Considerando a acumulação substancial das células Hela na fase G0 / G1, foi avaliado o possível mecanismo de regulação molecular, e por meio do método de transcrição reversa (RT-qPCR), verificou-se redução da expressão de ciclinas (A, D1, E1) e pequena diminuição de CDK1, p21 e p27. O Western blotting relatou a indução de apoptose com uma proporção Bax:Bcl2 aumentada, liberação de citocromo c, clivagem de caspase 3, 8, 9 e PARP em células tratadas. O [6]-G ativou em células Hela MAPK, mas, inibiu fosforilação PI3K/AKT com expressão reduzida da proteína P70S6K e também suprimiu a fosforilação mTOR. Os danos celulares por [6]-G (200 μ M) foram mais severos do que aqueles tratados com 5FU (50 μ M), observando-se muitas

células mortas, células apoptóticas ou detritos celulares e o número de células foi significativamente reduzido, como o efeito do [6]-G sobre a morfologia celular foi de uma forma dependente da concentração, indicou que doses elevadas levaram a danos significativos nas células.

4 CONCLUSÃO

O emprego de terapias que abrangem produtos naturais frente a enfermidades como o câncer, tem atraído a atenção das comunidades científica e médica, especialmente acerca de substâncias oriundas de plantas, devido aos seus menores efeitos colaterais e custo. Neste contexto, o [6]-Gingerol, um antioxidante fenólico, principal substância ativa do gengibre fresco, tem sido reconhecido e empregado como uma droga alternativa no tratamento de diferentes tipos de câncer, isoladamente ou em combinação com outras drogas quimioterápicas, além de apresentar importantes efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios que podem ser utilizados na prevenção e tratamento do câncer. Dados obtidos de estudos experimentais (*in vitro* / *in vivo*) e clínicos revelam que o EG e / ou o [6]-Gingerol exibem efeitos antiproliferativos, antitumorais, anti-invasivos e anti-inflamatórios em doenças crônicas e carcinomas. O [6]-Gingerol exerce efeitos citotóxicos em várias linhagens tumorais de 0,01 nM a 300 μ M, enquanto que em estudos *in vivo*, exibiu efeitos anticancerígenos de 5 a 45 mg.kg⁻¹.

Substâncias naturais exercem seus efeitos através de diferentes mecanismos e vias de sinalização celular. O uso de extratos brutos e fitoquímicos isolados de plantas medicinais está se tornando cada vez mais comum e aceitável; no entanto, a identificação e compreensão de vias moleculares e mediadores são cruciais para elucidar potencial protetor e / ou terapêutico, bem como doses resposta, toxicidade e resposta biológica. Em resumo, esta revisão revela que o [6] - Gingerol pode ser um importante medicamento complementar para prevenção e tratamento de diferentes tipos de câncer, no entanto, mais estudos são necessários sobre esta substância natural, uma vez que, a maioria dos resultados e conclusões desta revisão são estudos *in vitro* e *in vivo*, mais trabalhos que envolvem diferentes parâmetros farmacocinéticos são recomendados no futuro, antes que essa substância se torne uma droga prescrita. Além disso, o desenvolvimento do extrato padronizado por dosagem poderia também ser estudado em ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

ABOUL-ENEIN, Y.; BERZYNSKI, H.; KRUK, I. P. Phenolic compounds: the role of redox regulation in neurodegenerative disease and cancer. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 3, p. 385-398, 2013.

AFANAS, I. New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer. **Aging and disease**, v. 5, n. 1, p. 52, 2014.

AFZAL, M.; AL-HADIDI, D.; MENON, M.; PESEK, J.; DHAMI, M. S. Ginger: an ethnomedical, chemical and pharmacological review. **Drug metabolism and drug interactions**, v. 18, n. 3-4, p. 159-190, 2001.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1605-1621, 2006.

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745-756, 2003.

AGGARWAL, B. B.; GEHLOT, P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? **Current opinion in pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 351-369, 2009.

AKIMOTO, M.; LIZUKA, M.; KANEMATSU, R.; YOSHIDA, M.; TAKENAGA, K. Anticancer effect of ginger extract against pancreatic cancer cells mainly through reactive oxygen species-mediated autotic cell death. **PLoS one**, v. 10, n. 5, p. e0126605, 2015.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; HUNT, T. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010.

ALI, B. H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M. O.; NEMMAR, A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. **Food and chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 409-420, 2008.

AL-SADI, R.; GUO, S.; YE, D.; DOKLADNY, K.; ALHMOUD, T.; EREIFEJ, L.; SAID, H. M.; MA, T. Y. Mechanism of IL-1 β modulation of intestinal epithelial barrier involves p38 kinase and activating transcription factor-2 activation. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 12, p. 6596-6606, 2013.

AL-SUHAIMI, E. A.; AL-RIZIZA, N. A.; AL-ESSA, R. A. Physiological and therapeutical roles of ginger and turmeric on endocrine functions. **The American journal of Chinese medicine**, v. 39, n. 2, p. 215-231, 2011.

AMEER, F.; SCANDIUZZI, L.; HASNAIN, S.; KALBACHER, H.; ZAIDI, N. De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, v. 63, n. 7, p. 895-902, 2014.

ARAKI, Y.; KATOH, T.; OGAWA, A.; BAMBIA, S.; ANDOH, A.; KOYAMA, S.; FUJIYAMA, Y.; BAMBIA, T. Bile acid modulates transepithelial permeability via the

generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. **Free radical biology and medicine**, v. 39, n. 6, p. 769-780, 2005.

ASIF, M.; YEHYA, A. H. S.; AL-MANSOUB, M. A.; REVADIGAR, V.; EZZAT, M. O.; KHADEER A. M. B.; OON, C. E.; MURUGAIYAH, V.; ABDUL M. A. S.; ABDUL, M. A. M. S. Anticancer attributes of *Illicium verum* essential oils against colon cancer. **South african journal of botany**, v. 103, p.156-161, 2016.

BADRIA, F. A. Is man helpless against cancer? An environmental approach: antimutagenic agents from Egyptian food and medicinal preparations. **Cancer letters**. v. 84, n.1, p.1-5, 1994.

BAK, M. J.; OK, S.; JUN, M.; JEONG, W.S. 6-shogaol rich extract from ginger up regulates the antioxidant defense systems in cells and Mice. **Molecules**, v.17, n.7, p. 8037-8055, 2012.

BALKWILL, F. Tumor Necrosis Factor or tumor promoting factor? **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.13, n.2, p.135-141, 2002.

BARREIROS, A. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BENZIE, I. F. F.; WACHTEL-GALOR, S. The Amazing and Mighty Ginger. **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. 2. ed. Boca Raton (FL): CRC Press, cap.7, 2011.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY R.; MITRA S.; CROWE S.E. Oxidative stress: na essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v.94, n.2, p.329–354, 2014.

BLOCK, K. I.; GYLLENHAAL, C.; LWE, L.; AMEDEI, A.; RUHUL AMIN, A. R. M.; AMIN, A.; AQUILANO, K.; ARBISER, J.; ZOLLO, M. A. broad-spectrum integrative design for cancer prevention and therapy. **Seminars in cancer biology**, v.35, p.276-304, 2015.

BODE, A. M.; DONG, Z. The Amazing and Mighty Ginger. **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**, p.131-156. 2011.

BOLLING, A. K.; SAMUELSEN, J. T.; MORISBAK, E.; ANSTEINSSON, V.; BECHER, R.; DAHL, J. E.; MATHISEN, G.H. “Dental monomers inhibit LPS-induced cytokine release from the macrophage cell line RAW264.7”. **Toxicology Letters Journal**, v. 216, n. 2-3, p. 130-138, 2013.

BONACCIO, M.; DI CASTELNUOVO, A.; DE CURTIS, A.; COSTANZO, S.; PERSICHILLO, M.; DONATI, M. B.; CERLETTI, C.; IACOVIELLO, L.; DE GAETANO, G. Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower platelet and leukocyte counts: Results from the Moli-sani study. **Moli-sani Project Investigators**, v. 123, n. 19, p. 3037–3044, 2014.

AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS). Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the

European Respiratory Society (ERS). **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 2, p. 646-664, 2000.

ARAÚJO, A. P. S.; GALVÃO, D. C. A. Câncer ósseo: enfoque sobre a biologia do câncer. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 3, p. 359-363, 2010.

BRYANT, J.; PICOT, J.; LEVITT, G.; SULLIVAN, I.; BAXTER, L.; CLEGG, A. Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. **Health Technology Assess**, v. 11, n. 27, p. 1-84, 2007.

BUTT, M. S.; SULTAN, M. T. Ginger and its health claims: Molecular aspects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 5, p. 383-393, 2011.

CHANG, K.; KUO, C. 6-Gingerol modulates proinflammatory responses in dextran sodium sulfate (DSS)-treated Caco-2 cells and experimental colitis in mice through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation. **Food Function**, v. 6, p. 3334-334, 2015.

CHAKRABORTY, D.; BISHAYEE, K.; GHOSH, S.; BISWAS, R.; MANDAL, S. K.; KHUDA-BUKHSH, A. R. [6]-Gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in cancer cells: Drug-DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells. **European journal of pharmacology**, v. 694, n. 1, p. 20-29, 2012.

CHEN, X.; WANG, S.; WU, N.; YANG, C. S. Leukotriene A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 4, n. 3, p. 267-83, 2004.

CHOI, Y. Y.; KIM, M. H.; HONG, J.; KIM, S.-H.; YANG, W. M. Dried Ginger (*Zingiber officinalis*) Inhibits Inflammation in a Lipopolysaccharide-Induced Mouse Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 637-646, 2000.

COLOTTA, F.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1073-1081, 2009.

COULTHARD, L. R.; WHITE, D. E.; JONES, D. L.; MCDERMOTT, M. F., BURCHILL, S. A., p38 MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. **Trends in molecular medicine**, v. 15, n. 8, p. 369-379, 2009.

COUSSENS, L. M.; ZITVOGEL, L.; PALUCKA, A. K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? **Science**, v. 339, n. 6117, p. 286-291, 2013.

COUTINHO, M. A.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. (2009). Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUNNINGHAM, K. E.; TURNER, J. R. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1258, n. 1, p. 34-42, 2012.

DANCIU, C.; VLAIA, L.; FETEA, F.; HANCIANU, M.; CORICOVAC, D. E.; CIURLEA, S. A.; SOICA C. M.; MARINCUL.; VLAIA V.; DEHELEAN C. A.; TRANDAFIRESCU, C. Evaluation of phenolic profile, antioxidant and anticancer potential of two main representants of Zingiberaceae family against B164A5 murine melanoma cells. **Biological research**, v. 48, n. 1, p. 1, 2015.

DANWILAI, K.; KONMUN, J.; SRIPANIDKULCHAI, B.; SUBONGKOT, S. Antioxidant activity of ginger extract as a daily supplement in cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a pilot study. **Cancer management and research**, v. 9, p. 11, 2017.

DEMARIA, S.; PIKARSKY, E.; KARIN, M.; COUSSENS, L. M.; CHEN, Y. C.; EL-OMAR, E. M. Cancer and inflammation: promise for biological therapy. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 33, n. 4, p. 335, 2010.

DIAS, C. A. R.; MOURA, P. M. S. S.; D'ANGELIZ, C. E. M. A complexa interação entre radicais livres, suplementação e doenças. **Revista Multidisciplinar das FIPMoc**, n. 10, p. 34-43, 2011.

DONGARE, S.; GUPTA, S. K.; MATHUR, R.; SAXENA, R.; MATHUR S.; AGARWAL, R.; NAG T. C.; SRIVASTAVA S.; KUMAR, P. Zingiber officinale attenuates retinal microvascular changes in diabetic rats via anti-inflammatory and antiangiogenic mechanisms. **Molecular vision**, v. 22, p. 599, 2016.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002

DUAN, X.; LI, J.; LI, W.; XING, X.; ZHANG, Y.; ZHAO, L.; SUN, G.; GAO, X.; LI, B. Antioxidant tert-butylhydroquinone ameliorates arsenic-induced intracellular damages and apoptosis through induction of Nrf2-dependent antioxidant responses as well as stabilization of anti-apoptotic factor Bcl-2 in human keratinocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 94, p. 74-87, 2016.

EGGLER, A. L.; GAY, K. A.; MESECAR, A. D. Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. S1, 2008.

ELKADY, A. I.; ABUZINADAH, O. A.; BAESHEN, N. A.; RAHMY, T. R. Differential control of growth, apoptotic activity, and gene expression in human breast cancer cells by extracts derived from medicinal herbs Zingiber officinale. **Journal of BioMed Research**, v. 2012, 2012.

- ELKADY, A. I.; HUSSEIN, R. A. E. H.; ABU-ZINADAH, O. A. Effects of crude extracts from medicinal herbs *Rhazya stricta* and *Zingiber officinale* on growth and proliferation of human brain cancer cell line *in vitro*. **BioMed research international**, v. 2014, n. 3, p. 1-16, 2014a.
- ELKADY, A. I.; HUSSEIN, R. A. E. H.; ABU-ZINADAH, O. A. Differential control of growth, apoptotic activity and gene expression in human colon cancer cells by extracts derived from medicinal herbs, *Rhazya stricta* and *Zingiber officinale* and their combination. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 41, p. 15275, 2014b.
- EL-NAGGAR, M. H.; MIRA, A.; BAR, F. M. A.; SHIMIZU, K.; AMER, M. M.; BADRIA, F. A. (2017). Synthesis, docking, cytotoxicity, and LTA 4 H inhibitory activity of new gingerol derivatives as potential colorectal cancer therapy. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 3, p. 1277-1285, 2017.
- ESCARCEGA, R. O.; FUENTES-ALEXANDRO, S.; GARCIA-CARRASCO, M.; GATICA, A.; ZAMORA, A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. **Clinical Oncology**, v. 19, n. 2, p. 154-161, 2007.
- FAN, J. Z.; YANG, X.; BI, Z. G. The effects of 6-gingerol on proliferation, differentiation, and maturation of osteoblast-like MG-63 cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 7, p. 637-643, 2015.
- FERREIRA, L. M. Cancer metabolism: the Warburg effect today. **Experimental and molecular pathology**, v. 89, n. 3, p. 372-380, 2010.
- FERRUCCI, L. M.; DANIEL, C. R.; KAPUR, K.; CHADHA, P.; SHETTY, H.; GRAUBARD, B. I.; CHATTERJEE, N. Measurement of spices and seasonings in India: opportunities for cancer epidemiology and prevention. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 11, n. 6, p. 1621, 2010.
- FIGAROLA, J. L.; SINGHAL, P.; RAHBAR, S.; GUGIU, B. G.; AWASTHI, S.; SINGHAL S.S. James Lester et al. COH-SR4 reduces body weight, improves glycemic control and prevents hepatic steatosis in high fat diet-induced obese mice. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83801, 2013.
- FLOHE, L. Changing paradigms in thiology: from antioxidant defense toward redox regulation. **Methods in enzymology**, v. 473, p. 1-39, 2010.
- FRANCESCHI, C. Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? **Nutrition reviews**, v. 65, n. s3, 2007.
- FRANCESCHI, C.; BONAFÈ, M.; VALENSIN, S.; OLIVIERI, F.; DE LUCA, M.; OTTAVIANI, E.; DE BENEDETTIS, G. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, n. 1, p. 244-254, 2000.
- FREIRE, O. M.; VAN DYKE E, T. (2014). Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**, v. 63, n. 1, p. 149-164, 2013.

GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H.; FU Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nature immunology**, v. 14, n. 10, p. 1014-1022, 2013.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. E.; RAHMAT, A. Optimization protocol for the extraction of 6-gingerol and 6-shogaol from *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and improving antioxidant and anticancer activity using response surface methodology. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 258, 2015.

GIUSTARINI, D.; DALLE-DONNE, I.; TSIKAS, D.; ROSSI, R. Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 46, n. 5-6, p. 241-281, 2009.

GUPTA, S. C.; HEVIA, D.; PATCHVA, S.; PARK, B.; KOH, W.; AGGARWAL, B. B. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. **Antioxidants & redox signaling**, v. 16, n. 11, p. 1295-1322, 2012.

HABIB, S. H. M.; MAKPOL, S.; HAMID, N. A. A.; DAS, S.; NGAH, W. Z. W.; YUSOF, Y. A. M. Ginger extract (*Zingiber officinale*) has anti-cancer and anti-inflammatory effects on ethionine-induced hepatoma rats. **Clinics**, v. 63, n. 6, p. 807-813, 2008.

HAMANAKA, R. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. **Trends in biochemical sciences**, v. 35, n. 9, p. 505-513, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. As The hallmarks of cancer *Cell* 100: 57–70. **Find this article online**, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HERCOS, T. M.; VIEIRA, F. S.; OLIVEIRA, M. S.; BUETTO, L. S.; SHIMURA, C. M. N.; SONOBE, H. M. N. O trabalho dos profissionais de enfermagem em unidades de terapia intensiva na assistência ao paciente oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 1, p. 51-58, 2014.

HO, E.; GALOUGAHI, K. K.; LIU, C. C.; BHINDI, R.; FIGTREE, G. A. Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 483-491, 2013.

HOPPERTON, K. E.; DUNCAN, R. E.; BAZINET, R. P.; ARCHER, M. C. Fatty acid synthase plays a role in cancer metabolism beyond providing fatty acids for phospholipid synthesis or sustaining elevations in glycolytic activity. **Experimental cell research**, v. 320, n. 2, p. 302-310, 2014.

HORNER, S. M.; DEFILIPPIS, R. A.; MANUELIDIS, L.; DIMAIO, D. Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53-dependent, telomerase-independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. **Journal of virology**, v. 78, n. 8, p. 4063-4073, 2004.

- HOSSEINI A., SHAFIEE-NICK R., MOUSAVI S. H. Combination of *Nigella sativa* with *Glycyrrhiza glabra* and *Zingiber officinale* augments their protective effects on doxorubicin-induced toxicity in h9c2 cells. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 17, n. 12, p. 993, 2014.
- HOUSSEN, M. E.; RAGAB, A.; MESBAH, A.; EL-SAMANOUDY, A. Z.; OTHMAN, G., MOUSTAFA, A. F.; BADRIA, F. A. Natural anti-inflammatory products and leukotriene inhibitors as complementary therapy for bronchial asthma. **Clinical biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 887-890, 2010.
- HOWELLS, R. E. J.; DHAR, K. K.; HOBAN, P. R.; JONES, P. W.; FRYER, A. A.; REDMAN, C. W. E.; STRANGE, R. C. Association between glutathione-S-transferase GSTP1 genotypes, GSTP1 over-expression, and outcome in epithelial ovarian cancer. **International journal of gynecological cancer**, v. 14, n. 2, p. 242-250, 2004.
- HUANG, J.; WANG, Y.; XIE, Z.; ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; WAN, X. The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies. **European journal of clinical nutrition**, v. 68, n. 10, p. 1075-1087, 2014.
- IMPHENG, H.; RICHERT, L.; PEKTHONG, D.; SCHOLFIELD, C. N.; PONGCHAROEN, S.; PUNGPETCHARA, I.; SRISAWANG, P. [6]-Gingerol inhibits de novo fatty acid synthesis and carnitine palmitoyltransferase-1 activity which triggers apoptosis in HepG2. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 4, p. 1319, 2015.
- INCA. 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/index.asp?ID=2>>. Data de acesso:13/10/2017.
- INCA. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2014**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2>>. Data de acesso:13/10/2017.
- JACOBS, A. T.; IGNARRO, L. J. Lipopolysaccharide-induced expression of interferon- β mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 51, p. 47950-47957, 2001.
- JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 228-234, 2009.
- JEONG, C. H.; BODE, A. M.; PUGLIESE, A.; CHO, Y. Y.; KIM, H. G.; SHIM, J. H.; DONG, Z. [6]-Gingerol suppresses colon cancer growth by targeting leukotriene A4 hydrolase. **Cancer research**, v. 69, n. 13, p. 5584-5591, 2009.
- JIANG, Y.; TURGEON, D. K.; WRIGHT, B. D.; SIDAHMED, E.; RUFFIN, M. T.; BRENNER, D. E.; ZICK, S. M. Effect of ginger root on cyclooxygenase-1 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in colonic mucosa of humans at normal and increased risk of colorectal cancer. **European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, v. 22, n. 5, p. 455, 2013.

- JU, S. A.; PARK, S. M.; LEE, Y. S.; BAE, J. H.; YU, R.; SUH, J.; KIM, B. S. Administration of 6-gingerol greatly enhances the number of tumor-infiltrating lymphocytes in murine tumors. **International journal of cancer**, v. 130, p. 2618-28, 2012.
- KAEFER, C. M.; MILNER, J. A. The role of herbs and spices in cancer prevention. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 347-361, 2008
- KANG, O. H.; KIM, S. B.; SEO, Y. S.; JOUNG, D. K.; MUN, S. H.; CHOI, J. G.; KWON, D. Y. Curcumin decreases oleic acid-induced lipid accumulation via AMPK phosphorylation in hepatocarcinoma cells. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 17, n. 19, p. 2578-2586, 2013.
- KARNA, P.; CHAGANI, S.; GUNDALA, S. R.; RIDA, P. C.; ASIF, G.; SHARMA, V.; ANEJA, R. Benefits of whole ginger extract in prostate cancer. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 4, p. 473-484, 2012.
- KAUR, P. I.; KAUR D. P.; KIRAN K. K.; BISHNOI, M. Anticancer potential of ginger: mechanistic and pharmaceutical aspects. **Current pharmaceutical design**, v. 22, n. 27, p. 4160-4172, 2016.
- KASPAR, J. W., NITURE, S. K., JAISWAL, A. K. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1304-1309, 2009.
- KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, p. 89-116, 2007.
- KHAKI, A.; FATHIAZAD, F. Diabetic nephropathy—using herbals in diabetic nephropathy prevention and treatment—the role of ginger (*Zingiber officinale*) and onion (*Allium cepa*) in diabetics' nephropathy. In: **A Compendium of Essays on Alternative Therapy**. InTech, 2012.
- KHATAMI, M. Inflammation, aging, and cancer: tumoricidal versus tumorigenesis of immunity. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 55, n. 2, p. 55-79, 2009.
- KIM, S.O.; CHUN, K. S.; KUNDU, J.; SURH, Y. J. Inhibitory effects of [6]-gingerol on PMA-induced COX-2 expression and activation of NF- κ B and p38 MAPK in mouse skin. **Biofactors**, v. 21, n. 1-4, p. 27-31, 2004.
- KIM, S. O.; KIM, M. R. [6]-gingerol prevents disassembly of cell junctions and activities of MMPs in invasive human pancreas cancer cells through ERK/NF- κ B/snail signal transduction pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- KINGHORN, A. D.; PAN, L.; FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of natural products**, v. 74, n. 6, p. 1539-1555, 2011.
- KOURY, J.C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.
- KRYSTONA, T. B.; GEORGIEVA, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation**

Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 711, n. 1, p. 193-201, 2011.

KUBRA, I. R.; RAO, L. Jagan Mohan. An impression on current developments in the technology, chemistry, and biological activities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 8, p. 651-688, 2012.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1, p. 15-30, 2008.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 2013-2037, 2012.

LACHUMY, S. J.; OON, C. E.; DEIVANAI, S.; SARAVANAN, D.; VIJAYARATHNA, S.; CHOONG, Y. S.; SASIDHARAN, S. Herbal remedies for combating irradiation: a green anti-irradiation approach. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 10, p. 5553-5565, 2013.

LEE, D.-H.; KIMB, D.-W.; JUNG, C.-H.; LEE, Y. J.; PARK, D. Gingerol sensitizes TRAIL-induced apoptotic cell death of glioblastoma cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 279, n. 3, p. 253-265, 2014.

LEE, H. S.; SEO, E. Y.; KIM, W. K. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 5, p. 313-319, 2008.

LEE, J. S.; SURH, Y. J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. **Cancer letters**, v. 224, n. 2, p. 171-184, 2005.

LEE, C.; PARK, G. H.; KIM, C. Y.; JANG, J. H. [6]-Gingerol attenuates β -amyloid-induced oxidative cell death via fortifying cellular antioxidant defense system. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1261-1269, 2011.

LEE, C. H.; PARK, S. W.; KIM, Y. S.; KANG, S. S.; KIM, J. A.; LEE, S. H.; LEE, S. M. Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 10, p. 1898-1904, 2007.

LEE, S. E.; YANG, H.; SON, G. W.; PARK, H. R.; PARK, C. S.; JIN, Y. H.; PARK, Y. S. Eriodictyol protects endothelial cells against oxidative stress-induced cell death through modulating ERK/Nrf2/ARE-dependent heme oxygenase-1 expression. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 14526-14539, 2015.

LEE, Y. S.; DUTTA, A. MicroRNAs in cancer. **Annual Review of Pathological Mechanical Disease**, v. 4, p. 199-227, 2009.

LI, H. X.; MCGRATH, K. C. Y.; VAN, H.; TRAN, V. H.; LI, Y. M.; DUKE, C. C.; HEATHER, A. K. Attenuation of Proinflammatory Responses by S-[6]-Gingerol via Inhibition of ROS/NF-Kappa B/COX2 Activation in HuH7 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 8, 2013.

LI, Y.; XU, B.; XU, M.; CHEN, D.; XIONG, Y.; LIAN, M.; SUN, Y.; TANG, Z.; WANG, L.; JIANG, C.; LIN, Y. 6-Gingerol protects intestinal barrier from ischemia/reperfusion-induced damage via inhibition of p38 MAPK to NF- κ B signalling. **Pharmacological research**, v. 119, p. 137-148, 2017.

LIM, K. S.; JEYASEELAN, K.; WHITEMAN, M.; JENNER, A.; HALLIWELL, B. Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1042, n. 1, p. 210-220, 2005.

LIN, A.; KARIN, M. NF- κ B in cancer: a marked target. In: **Seminars in cancer biology**. . p. 107-114, 2003.

LIN C. B.; LIN C. C.; TSAY G. J. 6-Gingerol inhibits growth of colon cancer cell LoVo via induction of G2/M arrest. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

LIN, W. W.; KARIN, M. A. Michael. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175, 2007.

LIN, Y.; LIU, X.; CHENG, Y.; YANG, J.; HUO, Y.; ZHANG, C. Involvement of MicroRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 12, p. 7903-7913, 2009.

LIU, G. Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free radical research**, v. 44, n. 5, p. 479-496, 2010.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. STEPHEN J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823-837, 2009.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, 2010.

MCLAUGHLIN, S. P. Ginger: The Genus Zingiber. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles, Edited by PN Ravindran (Centre for Medicinal Plants Research, Kerala, India) and K. Nirmal Babu (Division of Crop Improvement and Biotechnology, Indian Institute of Spices Research, Kerala, India). **CRC Press**, Boca Raton, ISBN 0-415-32468-8, v. 41, 2005.

MAGENTA, A.; CENCIONI, C.; FASANARO, P.; ZACCAGNINI, G.; GRECO, S.; SARRA-FERRARIS, G.; ANTONINI, A.; MARTELLI, F.; CAPOGROSSI, M. C. miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 10, p. 1628, 2011.

MANJU, V.; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1, 2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 358, n. 1, p. 60-67, 2005.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-444, 2008.

- MANTOVANI, A. Cancer: inflammation by remote control. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 752-753, 2005.
- MANTOVANI, A. Cancer: inflaming metastasis. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 36-37, 2009.
- MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.
- MARTIN, R. H. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 142-147, 2006.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.
- MELO, S.; YUGAR-TODELO, J. C.; COCA, A. P., JÚNIOR, H. M. Hipertensão arterial, aterosclerose e inflamação: o endotélio como órgão-alvo. **Revista Brasileira Hipertens**, v. 14, n. 4, p. 234-238, 2007.
- MESTRE, J. R.; MACKRELL, P. J.; RIVADENEIRA, D. E.; STAPLETON, P. P.; TANABE, T.; DALY, J. M. Redundancy in the signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3977-3982, 2001.
- MITSUISHI, Y.; TAGUCHI, K.; KAWATANI, Y.; SHIBATA, T.; NUKIWA, T.; ABURATANI, H.; YAMAMOTO, M.; MOTOHASHI, H. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. **Cancer cell**, v. 22, n. 1, p. 66-79, 2012.
- MOTAWI, T. K.; HAMED M. A.; SHABANA M. H.; HASHEM R. M.; NASER A. F. Zingiber officinale acts as a nutraceutical agent against liver fibrosis. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 40, 2011.
- MANASA, D.; SRINIVAS, P.; SOWBHAGYA, H. B. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Food chemistry**, v. 139, n. 1, p. 509-514, 2013.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 13, p. 9873-9886, 2012.
- NOGUEIRA, V.; HAY, N. Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. **Clinic Cancer Research**, v. 19, n.16, p. 4309-4314, 2013.
- OHNISHI, S.; MA, N.; THANAN, R.; PINLAOR, S.; HAMMAM, O.; MURATA, M. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

OMONI, A.; ALUKO, R. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 8, p. 344-350, 2005.

OYAGBEMI, A. A.; SABA, A. B.; AZEEZ, O. I. Molecular targets of [6]-gingerol: Its potential roles in cancer chemoprevention. **Biofactors**, v. 36, n. 3, p. 169-178, 2010.

PAPAS, A. M. Diet and antioxidant status. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 999-1007, 1999.

PARVIZZADEH, N.; SADEGHI, S.; IRANI, S.; IRAVANI, A.; KALAYEE, Z.; RAHIMI, N. A.; ZAMANI, Z. A Metabonomic Study of the Effect of Methanol Extract of Ginger on Raji Cells Using ¹HNMR Spectroscopy. **Biotechnology research international**, v. 2014, 2014.

AMÁLIA, P. M. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 52, n. 10, p. 2616-2621, 2007.

PEREIRA, B. C.; PEREIRA, A. K. F. T. C. Radicais livres: uma nova abordagem. **Revista Saúde Quântica**, v. 1, n. 1, p. 35-42, 2012.

PEREIRA-FILHO, G.; FERREIRA, C.; SCHWENGBER, A.; MARRONI, C.; ZETTLER, C.; MARRONI, N. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 45, n. 2, p. 156-162, 2008.

PHILIP, M.; ROWLEY, D. A.; SCHREIBER, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, p. 433-439, 2004.

PRASAD, S., TYAGI, A.K. Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer. **Gastroenterology research and practice**, v. 2015, p. 1-11, 2015.

QI, F.; ZHAO, L.; ZHOU, A.; ZHANG, B.; LI, A.; WANG, Z.; HAN, J. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer. **Biosci Trends**, v. 9, p. 16-34, 2015.

RADHAKRISHNAN, E.; BAVA, S. V.; NARAYANAN, S. S.; NATH, L. R.; THULASIDASAN, A. K. T.; SONIYA, E. V. [6]-Gingerol induces caspase-dependent apoptosis and prevents PMA-induced proliferation in colon cancer cells by inhibiting MAPK/AP-1 signaling. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104401, 2014.

RASTOGI, N.; GARA, R. K.; TRIVEDI, R.; SINGH, A.; DIXIT, P.; MAURYA, R.; MISHRA, D. P. (6)-Gingerol-induced myeloid leukemia cell death is initiated by reactive oxygen species and activation of miR-27b expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 288-301, 2014.

RASTOGI, N.; DUGGAL, S.; SINGH, S. K.; PORWAL, K.; SRIVASTAVA, V. K.; MAURYA, R.; BHATT, M. L. B.; MISHRA D. P. Proteasome inhibition mediates p53 reactivation and anti-cancer activity of 6-Gingerol in cervical cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43310, 2015.

READER, J.; HOLT, D.; FULTON, A. Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, n. 3-4, p. 449-463, 2011.

RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; MARIN-HERNANDEZ, A.; GALLARDO-PEREZ, J.C.; MORENO-SANCHEZ R. Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells. **Journal of cellular physiology**, v. 221, n. 3, p. 552-559, 2009.

RUANA, D.; SO, S. P. Prostaglandin E 2 produced by inducible COX-2 and mPGES-1 promoting cancer cell proliferation in vitro and in vivo. **Life sciences**, v. 116, n. 1, p. 43-50, 2014.

SALIM, A. A.; CHIN, Y. W.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from plants. **Bioactive molecules and medicinal plants**, p. 1-24, 2008.

SCHADICH, E.; HLAVÁČ, J.; VOLNÁ, T.; VARANASI, L.; HAJDÚCH, M.; DŽUBÁK, P. Effects of ginger phenylpropanoids and quercetin on Nrf2-ARE pathway in human BJ fibroblasts and HaCaT keratinocytes. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

SEDGER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 4, p. 453-472, 2014.

SEMWAL, R. B.; SEMWAL, D. K.; COMBRINCK, S.; VILJOEN, A. M. Gingerols and shogaols: important nutraceutical principles from ginger. **Phytochemistry**, v. 117, p. 554-568, 2015.

SERHAN C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92-101, 2014.

SERHAN, C. N.; PETASIS, N. A. Resolvins and protectins in inflammation resolution. **Chemical reviews**, v. 111, n. 10, p. 5922-5943, 2011.

SHARIF, T.; ALHOSIN, M.; AUGER, C.; MINKER, C.; KIM, J. H.; ETIENNE-SELLOUM, N.; BORIES, P.; GRONEMEYER, H.; LOBSTEIN, A.; BRONNER, C.; FUHRMANN, G.; SCHINI-KERTH, V. B. Aronia melanocarpa juice induces a redox-sensitive p73-related caspase 3-dependent apoptosis in human leukemia cells. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32526, 2012.

SHUKLA, Y.; SINGH, M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 5, p. 683-690, 2007.

SIMONE, N. L.; SOULE, B. P.; LY, D.; SALEH, A. D.; SAVAGE, J. E.; DEGRAFF, W.; COOK, J.; HARRIS, C. C.; GIUS, D.; MITCHELL, J. B. Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6377, 2009.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. C.; ARAÚJO, D. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, W. F.; ARAUJO, W. M.; JUNIOR, J. C. M.; MORGADO, J. A. Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 30-33, 2014.

SPORN, M. B.; LIBY, K.T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 8, p. 564-571, 2012.

SRINIVASAN, K. Antioxidant potential of spices and their active constituents. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 3, p. 352-372, 2014.

SU, L.; NALLE, S. C.; SHEN, L.; TURNER, E. S.; SINGH, G.; BRESKIN L. A.; KHRAMTSOVA, E. A.; KHRAMTSOVA, G.; TSAI, P.Y.; FU, Y. X.; ABRAHAM, C.; TURNER, J. R. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. **Gastroenterology**, v. 145, n. 2, p. 407-415, 2013.

SUNDARESAN, M.; YU, Z. X.; FERRANS, V. J.; IRANI, K.; FINKEL, T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 296, 1995.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768-780, 2003.

SEYED, A. M; JANTAN; VIJAYARAGHAVAN, K; BUKHARI, S. N. A. Betulinic acid: recent advances in chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising anticancer therapy. **Chemical biology & drug design**, v. 87, n. 4, p. 517-536, 2016.

RAUF, A.; IMRAN, M.; BUTT, M. S.; NADEEM, M.; PETERS, D. G.; MUBARAK, M. S. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 9, p. 1428-1447, 2018.

TAHIR, A. A.; SANI, N. F. A.; MURAD, N. A.; MAKPOL S.; NGAH, W. Z. W.; YUSOF, Y. A. M. Combined ginger extract & Gelam honey modulate Ras/ERK and PI3K/AKT pathway genes in colon cancer HT29 cells. **Nutrition journal**, v. 14, n. 1, p. 31, 2015.

TAN, S.; DE VRIES, G.E.; VAN DER ZEE, A. G. J.; DE JONG, S. Anticancer drugs aimed at E6 and E7 activity in HPV-positive cervical cancer. **Current cancer drug targets**, v. 12, n. 2, p. 170-184, 2012.

TIDEFELT, U.; ELMHORN-ROSENBORG, A.; PAUL, C.; HAO, X.Y.; MANNERVIK B., ERIKSSON, L. C. "Expression of glutathione transferase π as a predictor for treatment results at different stages of acute nonlymphoblastic leukemia". **Cancer Research**, v.52, n.12, p. 3281-3285, 1992.

TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M. A.; VALLE, N. R.; HUANG, P. Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10, n.8 p.1343-1374, 2008.

TUNTIWECHAPIKUL, W.; TAKA, T.; SONGSOMBOON, C.; KAEWTUNJAI, N.; IMSUMRAN, A.; MAKONKAWKEYOON, L. Ginger extract inhibits human telomerase

reverse transcriptase and c-Myc expression in A549 lung cancer cells. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.6, p.1347-1354, 2010.

VEMURI, S. K.; BANALA, R. R.; SUBBAIAH, G. P. V.; SRIVASTAVA, S. K.; REDDY, A. G.; MALARVILI, T. Anti-cancer potential of a mix of natural extracts of turmeric, ginger and garlic: A cell-based study. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 4, p. 332-344, 2017.

VINCENT, J. L.; SUN, Q.; DUBOIS, M. J. “Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock”. **Clinical Infectious Diseases**, v.34, n.8, p. 1084-1093, 2002.

VIPIN, A. V.; RAKSHA, R. K; NAWNEET, K. K.; ANU, A. K. A.; VENKATESWARAN, G. Protective effects of phenolics rich extract of ginger against Aflatoxin B1-induced oxidative stress and hepatotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p.415–424, 2017.

WANG, B.; SUN, J.; MA, Y.; WU, G.; TIAN, Y.; SHI, Y.; LE, G. Resveratrol preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and attenuates oxidative stress in regulatory T cells of mice fed a high-fat diet. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 9, p. 1823-31, 2014.

WANG, S.; SUN, X.; JIANG, L.; LIU, X.; CHEN, M.; YAO, X.; SUN, Q.; YANG, G. 6-Gingerol induces autophagy to protect HUVECs survival from apoptosis. **Chemico-biological interactions**, v.256, p.249-256, 2016.

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

WARIS, G.; AHSAN, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. **Journal of Carcinogenesis**, v. 5, n. 14, p. 1-8, 2006.

WEHNER, S.; STRAESSER, S.; VILZ, T. O.; PANTELIS, D.; SIELECKI, T.; CRUZ, V. F.; HIRNER, A.; KALFF, J. C. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase pathway as prophylaxis of postoperative ileus in mice. **Gastroenterology**, v. 136, n. 2, p. 619–629, 2009.

WEN, S. H.; LING, Y. H.; LI, Y.; LI, C.; LIU, J. X.; LI Y. S.; YAO, X.; XIA, Z. Q.; LIU, K. X. Ischemic postconditioning during reperfusion attenuates oxidative stress and intestinal mucosal apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion via aldose reductase. **Surgery**, v. 153, n. 4, p. 555–564, 2013.

WONG, Y. N.; ROSSIGNOL, D.; ROSE, J. R.; KAO, R.; CARTER A.; LYNN, M. “Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of E5564, a lipid A antagonist, during an ascending single-dose clinical stud”. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.43, n.7, p.735-742, 2003.

WOO, C. H.; EOM, Y. W.; YOO, M. H.; YOU, H. J.; HAN, H. J.; SONG, W. K.; YOO, Y. J.; CHU, J. S.; KIM, J. H. Tumor necrosis factor-alpha generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A2-linked cascade. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 41, p. 32357-32362, 2000.

WU, S.; KO, Y. S.; TENG, M. S.; KO Y. L.; HSU, L. A.; HSUEH C.; CHOU, Y. Y.; LIEW, C. C.; LEE Y. S. Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: In vitro and in vivo studies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 12, p. 1595–1607, 2002.

WYCKOFF, T. J. O.; RAETZ, C. R. H.; JACKMAN J. E. “Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin”. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 154-159, 1998.

XIA, B.; LIU, H.; XIE, J.; WU, R.; LI, Y. Akt enhances nerve growth factor-induced axon growth via activating the Nrf2/ARE pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, n. 5, p. 1426-1432, 2015.

YAMAMOTO, Y.; KONISHI, H.; ICHIKAWA, D.; ARITA, T.; SHODA, K.; KOMATSU, S.; SHIOZAKI, A.; IKOMA, H.; FUJIWARA, H.; OKAMOTO, K.; OCHIAI, T.; INOUE, J.; INAZAWA, J.; OTSUJI, E. “Significance of GSTP1 for predicting the prognosis and chemotherapeutic efficacy in esophageal squamous cell carcinoma,” **Oncology Reports**, v. 30, n. 4, p. 1687-1694, 2013.

YANG, Q.; LI, W.; SHE, H.; DOU, J.; DUONG, D. M.; DU, Y.; YANG, S. H.; SEYFRIED, N. T.; FU, H.; GAO, G.; MAO, Z. Stress induces p38 MAPK-mediated phosphorylation and inhibition of Drosha-dependent cell survival. **Molecular Cell**, v. 57, n. 4, p. 721-734, 2015.

YEHYA, A. H.; ASIF, M.; TAN, Y. J.; SASIDHARAN, S.; MAJID, A. M. A.; OON, C. E. Broad spectrum targeting of tumor vasculature by medicinal plants: An updated review. **Journal of Herbal Medicine**, v. 9, p. 1-13, 2017.

YILDRIN, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

YONG, H. Y.; KOH, M. S.; MOON, A. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 8, n. 12, p. 1893-1905, 2009.

YOON, S. O.; KIM, M. M.; CHUNG, A. S. In hibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.23, p.20085-20092, 2001.

YOUNG, H. Y.; CHEN, G. L. Analytical and stability of ginger reparations, **Journal of Food Drug Analysis**, v. 10, p. 149-153, 2002.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological reviews**, v. 74, n. 1, p. 139-163, 1994.

YUSOF, Y. A. M.; AHMAD, N. S.; SULAIMAN, S.; MURAD, N. A. Chemopreventive efficacy of ginger (*Zingiber officinale*) in ethionine induced rat hepatocarcinogenesis. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 1, p. 87-93, 2009.

ZAIDI, N.; LUPIEN, L.; KUEMMERLE, N. B.; KINLAW, W. B.; SWINNEN, J. V.; SMANS, K. Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids, **Progress in lipid research**, v. 52, n. 4, p. 585-589, 2013.

ZHANG, F.; ZHANG, J. G.; QU, J.; ZHANG, Q.; PRASAD, C.; WEI, Z. J. F. Assessment of anti-cancerous potential of 6-gingerol (Tongling White Ginger) and its synergy with drugs on human cervical adenocarcinoma cells, **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 910-922, 2017.

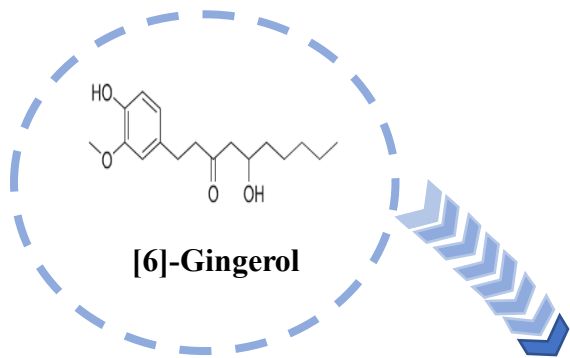
ZHANG, J.; SHEN, B.; LIN, A. Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. **Trends in pharmacological sciences**, v.28, n.6, p. 286-295, 2007.

ZHANG, Q.; ZHU, B.; LI, Y. Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: A New Approach for Anticancer Therapy. **Frontiers in immunology**, v. 8, n.71, p. 1-11, 2017.

ZHU, J.; WANG, H.; CHEN, F.; FU, J.; XU, Y.; HOU, Y.; KOU, H. H.; ZHAI, C.; NELSON, M. B.; ZHANG, Q. An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 99, p. 544-556, 2016.

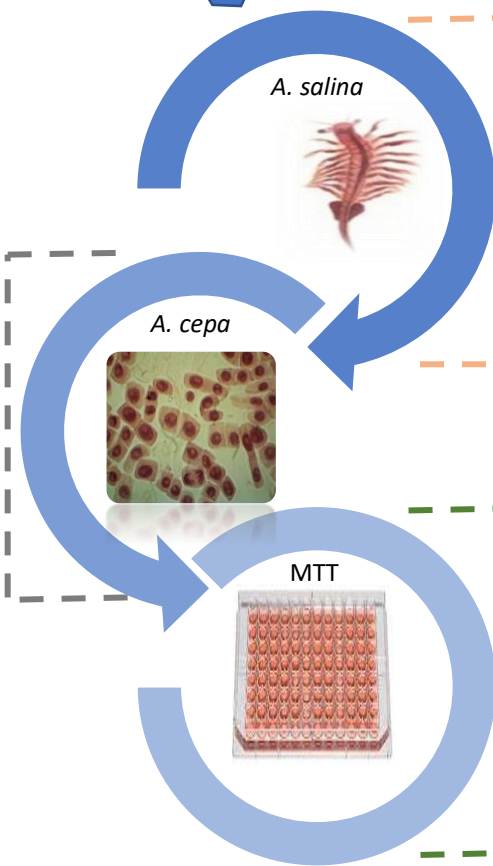
ZOU, D. B.; WEI, X.; HU, R. L.; YANG, X. P.; ZUO, L.; ZHANG, S. M.; ZHU, H. Q.; ZHOU, Q.; GUI, S. Y.; WANG, Y. Melatonin inhibits the migration of colon cancer RKO cells by down-regulating myosin light chain kinase expression through cross-talk with p38 MAPK. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 14, p. 5835-5842, 2015.

CAPÍTULO 2



5, 10, 20, 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
 ✓ Toxicidade
 ✓ Citotoxicidade

 >40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
 ✓ Genotoxicidade
 ✓ Mutagenicidade



5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
 <5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
 ⓧ Toxicidade

 >10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
 ✓ Toxicidade
 ✓ Redução sobrevivência

CL50

	24 h	48 h
	40,57	24,08

1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25;
 50; 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

 ✓ Citotoxicidade
 ✓ Redução viabilidade

CL50

	PBMC	S180	HL60
	11,18	5,73	1,14

Avaliação tóxica, citotóxica, citogenética e antitumoral do [6]-Gingerol em estudos não clínicos

Toxic, cytotoxic, cytogenetic and antitumor evaluation of [6]-Gingerol in non-clinical studies

Rosália Maria Tôres de Lima, Antonielly Campinho dos Reis, José Victor de Oliveira Santos, José Roberto de Oliveira Ferreira, Antonio Lima Braga, José Williams Gomes de Oliveira Filho, Ag-Anne Pereira Melo de Menezes, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, Juan Carlos Ramos Gonçalves, Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva, João Marcelo de Castro e Sousa, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Artigo submetido no periódico
Biomedicine & Pharmacotherapy (ANEXO B)
QUALIS B1 – Biotecnologia

Resumo

O [6]-Gingerol ((S)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-decanona) é uma substância fenólica com propriedades farmacológicas. O estudo teve por objetivo avaliar os efeitos toxicogênicos do [6]-Gingerol em *Artemia salina*, *Allium cepa* e atividade antitumoral em células do líquido ascítico de Sarcoma 180 (S-180) e linhagem humana de Leucemia Promielocítica Aguda (HL-60). Nas análises tóxicas e genotóxicas foram utilizadas as concentrações de 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, sendo que, na avaliação citotóxica por meio do teste MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) empregou-se diluições seriadas (1,56; 3,12; 6,25; 12,25; 25; 50; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) em S-180, linhagem HL-60 e células mononucleadas de sangue periférico (PBMC). No teste MTT, a concentração letal (CL 50) do [6]-Gingerol, apontou melhor eficiência citotóxica em HL-60 (1,14) e S-180 (5,73), sendo necessária uma CL 50 maior em PBMC (11,18), indicando sua possível seletividade. A menor concentração testada (5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) do [6]-Gingerol não apresentou efeitos tóxicos em *Allium cepa* e *Artemia salina*. Entretanto, em concentrações maiores (>10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) foram observadas toxicidade e genotoxicidade sobretudo em 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ no ensaio *A. cepa*. Os mecanismos citogenéticos indicativos de apoptoses, tais como toxicidade, citotoxicidade e anormalidades nucleares (pontes, fragmentos, atrasos, cromossomos soltos e micronúcleos) sugerem que o [6]-Gingerol é uma substância de importância para formulações farmacêuticas antitumorais.

Palavras – Chave: [6]-Gingerol, toxicogênica e atividade antitumoral.

1 INTRODUÇÃO

As plantas e seus compostos bioativos estão inseridos nas práticas medicinais desde a antiguidade (AUNG, 2017). Aproximadamente 80% da população mundial dependem de medicamentos tradicionais e mais de 60% dos medicamentos anticancerígenos clinicamente aprovados são derivados de plantas medicinais (CRAGG; NEWMAN; YANG, 2006; KHAN, 2014). Os fitoquímicos integram um conjunto heterogêneo de compostos bioativos classificados de acordo com as variantes estruturais, dentre os quais, destacam-se os polifenóis, caracterizados por possuírem anel (s) aromático (s) contendo um ou mais grupos de hidroxila (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006; HOWES; SIMMONDS, 2014).

Os polifenóis estão entre os fitoquímicos mais abundantes, destacam-se por possuírem diversas propriedades biológicas, tais como atividade antioxidante (QUIDEAU et al., 2011; ADEBIYI et al., 2017), anti-inflamatória (DONGARE et al., 2016; LI et al., 2017) e antitumoral (IMPHENG et al., 2015; RASTOGI et al., 2015), demonstrando ação na prevenção da carcinogênese (RAHMAN; AKHTAR, 2017) e indução apoptótica em diversas linhagens tumorais devido à seus efeitos pró-oxidantes (PROCHÁZKOVÁ; BOUSOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; FISHER et al., 2015; M'HAMED et al., 2016). Atuam como antioxidantes por meio do sequestro de radicais livres proporcionando efeito protetor e preventivo aos danos celulares (YORDI et al., 2012), entretanto, tais compostos em altas concentrações ou na presença de íons metálicos podem se comportar como pró-oxidantes levando à degradação do DNA (HALLIWELL, 2008).

O rizoma do gengibre (*Zingiber officinale*, Família Zingiberaceae) comumente utilizado como tempero, apresenta abundância em compostos bioativos, incluindo os polifenóis aromáticos [4]-, [6]-, [8]-, [10]- e [12]-gingerol. Os gingeróis são uma série de compostos fenólicos que diferem no comprimento de suas cadeias laterais alquila não ramificadas, sendo o [6]-G ((S)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-decanona), a forma mais identificada no rizoma fresco (SHAO et al., 2010; LIM, 2016; BERNARD; MCCONNERY; HOSKIN, 2017; SAMAD et al., 2017), destaca-se por possuir a maior parte das investigações acerca das atividades antitumorais dos gingeróis (SEMWAL et al., 2015; AKIMOTO et al., 2015), além de demonstrar potencial anti-inflamatório (LI et al., 2013; FAN; YANG; BI, 2015; EL-NAGGAR et al., 2017) e antioxidante (LEE et al., 2011; LI et al., 2017; DANWILAI et al., 2017).

As controvérsias relacionadas aos polifenóis como possíveis antioxidantes e pró-oxidantes (HALLIWELL, 2008) podem servir de estratégias terapêuticas na modulação do

estresse oxidativo no câncer e inflamação, incluindo terapia antioxidante e “terapia de oxidação”. Efeitos citotóxicos (incluindo superprodução de espécies reativas de oxigênio EROs) quando alcançam seletividade adequada, podem ser usados na destruição de células cancerígenas (FANG; SEKI; MAEDA, 2009). Os compostos polifenóis e flavonoides de plantas medicinais são indicados por atingir caminhos específicos contra o crescimento de células cancerígenas (EL BAIRI et al., 2016; BOUYAHYA et al., 2016).

A avaliação da toxicidade genética é de importância para identificar e caracterizar o papel de mutágenos e carcinógenos na saúde humana, na mensuração de danos primários, de mutações em genes, danos em cromossomos para avaliação de riscos de instabilidade genética e de efeitos carcinogênicos (ZEIGER et al., 2015), uma vez que, para ser altamente eficaz, as intervenções dentro das redes biológicas devem ser múltiplas, mas extremamente seletivas, para poupar os órgãos normais de efeitos colaterais prejudiciais (AZMI, 2012), especialmente em compostos com propriedades terapêuticas.

Neste contexto, é importante a aplicação de testes toxicogenéticos não clínicos essenciais para a segurança na identificação das atividades antitumorais de candidatos a terapia do câncer, como estratégia para a prevenção de instabilidade genética. Assim, o estudo teve por objetivo avaliar os efeitos toxicogenéticos do [6]-G em modelos não clínicos, como *Artemia salina* e *Allium cepa*, bem como seus efeitos antitumorais em células do líquido ascítico de camundongos com S-180, linhagem tumoral HL-60, e em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e produtos químicos

A substância isolada [6]-Gingerol ($C_{17}H_{26}O_4$) (PubChem CID: 442793) grau de pureza $\geq 98\%$ (HPLC), foi adquirida por meio da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), obtidos da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (São Paulo, Brasil), foi utilizado como padrão para os testes de *A. salina* e *A. cepa*. Para o teste de MTT foi empregado o meio de cultura RPMI 1640, penicilina e estreptomicina da GIBCO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A doxorubicina (Dox) foi obtida da Eurofarma Laboratórios S.A. (São Paulo, Brasil). O [6]-G foi solubilizado em quatro diferentes concentrações (5, 10, 20 e 40 $\mu g \cdot mL^{-1}$), utilizando como solventes água destilada e dimetilsulfóxido (DMSO) obtido da Merck Millipore (São Paulo, Brasil).

2.2 Análise cromatográfica do padrão sigma [6]-G

O composto padrão [6]-G foi analisado por técnicas acopladas como HPLC-DAD, LC-MS. Para o análise preparou-se uma solução de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol 95% do padrão. A análise por HPLC-DAD foi realizada em cromatógrafo de alta eficiência (CLAE), SHIMADZU®, modelo LC-20 A. Controlador CBM-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M20, coluna C18 Phenomenex Luna, $5 \mu\text{m}$ ($250 \times 4,60 \text{ mm}$) em gradiente MeOH:H₂O (5-100% MeOH).

Os espectros de LC-HRESIMS foram obtidos utilizando um sistema Thermo Instruments MS (LTQ XL / LTQ Orbitrap Discovery) acoplado a um sistema de HPLC Thermo Instruments (detector Accela PDA, amostrador automático Accla PDA e bomba Accela). Foram utilizadas as seguintes condições: tensão capilar 45 V, temperatura capilar 250 °C, taxa de fluxo de gás auxiliar 10-20 unidades arbitrárias, taxa de fluxo do gás da bainha 40-50 unidades arbitrárias, voltagem de pulverização 4,5 kV, faixa de massa 100-2000 amu (resolução máxima 30000). O sistema de HPLC foi executado usando uma coluna C18 analítica SunFire ($5 \mu\text{m}$, 100 \AA , $4,6 \times 150 \text{ mm}$), com um gradiente de 0,1% de ácido fórmico em H₂O: ácido fórmico 0,1% em MeOH 0 - 100% em 30 min, com uma taxa de fluxo $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.3 Preparação da amostra teste

A substância isolada [6]-G foi solubilizada em DMSO a 10% e diluída em água destilada até atingir as concentrações finais de 5, 10, 20 e $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo posteriormente utilizadas nos testes de *A. salina* e *A. cepa*. Para o teste de MTT, foi empregada diluição seriada a partir da concentração inicial de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ do [6]-G, solubilizado em DMSO estéril.

2.4 Teste de letalidade em *A. salina*

Na avaliação da toxicidade utilizou-se o ensaio de letalidade em náuplios de *A. salina* (MEYER et al., 1982), em que os cistos foram incubados em água salina artificial (39,35 mM NaCl; 18,66 mM MgCl₂ · 6 H₂O; 28,16 mM Na₂SO₄; 8,84 mM CaCl₂ · 2 H₂O e 9,38 mM de KCl em 1000 mL de água) a 25 – 30 °C. O bicarbonato de sódio (Na₂CO₃) foi utilizado como tampão até atingir o pH 9,0 da solução de salmoura. Após 48 h de incubação, 10 náuplios vivos e ativos foram transferidos para tubos de ensaio, contendo o [6]-G nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O volume final de cada amostra foi ajustado para 5 mL com solução salina artificial e água ausente de cloro (1:1, v.v⁻¹). As amostras foram mantidas sob a mesma condição de incubação por 24 – 48 h adicionais. Náuplios vivos foram contados

macroscopicamente para determinar o número de mortes por concentração. Água salina e $K_2Cr_2O_7$ ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram utilizados como controles negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente. Os tratamentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como porcentagem da sobrevivência.

2.5 Bioensaio em *Allium cepa*

A atividade tóxica e citotóxica da substância [6]-G, foi rastreada utilizando raízes e células da região meristemática em bulbos saudáveis de cebola branca comum (*A. cepa*) com tamanho padronizado (2,0 - 3,0 cm de diâmetro) adquiridos no mercado local de Teresina-PI. Para o experimento, os catáfilos externos soltos e raízes antigas foram removidas com o auxílio de bisturi, de modo a expor o ápice da raiz de *A. cepa*, evitando que a área radicular fosse danificada. Os bulbos foram lavados em água ausente de cloro, cada grupo experimental (cinco bulbos) foi submetido à exposição em [6]-G (5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), controle negativo (água sem cloro) e controle positivo ($2,40 \cdot 10^{-3}$ mM sulfato de cobre), onde foi calculado a média do número e comprimento de raízes (efeito tóxico), índice mitótico e frequências de anormalidades nas células do meristema de raiz (efeito genotóxico e mutagênico) após 24 – 48 h de exposição. Em seguida, as raízes foram seccionadas, fixadas em solução Carnoy (etanol:ácido acético glacial, 3:1, v.v⁻¹) durante 24 h a 4 °C e estocadas em etanol 70 %. Posteriormente, as raízes foram hidrolisadas com ácido clorídrico 1 N (HCl), expostas a solução de *Schiff* e encaminhadas para coloração com Carmim acético 2 % seguida de montagem da lâmina utilizando a técnica de *Squash* (BORBOA; DE LA TORRE, 1996), e posterior observação e captura fotomicroscópica com ampliação (40 x), para analisar a genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos induzidos durante o tratamento nos grupos experimentais e controles. Um total de 1000 células/bulbo foram analisadas, totalizando 5000 células por grupo de tratamento. Observaram-se os seguintes parâmetros para atividade tóxica e citotóxica: (a) média do número e crescimento de raiz (CR); (b) índice mitótico (IM) (FISKESJO, 1997), (c) índice das fases (IF) (BAKARE et al., 2000), (d) frequência de mutagenicidade (FM) e (e) frequência de aberrações cromossômicas (AC) em mitose. A porcentagem de IM, IF, FM e AC foi calculada pelas Eqs. (1), (2), (3), (4):

$$\text{IM} = \text{Nm}/\text{Nt} \times 100$$

$$\text{IF} = \text{Nf}/\text{Nt} \times 100$$

$$\text{FM} = \text{Nmi}/\text{Nt} \times 100$$

$$\text{AC} = \text{Nac}/\text{Nm} \times 100$$

onde, IM (%) é o percentual de índice mitótico; Nm é o número de células em mitose; Nt é o número total de células; IF (%) é o índice de porcentagem de fase; e Nf é o número de células em mitose na fase; FM (%) é a frequência de mutagenicidade, Nmi é o número de micronúcleos; AC (%) é o índice de aberrações cromossômicas mitóticas; e Nac é o número de aberrações cromossômicas.

2.6 Viabilidade celular em MTT

O ensaio do MTT foi utilizado para avaliar a capacidade citotóxica do [6]-G, de acordo com MOSMANN (1983). As culturas celulares (HL-60, S-180, PBMC) foram distribuídas em placas de multipocinhos com 96 cavidades, numa densidade de $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Os grupos experimentais triplicados ficaram subdivididos em controle negativo (meio de cultura), controle positivo (doxorubicina: 2 µg.mL⁻¹; 0,3 µg.mL⁻¹ para HL-60/S-180 e PBMC, respectivamente), e [6]-G (1,56; 3,12; 6,25; 12,25; 25; 50; 100 µg.mL⁻¹), onde posteriormente seguiram para incubação por 68 h juntamente com as células. Após o período de incubação, foi adicionado às culturas, 20 µL da solução de MTT (5 mg.mL⁻¹) e reincubadas durante 4 h em estufa a 37 °C e a 5% CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as placas, cuidadosamente, armazenadas ao abrigo da luz, sendo deixadas *overnight* para secagem completa. Posteriormente, o precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de álcool isopropílico. Para a quantificação do sal reduzido pelas células viáveis, as absorbâncias foram medidas em leitor de microplacas a 550 nm. Os dados de absorvância foram normalizados para controle (Absorvância do tratamento/Absorvância do controle x 100).

2.7 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão (EP). Todas as análises foram realizadas empregando o software *GraphPad Prism 6*, e por meio do teste *Shapiro-Wilk* os dados foram previamente normalizados. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA com pós hoc de *Tukey*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados do ensaio *A. salina* e MTT foram normalizados, transformados em logaritmo e submetidos a uma regressão não linear, afim de ser encontrado a CL50 em ambos os ensaios.

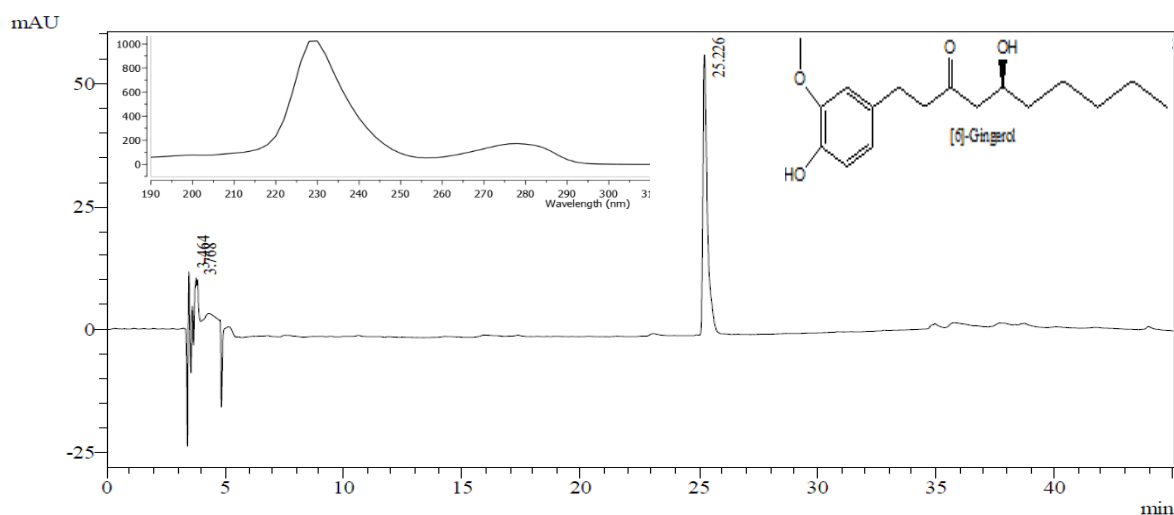
3 RESULTADOS

3.1 Confirmação do padrão [6]-G HPLC–UV e HPLC–ES-MS

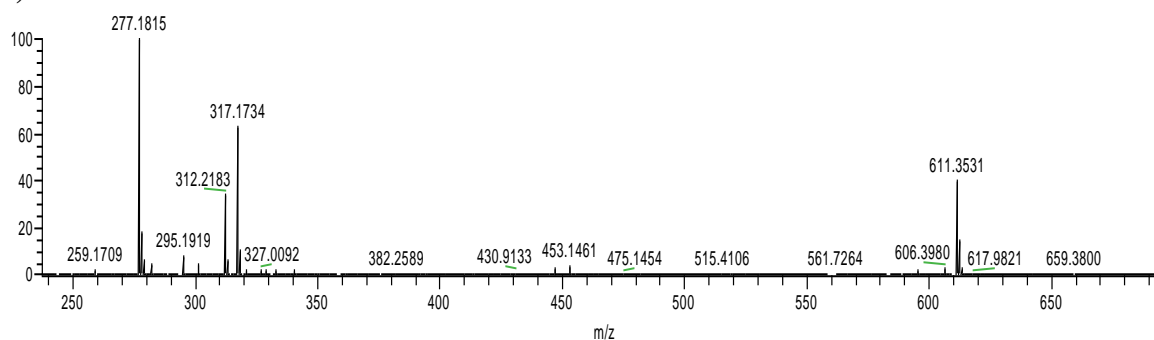
O cromatograma do HPLC–UV e o espectro de massas HRESI-MS são apresentados nas figuras 1A e 1B, respectivamente. O pico em 25.22 min mostrou UV característico de compostos de gingerol tendo absorção máxima de UV em 279 nm e um ombro em 230 nm. A molécula protonada $[M+H]^+$ apresentou íon em m/z 295.1919, íon aducto $[M+Na]^+$ em 317.1734 e um íon dímero sodiado $[2M+Na]^+$ em m/z 611.3531 identificado como [6]-G.

Figura 1 - Cromatograma no modo analítico em gradiente liner em 254 nm e espectro de UV do padrão [6]-G (A), espectro de massas do [6]-G (B).

(A)



(B)

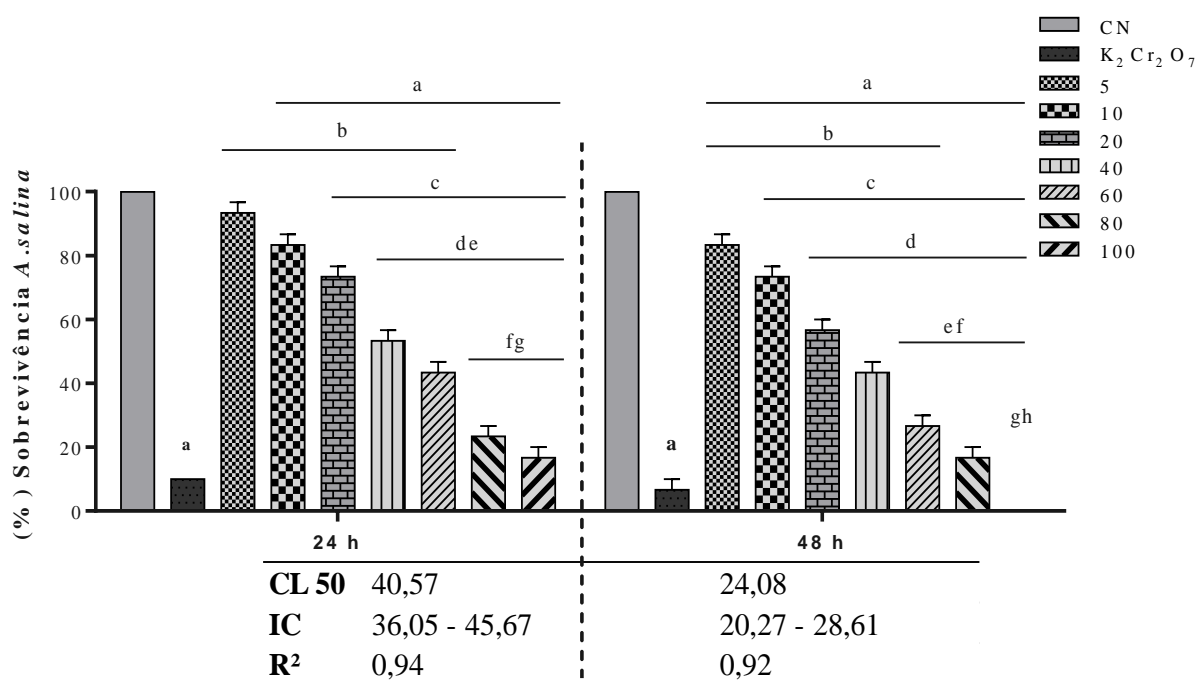


3.2 Efeitos tóxicos do [6]-G em *A. salina*

A toxicidade foi avaliada em *A. salina* indicou ausência significativa ($p > 0,05$) de efeitos tóxicos na menor concentração testada ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) quando relacionada ao CN, entretanto, foi evidente o decaimento do percentual de sobrevivência à medida que os náuplios

eram expostos a crescentes concentrações de [6]-G, os percentuais de sobrevivência variaram de $93,33 \pm 3,33$ a $16,66 \pm 3,33$ % nas primeiras 24 h, seguidos de $83,33 \pm 3,33$ a $0,00 \pm 0,00$ % em 48 h de exposição (**Figura 2**).

Figura 2 - Efeitos tóxicos do [6]-G em *A. salina*. Os valores são médias \pm erro padrão (SEM) ($n = 3$, triplicata, 10 náuplios vivos/tubo); $p < 0,05$ quando comparadas ao ^aCN, ^bK₂Cr₂O₇ e concentrações ^c5; ^d10; ^e20; ^f40; ^g60; ^h80 e ⁱ100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do [6]-G no mesmo período de tempo. ANOVA seguido de Tukey (múltiplas comparações) *pós-teste* de sentido único. CN: controle negativo; K₂Cr₂O₇: dicromato de potássio ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); CL 50: concentração que indica 50 % de letalidade; IC: intervalo de confiança; R²: coeficiente de determinação.



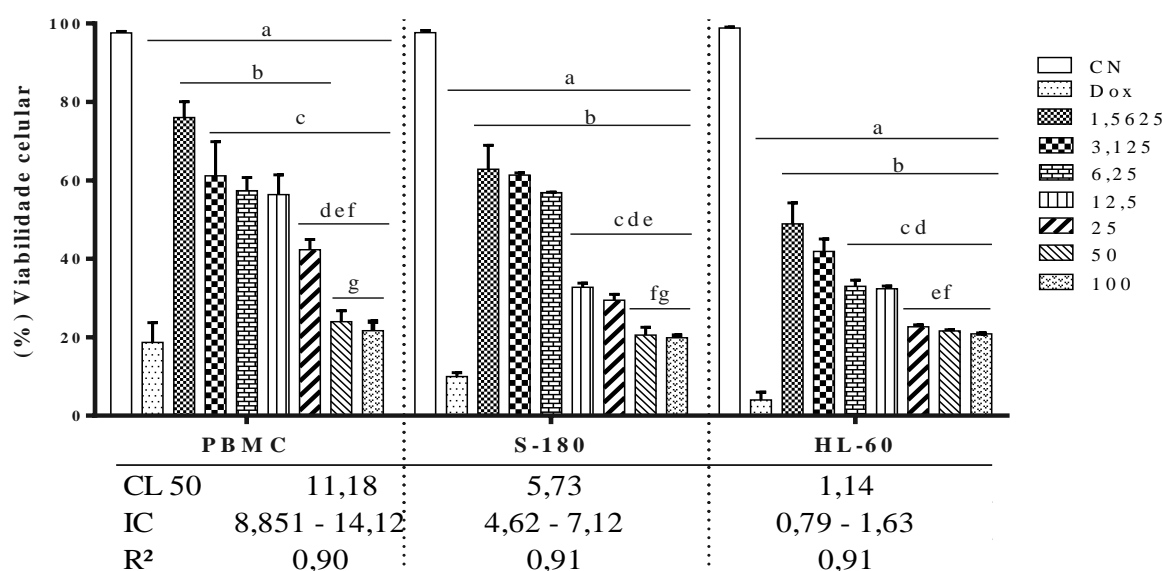
Observou-se nas concentrações de 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ diferença significativa em relação ao CN e K₂Cr₂O₇, sugerindo efeitos tóxicos, porém, menos danosos quando comparados as concentrações mais elevadas (80, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), estas não diferiram em relação ao K₂Cr₂O₇ e sugerem elevado efeito tóxico em ambos os tempos de tratamento. Na avaliação da concentração letal (CL 50) foram mensurados valores de 40,57 e 24,08 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do [6]-G, nos períodos de 24 e 48 h de tratamento, respectivamente.

3.3 Efeito do [6]-G na viabilidade celular em PBMC, cultura primária de S-180 e linhagem HL-60

O [6]-G nas concentrações testadas interferiram significativamente ($p < 0,05$) na viabilidade de células mononucleadas de sangue periférico (PBMC), cultura primária de S-180 e linhagem HL-60 quando relacionadas aos grupos não tratados (CN), sobretudo nas maiores

concentrações, indicando efeitos citotóxicos. Verificou-se nas células normais (PBMC), que o [6]-G apresentou viabilidade de $76,03 \pm 2,33$ % a $21,67 \pm 2,33$ % entre as concentrações de 1,5625 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto a Dox ($0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apontou sobrevivência de $18,68 \pm 2,90$ %, indicando que o [6]-G apresentou efeitos menos tóxicos que a Dox em células normais nas concentrações de 1,5625 a $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uma vez que diferiram estatisticamente da droga convencional, em contrapartida, as concentrações mais altas do [6]-G (50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não demonstraram diferir dos efeitos citotóxicos obtidos na Dox. Foram observadas diferenças estatísticas nas células tumorais (S-180/HL-60) entre todas as concentrações testadas do [6]-G e a Dox ($2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), para ambas as células, sugerindo efeito citotóxico mais efetivo da Dox, verificou-se ainda que na cultura primária (S 180) as concentrações menores ($1,5625$, $3,125$, $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e maiores (50 , $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não diferem estatisticamente entre si, assim como, as concentrações menores ($1,5625$, $3,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e maiores (25 , 50 , $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) da linhagem HL - 60 (**Figura 3**).

Figura 3 - Viabilidade celular avaliada pelo ensaio MTT em células PBMC, S-180 e HL-60 após 72 h de exposição. Valores representam a média \pm erro padrão (SEM) de três experimentos independentes. $p < 0,05$ quando comparadas ao ^aCN, ^bDox (PBMC: $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$; S-180/HL-60: $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e concentrações ^c1,5625; ^d3,125; ^e6,25; ^f12,5; ^g25; ^h50 e ⁱ100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do [6]-G. CN: células não tratadas. CL 50: concentração que indica 50% de inibição; IC: intervalo de confiança; R^2 : coeficiente de determinação. ANOVA seguido de Tukey (múltiplas comparações) *pós-teste* de sentido único.

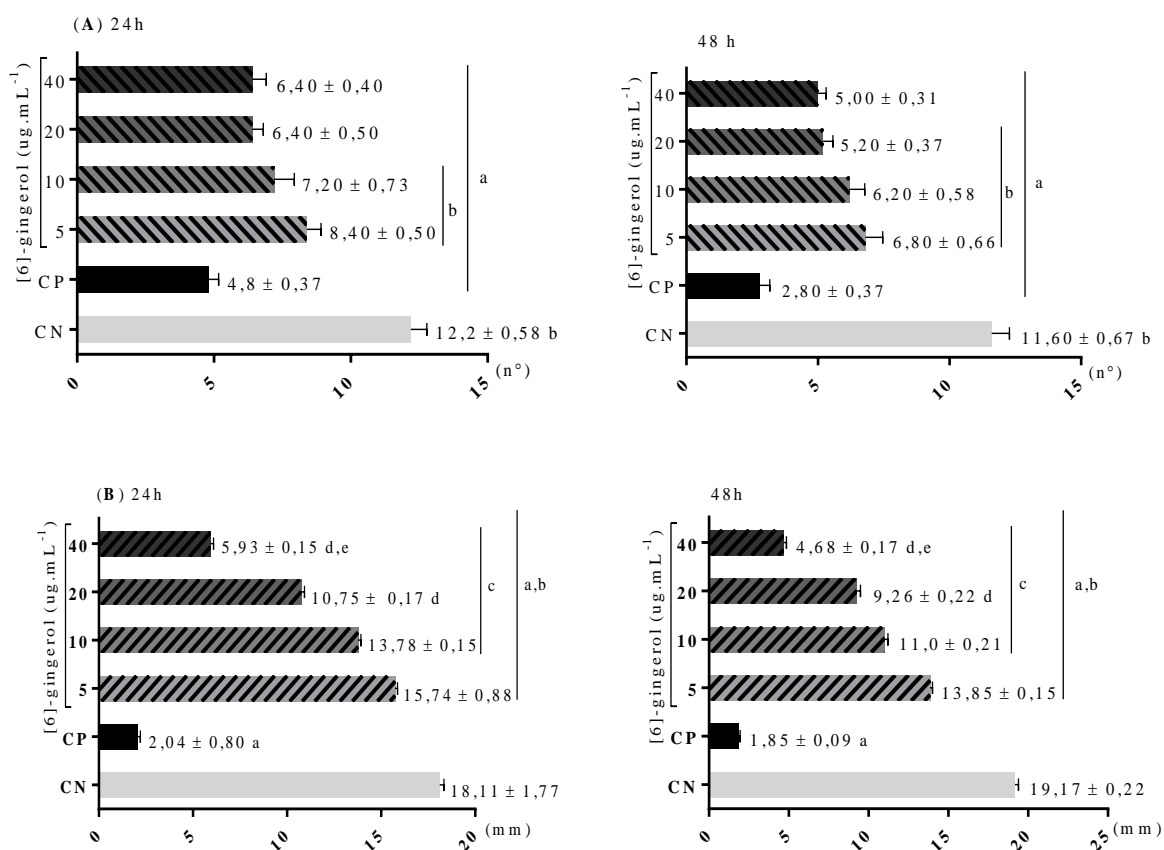


A concentração letal (CL 50) aponta melhor eficiência do [6]-G na linhagem HL-60 (1,14) e cultura primária S-180 (5,73), demonstrando capacidade na redução da viabilidade celular tumoral, entretanto, em células normais PBMC (11,18) foi necessário CL 50 maior para atingir 50% de inibição, tais informações indicam uma possível seletividade do [6]-G frente a inibição das células tumorais avaliadas.

3.4 Efeitos tóxicos do [6]-G e controles em *A. cepa*

Os efeitos tóxicos do [6]-G em raízes de *A. cepa*, avaliados por meio de parâmetros macroscópicos (número e crescimento radicular). Observou-se redução do tamanho de raízes durante o tratamento com [6]-G de forma dependente da concentração. As raízes do CN apresentaram comprimento médio de $18,11 \pm 0,22$ e $19,17 \pm 0,22$ mm após 24 e 48 h, respectivamente, entretanto, no tratamento com [6]-G, em todas as concentrações testadas houve diminuição significativa dependente da concentração quando comparada ao CN ($p < 0,05$), os menores valores das mensurações radiculares foram de $5,93 \pm 0,15$ mm em 24 h, e $4,68 \pm 0,17$ mm em 48 h na maior concentração ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O sulfato de cobre reduziu significativamente ($p < 0,05$) o comprimento radicular em relação aos grupos tratados com [6]-G, os quais, por outro lado, apontam retardo no crescimento das raízes pelo aumento da concentração, sugerindo um efeito tóxico nesse sistema teste. O tratamento dos bulbos de *A. cepa* com [6]-G implicou ainda em redução significativa do número médio de raízes nas concentrações mais altas (20; $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) no tempo de 24 h, quando relacionadas ao CN no mesmo período de exposição. O CP reduziu significativamente o número médio de raízes em relação aos grupos tratados com [6]-G, em ambos os tempos (24 / 48 h), exceto na maior concentração $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no período de 48 h não apresentou diferença significativa quando relacionada ao CP em igual período de tempo, indicando elevada inibição do número das raízes (**Figura 4**).

Figura 4 - (A) Número médio de raízes *A. cepa* L em 24 e 48 h. **(B)** Comprimento médio (mm) de raízes *A. cepa* L em 24 e 48 h. Os valores são médias \pm erro padrão (SEM) ($n = 5$, cebola/concentração); $p < 0,05$ significativamente diferente entre as concentrações e controles no mesmo período de tempo, quando comparado ao ^aCN; ^bCP (CuSO_4); ^c $5\mu\text{g.mL}^{-1}$; ^d $10\mu\text{g.mL}^{-1}$; ^e $20\mu\text{g.mL}^{-1}$; ^f $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ com exposição de 24 h e 48 h. ANOVA seguido de one way, post test Tukey (múltiplas comparações).



3.5 Efeitos citotóxicos do [6]-G em *A. cepa*

A exposição da região meristemática de *A. cepa* ao [6]-G aumentou o número de células na fase da intérfase, levando a uma redução no índice de fase durante a divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), e assim, limitando a frequência do índice mitótico (IM) em todos os grupos testados ($5, 10, 20, 40\mu\text{g.mL}^{-1}$), verificou-se diminuição significativa do IM de forma dependente da concentração quando comparada ao CN ($p < 0,05$), sobretudo nas maiores concentrações (20 e $40\mu\text{g.mL}^{-1}$). No entanto, o CP apresentou mais efeitos citotóxicos do que o [6]-G, ao evidenciar redução significativa em ambos os tempos de tratamento (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Perfil do índice (%) de fases (IF) e mitótico (IM) de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* (n=5) expostas ao [6]-G após o período de 24 - 48h.

Tratamentos	IF (%)					IM (%)	
	24h	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase		Telófase
CN		44,20±0,6	44,32±0,47	5,18±0,32	3,48±0,22	2,82±0,16	55,80±1,36
CP (CuSO ₄)		83,58±0,69 ^a	9,30 ±0,96 ^a	3,32 ±0,31 ^a	2,30±0,15 ^a	1,50±0,10 ^a	16,42±0,69 ^a
[6]-G							
5 µg.mL ⁻¹		49,44±1,07 ^{ab}	40,02±1,27 ^{ab}	4,52±0,31	3,50±0,30	2,40±0,12	50,44±0,69 ^{ab}
10 µg.mL ⁻¹		52,34±1,33 ^{abc}	38,60±0,65 ^{ab}	3,92±0,27	2,94±0,34	1,94±0,11	47,40±0,98 ^{ab}
20 µg.mL ⁻¹		56,92±1,22 ^{abcd}	35,42±1,04 ^{abcd}	3,48±0,35	2,32±0,27	1,86±0,23	43,08±1,22 ^{abcd}
40 µg.mL ⁻¹		60,32±3,89 ^{abcde}	32,66±3,87 ^{abcde}	3,26±0,31 ^b	2,14±0,20	1,62 ±0,16	39,68±3,9 ^{abcd}
48h							
CN		40,34±0,76	47,36±0,46	5,34±0,42	3,78±0,21	3,18±0,21	59,66±1,70
CP (CuSO ₄)		87,68±0,70 ^a	6,26 ±0,65 ^a	2,90 ±0,24 ^a	1,88±0,14 ^a	1,36±0,10 ^a	12,40±1,47 ^a
[6]-G							
5 µg.mL ⁻¹		50,98±1,12 ^{ab}	39,76±1,35 ^{ab}	4,02±0,16	3,08±0,13	2,16±0,11	49,02±1,12 ^{ab}
10 µg.mL ⁻¹		53,94±0,90 ^{abc}	37,64±0,76 ^{ab}	3,78±0,19	2,74±0,28	1,90±0,14	46,26±0,82 ^{ab}
20 µg.mL ⁻¹		58,04±0,84 ^{abcd}	34,76±0,77 ^{abcd}	3,32±0,47	2,14±0,23	1,74±0,11	41,96±0,84 ^{abcd}
40 µg.mL ⁻¹		61,86±4,27 ^{abcde}	32,06±4,24 ^{abcde}	2,72±0,37 ^b	1,86±0,19	1,50±0,15	38,14±4,27 ^{abcd}

Os valores são médias ± erro padrão (SEM) calculados a partir da porcentagem do índice de fases $IF = Nf/Nt \times 100$ e mitótico $IM = Nm/Nt \times 100$ considerando (n= 5000 células/concentração); p < 0,05 significativamente diferente (na mesma mesma fase de divisão celular) , quando comparado ao ^aCN (Água desclorada); ^bCP (Sulfato de Cobre); ^c5µg.mL⁻¹; ^d10µg.mL⁻¹; ^e20µg.mL⁻¹; ^f40µg.mL⁻¹ no período de 24/48h de tratamento. ANOVA seguido de one way, post test Tukey (múltiplas comparações).

3.6 Mutagenicidade do [6]-G em *A. cepa* pela frequência de aberrações cromossômicas (AC) em mitose

A frequência de AC (**Tabela 2**) em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com [6]-G nas menores concentrações testadas revelou dados não significativos (p > 0,05) quando relacionadas ao CN. As AC (fragmentos cromossômicos, cromossomos soltos e atrasos anafásicos) aumentaram significativamente na concentração de 40 µg. mL⁻¹, em ambos períodos de tratamento, quando comparadas ao CN, sugerindo que a exposição acima de 40 µg.mL⁻¹ do [6]-G em células de *A. cepa* induz efeitos genotóxicos. A frequência de mutagenicidade não foi evidenciada em 5, 10 e 20 µg. mL⁻¹, entretanto, a concentração mais alta (40 µg.mL⁻¹) indicou efeito mutagênico.

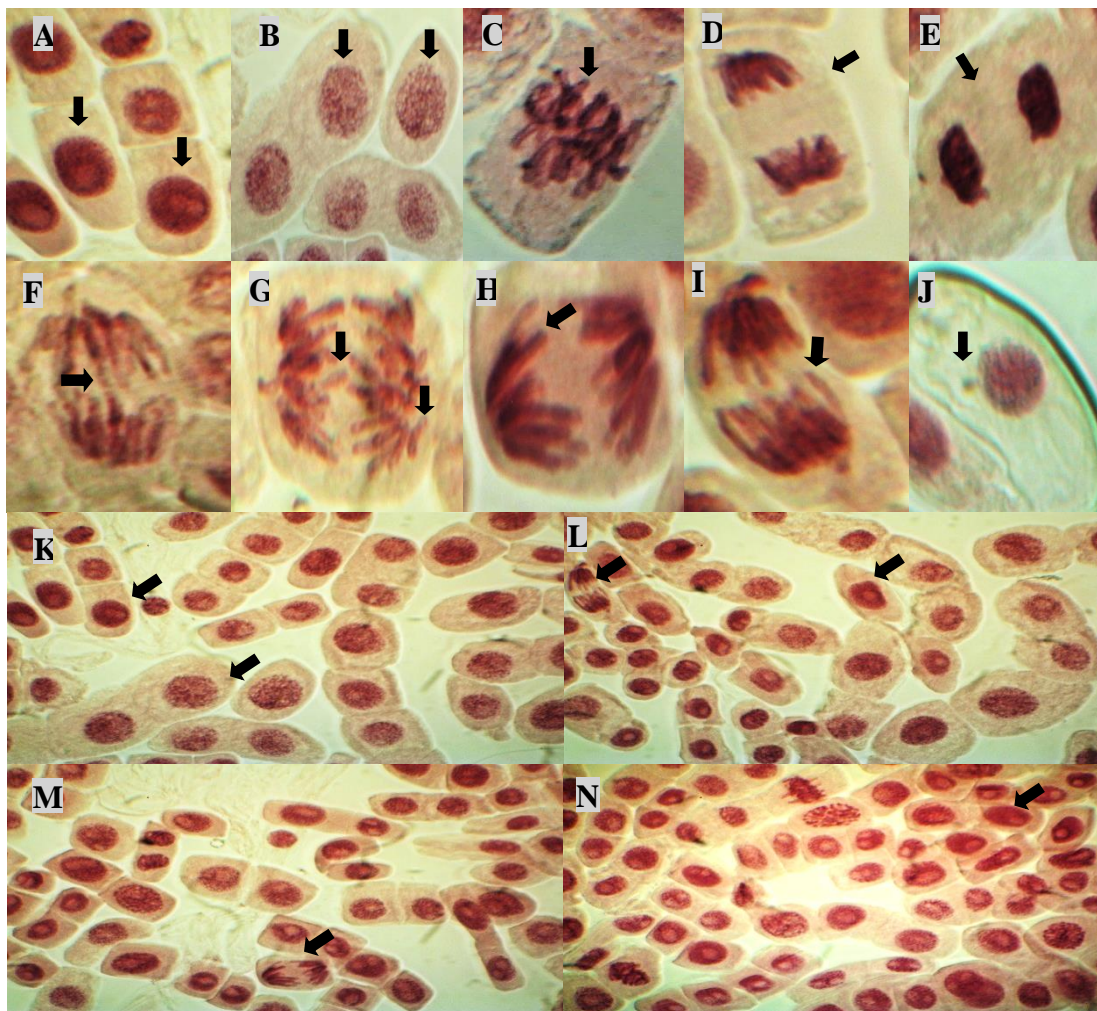
Tabela 2 - Aberrações cromossômicas (AC) em mitose e frequência de mutagenicidade (FM) em células meristemáticas em raízes de *Allium cepa* expostas a [6]-G, no período de 24-48 h.

Tratamentos	AC (%)				FM (%)	
	24h	Pontes anafásicas	Fragmentos cromossômicos	Cromossomos soltos		Atrasos anafásicos
CN		0,00±0,00	0,07±0,04	0,03±0,03	0,07±0,04	0,00±0,00
CP (CuSO ₄)		2,68±0,17 ^a	2,69±0,27 ^a	5,85±0,15 ^a	5,71±0,13 ^a	0,38±0,02 ^a
[6]-G						
5 µg.mL ⁻¹		0,00±0,00 ^b	0,08±0,04 ^b	0,04±0,04 ^b	0,15±0,07 ^b	0,00±0,00 ^b
10 µg.mL ⁻¹		0,00±0,00 ^b	0,08±0,05 ^b	0,08±0,05 ^b	0,33±0,05 ^b	0,00±0,00 ^b
20 µg.mL ⁻¹		0,04±0,04 ^b	0,36±0,05 ^b	0,27±0,08 ^b	0,46±0,07 ^{ab}	0,00±0,00 ^b
40 µg.mL ⁻¹		0,20±0,05 ^b	0,51±0,12 ^{abcd}	0,40±0,06 ^{abc}	1,46±0,06 ^{abcd}	0,10±0,04 ^a
48h						
CN		0,00±0,00	0,66±0,40	0,03±0,03	0,10±0,04	0,00±0,00
CP (CuSO ₄)		4,04±0,19 ^a	3,94±0,45 ^a	8,32±0,56 ^a	8,13±0,42 ^a	0,82±0,04 ^a
[6]-G						
5 µg.mL ⁻¹		0,00±0,00 ^b	0,20±0,06 ^b	0,12±0,05 ^b	0,24±0,04 ^b	0,00±0,00 ^b
10 µg.mL ⁻¹		0,00±0,00 ^b	0,34±0,11 ^b	0,17±0,04 ^b	0,47±0,04 ^b	0,00±0,00 ^b
20 µg.mL ⁻¹		0,04±0,04 ^b	0,57±0,06 ^b	0,28±0,08 ^b	0,57±0,05 ^b	0,00±0,00 ^b
40 µg.mL ⁻¹		0,31±0,03 ^b	1,47±0,05 ^{abcde}	0,84±0,03 ^{ab}	1,68±0,09 ^{abcde}	0,29±0,03 ^a

Os valores são médias ± erro padrão (SEM) calculados a partir da frequência de aberrações cromossômicas em mitose $AC = Nac/Nm \times 100$ e mutagenicidade $FM = Nmi/Nt \times 100$ considerando (n= 5000 células/concentração); p < 0,05 significativamente diferente (entre concentrações testadas/mesma coluna) , quando comparado ao ^aCN (Água desclorada); ^bCP (Sulfato de Cobre); ^c5µg.mL⁻¹; ^d10µg.mL⁻¹; ^e20µg.mL⁻¹; ^f40µg.mL⁻¹ no período de 24/48h de tratamento. ANOVA seguido de one way, post test Tukey (múltiplas comparações).

O perfil fotomicrográfico expõe o esboço das células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com [6]-G, foram encontradas células no estágio de intérfase (A) e fases normais de divisão celular por mitose como prófase, metáfase, anáfase e telófase (B - E), além de apresentar diferentes aberrações cromossômicas (F - I), dentre as quais se destacam ponte cromossômica em anáfase, cromossomos soltos, fragmentos e atrasos cromossômicos, além da presença de micronúcleos (J), tais anormalidades são resultantes do tratamento com [6]-G, onde a exposição em concentrações crescentes, 5 - 40 µg.mL⁻¹ (J - M) evidenciou maior número de aberrações cromossômicas e células em intérfase nas concentrações mais elevadas, fatores atrelados a inibição do crescimento radicular, redução do índice mitótico e aumento da genotoxicidade (**Figura 5**).

Figura 5 - Perfil fotomicrográfico de células meristemáticas de *A. cepa*. Fases da divisão celular: Intérfase (A), prófase (B), metáfase (C), anáfase (D), telófase (E). Anormalidades cromossômicas: ponte cromossômica em anáfase (F), fragmentos cromossômicos (G), atrasos cromossômicos (H), cromossomos soltos (I) e micronúcleo (J). Tratamento [6]-G: 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (K); 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (L); 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (M); 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (N). Aumento de 40X.



4 DISCUSSÃO

No ensaio *A. salina*, a menor concentração testada do [6]-G (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) não exibiu efeito tóxico frente aos náuplios, entretanto, os efeitos da toxicidade foram observados nas concentrações acima de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Figura 2**), uma vez que houve redução significativa da sobrevivência dos náuplios quando expostos a crescentes concentrações do [6]-G. Cabe enfatizar, que os compostos bioativos são frequentemente tóxicos em altas concentrações, especialmente em relação ao material genético (TEDESCO et al., 2015). Estudos de letalidade em *A. salina* podem ser utilizados como bioensaio preliminar, rápido e simples para testar extratos de plantas e compostos orgânicos que, na maioria dos casos, correlacionam-se

razoavelmente bem com as propriedades citotóxicas e antitumorais (MCLAUGHLIN; ROGERS; ANDERSON, 1998; NUNES et al., 2006; ÖZÇELIK; KARTAL; ORHAN, 2011).

A toxicidade observada no estudo pode ser associada a mecanismos oxidativos, estudos apontam que o potencial terapêutico do [6]-G pode ser atribuído à sua estrutura química (GHASEMZADEH; JAAFAR; RAHMAT, 2015), pois na medida em que os gingeróis e seus derivados neutralizam radicais livres, tornam-se metabolicamente instáveis e facilmente oxidados em radicais fenoxi, quinonas metiladas ou quinonas (GAN et al., 2013 ; MASON; THOMPSON, 2014). As quinonas são frequentemente formadas a partir de precursores fenólicos (BOLTON et al., 2000) e participam de ciclos redox enzimáticos e/ou não-enzimáticos (SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016), podendo gerar EROs, causar danos celulares e induzir a apoptose, características de importância para agentes antitumorais (BOLTON et al., 2000; VALDERRAMA et al., 2008).

Os efeitos citotóxicos de inúmeros compostos naturais, assim como o limiar de sobrevivência celular em linhagens tumorais e normais podem ser avaliados pelo método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio), o qual é baseado na capacidade da enzima desidrogenase, presente nas células metabolicamente ativas, clivar os anéis tetrazólio do MTT e formar cristais formazan de cor violeta, insolúveis em soluções aquosas (BUCH et al., 2012). Conseqüentemente, o número de células metabolicamente ativas é proporcional à quantidade de cristais de formazan produzidos (MOSMANN, 1983). O [6]-G tem potencial antitumoral, foi observada citotoxicidade do composto pelo método MTT, apontando interferência significativa na viabilidade de células normais (PBMC) e tumorais (S-180/HL-60) (**Figura 3**) quando relacionadas aos grupos não tratados.

Esses resultados corroboram com outras pesquisas. Estudos *in vitro* relatam que o emprego de diferentes concentrações de [6]-G no tratamento de células tumorais apontaram respostas promissoras na indução apoptótica e redução da viabilidade em linhagens de carcinoma cervical HeLa (25 - 175 µg/mL), cólon LoVo (5 - 15 µg/mL), pâncreas PANC 1 (5 - 20 µM), glioblastoma U87 (10 - 100 µM) e leucemia K562, U937 (10 - 200 µM) (CHAKRABORTY et al., 2012; LIN; LIN; TSAY, 2012; KIM; KIM, 2013; LEE et al., 2014; RASTOGI et al., 2014; RADHAKRISHNAN et al., 2014).

É importante relatar, que no estudo, o [6]-G apresentou menos impacto na redução da viabilidade de células normais (PBMC), de forma contrária ao observado para a DOX que é um potente antibiótico de antraciclina e amplamente utilizado para o tratamento de tumores, entretanto, está relacionada na indução de toxicidade em tecidos saudáveis (SIMUNEK et al., 2009), como observado no estudo, devido as consideráveis implicações citotóxicas nos grupos

tratados com a droga convencional doxorrubicina (Dox) nas concentrações de 0,3 e 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para PBMC e S-180/HL-60, respectivamente. O S-180 é uma neoplasia pouco diferenciada, sendo uma das células tumorais mais utilizadas para investigações relacionadas com atividade anticancerígena *in vivo*, *in vitro* e *ex-vivo* (LIMA et al, 2014; XIE et al, 2014; FERREIRA et al, 2015). Modelos com sarcoma são fundamentais para o entendimento da biologia molecular do câncer, uma vez que os sarcomas são distinguidos por aberrações moleculares como mutações, deleção intergenes, ampliações de genes e translocações (QUESADA; AMATON, 2012).

Os efeitos tóxicos do [6]-G também foram avaliados em raízes de *A. cepa*, teste indicado para avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de vários compostos químicos e naturais (RANK et al., 2002). Sua toxicidade foi observada pelo parâmetro macroscópico (número e crescimento radicular) de forma dependente da concentração, em ambos os períodos de tempo (24/48 h) (**Figura 4**). O atraso no crescimento das raízes, bem como a inibição do crescimento radicular e o aparecimento de raízes murchas representam uma resposta à ação de agentes citotóxicos (ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017). A inibição do crescimento das raízes geralmente se relaciona com a atividade meristemática apical (WEBSTER; MACLEOD, 1996), inibição da síntese protéica (SETH et al., 2007) e alongamento celular durante a diferenciação (FUSCONI et al., 2006). O efeito fitotóxico observado na germinação e alongamento da radícula aponta relevante sensibilidade e se complementam no que se refere aos efeitos biológicos em organismos vegetais (YOUNG et al. 2012; ADEYEMO; FARINMADE, 2013).

A análise do ciclo celular permite determinar a atividade citotóxica de compostos pela frequência da divisão celular (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009). O [6]-G também induziu citotoxicidade em *A. cepa* pela observação microscópica do aumento do número de células na fase da intérfase, levando a uma redução no índice de fase durante a divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), (**Tabela 1**) e assim, limitando a frequência do índice mitótico (IM). Em todos os grupos testados (5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), verificou-se diminuição significativa do IM de forma dependente da concentração quando comparada ao CN, sobretudo nas maiores concentrações (20 e 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A citotoxicidade do [6]-G foi observada em linhagens tumorais de cólon humano (LoVo), observaram redução significativa da viabilidade celular de forma dependente da dose (LIN; LIN; TSAY, 2012).

A redução do IM pode ser devido ao aprisionamento de uma ou mais fases mitóticas ou abrandamento da taxa de progressão celular (YUET-PING et al., 2012), os dados indicam que grupos tratados com [6]-G apresentaram um acúmulo de células em divisão na prófase, que

pode ser uma indicação de bloqueio no processo final da prófase. Uma redução de 50% no IM quando comparado com NC é um valor limitante, este é o chamado valor limite citotóxico (SHARMA, 1983), a redução <50% induz a um efeito subletal e <22% causa um efeito letal (MESI; KOPLIKU, 2013). A exposição ao [6]-G demonstrou efeito subletal nas concentrações entre 10 a 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no período de 24 h, esta mesma resposta foi obtida em 48 h, sendo que todas as concentrações de [6]-G testadas implicaram subletalidade. A redução da atividade mitótica pode ser devido à inibição da síntese do DNA ou ao bloqueio na fase G2 do ciclo celular, evitando que a célula entre na mitose (SUDHAKAR; NINGE; VENU, 2001). Também pode ser devido à síntese de nucleoproteínas prejudicada e ao nível reduzido de ATP para fornecer energia para o alongamento do fuso, a dinâmica dos microtúbulos e o movimento cromossômico (MAJEWSKA et al., 2003).

Além do efeito mitodepressivo, o tratamento apresentou uma série de anormalidades cromossômicas durante o estágio da mitose, sendo registrado aumento gradual das anormalidades cromossômicas (AC) associadas ao aumento das concentrações (**Tabela 2**), o principal efeito genotóxico do [6]-G foi encontrado no estágio de anáfase-telófase, sendo que as anormalidades mais comuns encontradas foram atrasos anafásicos > fragmentos cromossômicos > cromossomos soltos > pontes anafásicas, tais AC aumentaram significativamente na concentração de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em ambos períodos de tratamento, quando comparadas ao CN, sugerindo indução de genotoxicidade nas células meristemáticas expostas a concentrações acima de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do [6]-G.

As aberrações cromossômicas podem ocorrer por alterações na estrutura cromossômica ou no número de cromossomos, de forma natural ou como consequência da exposição a agentes físicos ou químicos (HOUK, 1992). As pontes e quebras cromossômicas observadas pela exposição do [6]-G, podem ser, de acordo com MARCANO et al. (2004) resultante da aderência cromossômica, esta aderência determina pontes cromossômicas, uma vez que tendem a permanecer unidos e, se separados, causam quebras cromossômicas. A ocorrência de lesão nuclear pode ser devido à ação inibidora de fitoquímicos na biossíntese do DNA (AKANEME; AMAEFULE, 2012). O atraso cromossômico também observado em grupos tratados com [6]-G decorre de atividade anormal do fuso, falhas na organização e podem levar à formação de cromossomos retardatários (LERA; BURKARD, 2012; NEELAMKAVIL; THOPPIL, 2014).

O [6]-G também apresentou mutagenicidade pelo aumento da frequência de micronúcleos evidenciada em 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O efeito mutagênico pode ser observado por danos ao DNA quando a molécula está exposta a agentes mutagênicos, resultando em uma fragmentação cromossômica acêntrica (origem clastogênica) ou perda de cromossomos inteiros

(aneugênica) que quando não reparados, o dano poderá ser fixo e expresso em micronúcleo (MN) após um ciclo de divisão celular (FENECH et al., 1999; FENECH, 2000; RIBEIRO, 2003; SOUZA et al., 2013). Em pesquisa realizada por CHAKRABORTY et al. (2012), alterações morfológicas foram detectadas em células HeLa (carcinoma cervical humano) expostas ao [6]-G, incluindo morfologia nuclear alterada, condensação da cromatina e fragmentação de células HeLa, que tornaram-se mais evidentes com o aumento da concentração de [6]-G durante o tratamento.

Além dos eventos citogenéticos induzidos pelo [6]-G, também existem relatos de uma série de alvos moleculares em vários estudos experimentais (*in vitro/in vivo*), incluindo a redução de danos oxidativos em estruturas celulares (MDA, EROs, ONOO⁻, NO₂/NO₃), indução de enzimas antioxidantes (SOD, GSH, GSHP, CAT, GPx), inibição de citocinas pró-inflamatórias e mediadores (TNF α , IL-1 β , IL6, IL8, SAA1, NO, iNOS, COX1/2), indução de atividade pró-apoptótica em células tumorais (aumento e reativação de p53, ativação de caspases -3, 7, 8, 9, liberação de citocromo c, aumento da razão Bax:Bcl2, Bid, Noxa, p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, miR27b, EROs, DR5, clivagem PARP 1), regulação do ciclo celular (interrupção do ciclo G0/G1, S-G2/M), redução de ciclinas (A, B1, CDK1, Cdc25B e Cdc25C), supressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e diminuição da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) (KARNA et al., 2012; LI et al., 2013; JIANG et al., 2013; RASTOGI et al., 2015; DONGARE et al., 2016; LI et al., 2017; VIPIN et al., 2017; DANWILAI et al., 2017).

O gingerol, assim como seus derivados, demonstram atividade antitumoral frente a diversas linhagens cancerígenas, em pesquisa realizada por LUNA-DULCEY et al. (2018), o análogo semi-sintético SSi6, gerado após modificação química da molécula de [6]-G, elevou os efeitos citotóxicos seletivos em células MDA-MB-231 (câncer de mama), ao contrário da molécula original de [6]-G, o SSi6 permitiu a autofagia seguida por apoptose independente de caspase, a indução de EROs por SSi6 desempenha um papel fundamental na promoção de autofagia e apoptose, modificações estruturais de compostos naturais podem ser uma estratégia interessante para o desenvolvimento de drogas antitumorais.

Ao explorar a contribuição da polarização de macrófagos e efeitos anticancerígenos associados a [6]-G em modelo *in vivo* de carcinoma pulmonar induzido por uretano, verificou-se que o tratamento com [6]-G suprimiu seletivamente os macrófagos M2, e elevou a porcentagem de macrófagos M1, além de uma redução no número e tamanho de linfonodos no pulmão. O [6]-G demonstrou reconfigurar macrófagos M2 em M1 devido à redução da arginase-1, evitando a polarização para o fenótipo M2, as células M1 exibiram níveis reduzidos

de arginase-1 e EROs, além de níveis elevados de L-arginina e óxido nítrico (NO) (YAO et al., 2018).

LEE et al., 2011, ao avaliarem o efeito do [6]-G em linhagem humana de neuroblasto (SHSY5Y) exposta ao peptídeo β -amiloide ($A\beta_{25-35}$), um marcador neuropatológico para doença de *Alzheimer*, evidenciaram que o pré-tratamento com [6]-G (10 μ M) reduziu significativamente a citotoxicidade induzida por $A\beta_{25-35}$, redução dos níveis de malondialdeído (MDA) e EROs, apontando supressão dos danos induzidos pelo excesso de $A\beta_{25-35}$. Em pesquisa realizada por HOSSEINI; SHAFIEE-NICK; MOUSAVI (2014), o extrato de gengibre apresentou efeitos protetores contra a toxicidade induzida pela Dox em cardiomiócitos (H9c2), sendo possível verificar redução do nível de peroxidação lipídica, EROs e supressão apoptótica em H9c2 induzida pela Dox.

Os metabólitos secundários das plantas, principalmente na forma de compostos fenólicos e nitrogenados têm demonstrado exibir atividades antioxidantes e antitumorais (MADHURI; PANDEY, 2009). Existem relatos de que o [6]-G pode gerar EROs em linhagens tumorais linhagens de leucemia mieloide crônica (K562) e aguda (U937), levando a interrupção do ciclo celular G2/M, além da diminuição da expressão das proteínas (ciclina B1, Cdk1, Cdc25B e Cdc25C), pois altera o status oxidante celular, induzindo a geração de EROs mitocondrial (RASTOGI et al., 2014).

Em circunstâncias normais, o excesso de EROs pode ser eliminado pelos sistemas de defesa antioxidante celular (HERRERO et al., 2008), entretanto, o H_2O_2 , quando em excesso, pode modificar bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA, alterações de outras biomoléculas (BARREIROS; DAVID, 2006; BLOKHINA et al., 2003), além de atravessar facilmente as membranas celulares (HALLIWELL, 2006). As enzimas Sod Δ e Ctt Δ são essenciais para a neutralização de EROs e manutenção das células isentas de danos mediados pelo estresse oxidativo (ISLAM et al., 2016). As Sods Δ catalizam o anião superóxido O_2^- em H_2O_2 , o qual pode ser convertido em água (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015), sendo a catalase uma enzima importante na proteção celular, envolvida na catálise da reação de decomposição do H_2O_2 (HALLIWELL, 2006).

Os estudos não clínicos usados, nas condições experimentais desenvolvidas permitiram observar efeitos antitumorais para o [6]-G nos sistemas testes e concentrações utilizadas, possivelmente, associados a mecanismos citogenéticos indicativos de apoptoses, que podem ser relacionados ao estresse oxidativo.

5 CONCLUSÃO

O [6]-G induziu toxicidade e citotoxicidade em *A. salina* e *A. cepa* em concentrações >10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A sua citotoxicidade também foi apontada em células do líquido ascítico e linhagem HL-60 (leucemia promielocítica aguda), bem como em células mononucleadas de sangue periférico (células normais), apresentando seletividade para células tumorais. A genotoxicidade do composto foi observada em *A. cepa*, especialmente em 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pela formação de micronúcleos, pontes, cromossomos soltos e em atrasos. Os dados indicam que os mecanismos citogenéticos podem estar relacionados com a ação antitumoral do [6]-G, como resultante de prováveis efeitos oxidativos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Declaração ética

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Brasil, com número de protocolo: 167/16 (**Anexo E**).

Agradecimentos

Agradecemos à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) e Universidade Federal do Piauí (UFPI), por fornecerem as instalações para realização do estudo, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFPI) – CAPES/IFPI.

REFERÊNCIAS

- ADEBIYI, O. E.; OLAYEMI, F. O.; NING-HUA, T.; GUANG-ZHI, Z. In vitro antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 10-14, 2017.
- ADEYEMO, O. A.; FARINMADE, A. E. Genotoxic and cytotoxic effects of food flavor enhancer, monosodium glutamate (MSG) using *Allium cepa* assay. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 13, 2013.
- AKANEME, F. I.; AMAEFULE, C. C. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aqueous leaf extracts of *Azadirachta indica* A. Juss using the *Allium* test. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 22, p. 3898-3907, 2012.
- AKIMOTO, M.; LIZUKA, M.; KANEMATSU, R.; YOSHIDA, M.; TAKENAGA, K. Anticancer effect of ginger extract against pancreatic cancer cells mainly through reactive oxygen species-mediated autotic cell death. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126605, 2015.
- ANACLETO, L. R.; ROBERTO, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Efeitos toxicológicos dos resíduos da indústria sucroalcooleira, utilizados como fertilizante agrícola, no sistema de testes *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 173, p. 31-42, 2017.
- AUNG, T. N.; QU, Z.; KORTSCHAK, R. D.; ADELSON, D. L. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, p. 656, 2017.
- AZMI, A. S. Network pharmacology for cancer drug discovery: are we there yet? **Future medicinal chemistry**, v. 4, n. 8, p. 939-941, 2012.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29, 113-123, 2006.
- BAKARE, A. A.; MOSURO, A. A.; OSIBANJO, O. Effect of simulated leachate on chromosomes and mitosis in roots of *Allium cepa* (L.). **Journal of Environmental Biology**, v. 21, n. 3, p. 263-271, 2000.
- BERNARD, M. M.; MCCONNERY, J. R.; HOSKIN, D. W. [10]-Gingerol, a major phenolic constituent of ginger root, induces cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Experimental and molecular pathology**, v. 102, n. 2, p. 370-376, 2017.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, 91, 179-194, 2003.
- BOLTON, J. L.; TRUSH, M.A.; PENNING, T.M.; DRYHURST, G.; MONKS, T.J. Role of quinones in toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 13, n. 3, p. 135-160, 2000.

BORBOA, L.; DE LA TORRE, C. The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. **New Phytologist**, v. 134, n. 3, p. 481-486, 1996.

BOUYAHYA, A.; ABRINI, J.; BAKRI, Y.; DAKKA, N., Essential oils as anticancer agents: news on mode of action. **Phytothérapie**, p. 1-14, 2016

BUCH, K.; PETERS, T.; NAWROTH, T.; SÄNGER, M.; SCHMIDBERGER, H.; LANGGUTH, P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay-A comparative study. **Radiation oncology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2012.

CHAKRABORTY, D.; BISHAYEE, K.; GHOSH, S.; BISWAS, R.; MANDAL, S. K.; KHUDA-BUKHSH, A. R. [6]-Gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in cancer cells: Drug-DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells. **European journal of pharmacology**, v.694, n.1, p.20-29, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; YANG, S. S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **Journal of natural products**, v. 69, n. 3, p. 488-498, 2006.

DANWILAI, K.; KONMUN, J.; SRIPANIDKULCHAI, B.; SUBONGKOT, S. Antioxidant activity of ginger extract as a daily supplement in cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a pilot study. **Cancer management and research**, v. 9, p. 11, 2017.

DONGARE, S.; GUPTA, S. K.; MATHUR, R.; SAXENA, R.; MATHUR S.; AGARWAL, R.; NAG T. C.; SRIVASTAVA S.; KUMAR, P. Zingiber officinale attenuates retinal microvascular changes in diabetic rats via anti-inflammatory and antiangiogenic mechanisms. **Molecular vision**, v. 22, p. 599, 2016.

EL-MEGHAWRY; EL-RAHMAN, H.; ABDELKARIM, G.; NAJDA, A. Natural products against cancer angiogenesis. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, p. 14513-14536, 2016.

EL-NAGGAR, M. H.; MIRA, A.; BAR, F. M. A.; SHIMIZU, K.; AMER, M. M.; BADRIA, F. A. (2017). Synthesis, docking, cytotoxicity, and LTA 4 H inhibitory activity of new gingerol derivatives as potential colorectal cancer therapy. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 3, p. 1277-1285, 2017.

FAN J, Z.; YANG, X.; BI, Z. G. The effects of 6-gingerol on proliferation, differentiation, and maturation of osteoblast-like MG-63 cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 7, p. 637-643, 2015.

FANG, J.; SEKI, T.; MAEDA, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 4, p. 290-302, 2009.

FISHER, L.; IANIRO, T.; LAU, F.; WANG, H; DAGGY, B. Synergistic effects of phenolic mixtures in human cell models of aging. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 29, n. 1, supplement, p. 608.36, 2015.

FISKESJO, G. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. **Plants for environmental studies**, v. 11, p. 307-333, 1997.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 605-612, 1999.

FERREIRA, P. M.; COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. D.; MOREIRA, D. R.; OLIVEIRA FILHO, G. B.; FERREIRA, J. M.; QUEIROZ, M. G.; LEITE, A. C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 3, p. 1-18, 2015.

FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, n. 1-3, p. 253-260, 2006.

GAN, F. F.; LING, H.; ANG X.; REDDY, S. A.; LEE, S.S.; YANG, H.; TAN, S.H.; HAYES, J.D.; CHUI, W.K.; CHEW, E.H. A novel shogaol analog suppresses cancer cell invasion and inflammation, and displays cytoprotective effects through modulation of NF- κ B and Nrf2-Keap1 signaling pathways. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 272, n. 3, p. 852-862, 2013.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. E.; RAHMAT, A. Optimization protocol for the extraction of 6-gingerol and 6-shogaol from *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and improving antioxidant and anticancer activity using response surface methodology. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 258, 2015.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 476, n. 2, p. 107-112, 2008.

HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. Controle redox e estresse oxidativo em células de levedura. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Assuntos Gerais**, v. 1780, n. 11, p. 1217-1235, 2008.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 277, n. 2, p. 91-138, 1992.

HOWES, M. J. R.; SIMMONDS, M. S. J. The role of phytochemicals as micronutrients in health and disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 17, n. 6, p. 558-566, 2014.

IMPHENG, H.; RICHERT, L.; PEKTHONG, D.; SCHOLFIELD, C. N.; PONGCHAROEN, S.; PUNGPETCHARA, I.; SRISAWANG, P. [6]-Gingerol inhibits de novo fatty acid synthesis and carnitine palmitoyltransferase-1 activity which triggers apoptosis in HepG2. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 4, p. 1319, 2015.

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.; 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**, 9, 1-15, 2016.

JIANG, Y.; TURGEON, D. K.; WRIGHT, B. D.; SIDAHMED, E.; RUFFIN, M. T.; BRENNER, D. E.; ZICK, S. M. Effect of ginger root on cyclooxygenase-1 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in colonic mucosa of humans at normal and increased risk of colorectal cancer. **European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, v. 22, n. 5, p. 455, 2013.

KARNA, P.; CHAGANI, S.; GUNDALA, S. R.; RIDA, P. C.; ASIF, G.; SHARMA, V.; ANEJA, R. Benefits of whole ginger extract in prostate cancer. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 4, p. 473-484, 2012.

KHAN, H. Medicinal plants in light of history: recognized therapeutic modality. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**, v. 19, n. 3, p. 216-219, 2014.

KIM, S. O.; KIM, M. R. [6]-gingerol prevents disassembly of cell junctions and activities of MMPs in invasive human pancreas cancer cells through ERK/NF- κ B/snail signal transduction pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier Brasil, 2015.

LEE, C.; PARK, G. H.; KIM, C. Y.; JANG, J. H. [6]-Gingerol attenuates β -amyloid-induced oxidative cell death via fortifying cellular antioxidant defense system. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1261-1269, 2011.

LEE, D-H.; KIMB, D-W.; JUNG, C-H.; LEEA, Y. J.; PARK, D. Gingerol sensitizes TRAIL-induced apoptotic cell death of glioblastoma cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 279, n. 3, p. 253-265, 2014.

LERA, R. F.; BURKARD, M. E. The final link: tapping the power of chemical genetics to connect the molecular and biologic functions of mitotic protein kinases. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12172-12186, 2012.

LI, H. X.; MCGRATH, K. C. Y.; VAN, H.; TRAN, V. H.; LI, Y. M.; DUKE, C. C.; HEATHER, A. K. Attenuation of Proinflammatory Responses by S-[6]-Gingerol via Inhibition of ROS/NF-Kappa B/COX2 Activation in HuH7 Cells. **Evidence-Based**

Complementary and Alternative Medicine, v. 2013, p.8, 2013.

LI, Y.; XU, B.; XU, M.; CHEN, D.; XIONG, Y.; LIAN, M.; SUN, Y.; TANG, Z.; WANG, L.; JIANG, C.; LIN, Y. 6-Gingerol protects intestinal barrier from ischemia/reperfusion-induced damage via inhibition of p38 MAPK to NF- κ B signalling. **Pharmacological research**, v. 119, p. 137-148, 2017.

LIN, C. B.; LIN, C. C.; TSAY, G. J. 6-Gingerol inhibits growth of colon cancer cell LoVo via induction of G2/M arrest. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; ALMEIDA, M. A. P.; MELLO, F. M. S.; PIRES, W. C.; PINTO, T. M.; DELELA, F. K.; FELISBINO, S. L.; MORENO, V.; BATISTA, A. Z.; 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, 0. 105-125, 2014.

LIM, T. K. Zingiber officinale. In: **Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants**. Springer, Cham, p. 469-560, 2016.

LUNA-DULCEY, L.; TOMASIN, R.; NAVES, M. A.; DA SILVA, J. A.; COMINETTI, M. R. Autophagy-dependent apoptosis is triggered by a semi-synthetic [6]-gingerol analogue in triple negative breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 9, n. 56, p. 30787, 2018.

VASCONCELLOS, M. C.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; MACHADO, M. S.; GUECHEVA T. N.; VILLELA, I.; IMMICH, B. F.; MONTENEGRO, R. C.; FONSECA, A. M.; LEMOS, T. L. G.; MORAES, M. E. A.; SAFFI, J.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; HENRIQUES, J. A. P. Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1, 4 o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 10, p. 799-810, 2010.

M'HAMED, A. A. T.; BOUYAHYA, A.; BOURY, H. E.; AMZAZI, S.; BENJOUAD, A.; DAKKA, N.; BAKRI, Y. In vitro cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 16, p. 1-13, 2016.

MADHURI, S.; PANDEY, G. Some anticancer medicinal plants of foreign origin. **Current science**, p. 779-783, 2009.

MAJEWSKA, A. E.; WOLSKA, E.; SLIWINSKA, M.; FURMANOWA, N.; URBANSKA, A.; PIETROSIUK, A.; ZOBEL A, KURAS M. Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from *Rhodiola rosea* roots. **Caryologia**, v. 56, n. 3, p. 337-351, 2003.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, n. 2, p. 221-226, 2004.

MASON, J. K.; THOMPSON, L. U. Flaxseed and its lignan and oil components: can they play a role in reducing the risk of and improving the treatment of breast cancer? **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 6, p. 663-678, 2013.

MCLAUGHLIN J.L.; ROGERS L.L.; ANDERSON J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug information journal**, v. 32, n. 2, p. 513-524, 1998.

MESI, A.; KOPLIKU, D. Cytotoxic and genotoxic potency screening of two pesticides on *Allium cepa* L. **Procedia Technology**, v. 8, p. 19-26, 2013.

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, n. 5, p. 31-34, 1982.

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.

NEELAMKAVIL, S. V.; THOPPIL, John Ernest. Toxicological evaluation of polar and nonpolar components of *Isodon coetsa* (Lamiaceae). **Turkish Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 252-257, 2014.

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. 453-462, 2006.

ÖZÇELİK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 4, p. 396-402, 2011.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-523, 2011.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.

QUESADA, J.; AMATO, R. The molecular biology of soft-tissue sarcomas and current trends in therapy. **Sarcoma**, v. 12, p. 849-856, 2012.

RADHAKRISHNAN, E.; BAVA S.V.; NARAYANAN S. S.; NATH L. R.; THULASIDASAN A. K. T.; SONIYA E.V. [6]-Gingerol induces caspase-dependent apoptosis and prevents PMA-induced proliferation in colon cancer cells by inhibiting MAPK/AP-1 signaling. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104401, 2014.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1439-1452, 2006.

RAHMAN, M. A.; AKHTAR, J. Evaluation of anticancer activity of *Cordia dichotoma* leaves against a human prostate carcinoma cell line, PC3. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 7, n. 3, p. 315-321, 2017.

RANK, J., LOPEZ, L. C.; NIELSEN, M. H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v. 136, n. 1, p. 13-18, 2002.

RASTOGI, N.; DUGGAL, S.; SINGH, S. K.; PORWAL, K.; SRIVASTAVA, V. K.; MAURYA, R.; BHATT, M. L. B.; MISHRA, D. P. Proteasome inhibition mediates p53 reactivation and anti-cancer activity of 6-Gingerol in cervical cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43310, 2015.

RASTOGI, N.; GARA, R. K.; TRIVEDI, R.; SINGH, A.; DIXIT, P.; MAURYA, R.; MISHRA, D. P. (6)-Gingerol-induced myeloid leukemia cell death is initiated by reactive oxygen species and activation of miR-27b expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 288-301, 2014.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. **Mutagênese Ambiental**. ULBRA, Canoas, p. 173-178, 2003.

SAMAD, M. B.; MOHSIN, N. A. B.; RAZU, B. A.; HOSSAIN, M. T.; MAHZABEEN, S.; UNNOOR, N.; MUNA, I. A.; AKHTER, F.; KABIR, A. U. L.; HANNAN, J. M. A. [6]-Gingerol, from *Zingiber officinale*, potentiates GLP-1 mediated glucose-stimulated insulin secretion pathway in pancreatic β -cells and increases RAB8/RAB10-regulated membrane presentation of GLUT4 transporters in skeletal muscle to improve hyperglycemia in *Lepr db/db* type 2 diabetic mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 395, 2017.

SEMWAL R.B.; SEMWAL D.K.; COMBRINCK S.; VILJOEN A.M. Gingerols and shogaols: important nutraceutical principles from ginger. **Phytochemistry**, v. 117, p. 554-568, 2015.

SETH, C. S.; CHATURVEDI, P. K.; MISRA, V.. Toxic effect of arsenate and cadmium alone and in combination on giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in response to its accumulation. *Environmental Toxicology: An International Journal*, v. 22, n. 6, p. 539-549, 2007.

SHAO, X. PARKS, LV, L., WOU, T. H., HO, C.T., SANG, S. Quantitative analysis of ginger components in commercial products using liquid chromatography with electrochemical array detection. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12608-12614, 2010.

SHARMA, C. B. S. R. Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. **Current science**, p. 1000-1002, 1983.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

SOUZA, T. S.; HENCKLEIN, F. A.; DE ANGELIS, D. D. F.; FONTANETTI, C. S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 2, p. 1627-1636, 2013.

SUDHAKAR, R.; NINGE, G. K. N.; VENU, G. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 66, n. 3, p. 235-239, 2001.

SIMUNEK, T.; STERBA, M.; POPELOVÁ, O.; ADAMCOVÁ, M.; HRDINA, R.; GERSL, V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 1, p. 154-171, 2009.

TEDESCO, M.; KUHN, A. W.; BOLIGON, A. A.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; ATHAYDE, M. L.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Chromatographic analysis, antiproliferative effect and genotoxicity of aqueous extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck on the *Allium cepa* L. test system. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 4, 2015.

VALDERRAMA, J. A.; COLONELLI, P.; VÁSQUEZ, D.; GONZÁLEZ, M. F.; RODRIGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C. Studies on quinones. Part 44: Novel angucyclinone N-heterocyclic analogues endowed with antitumoral activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 24, p. 10172-10181, 2008.

VIPIN, A. V.; RAO, R.; KURREY, N. K.; KA, A. A.; VENKATESWARAN, G. Protective effects of phenolics rich extract of ginger against Aflatoxin B1-induced oxidative stress and hepatotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 415–424, 2017.

WEBSTER, P. L.; MACLEOD, R. D. The root apical meristems and its margins. **Plant roots. The hidden half. Marcel Dekker Inc, New York**, p. 51-76, 1996.

YAO, J.; DU, Z.; LI, Z.; ZHANG, S.; LIN, Y.; LI, H.; ZHOU, L.; WANG, Y.; YAN, G.; WU, X.; DUAN, Y.; DU, G. 6-Gingerol as an arginase inhibitor prevents urethane-induced lung carcinogenesis by reprogramming tumor supporting M2 macrophages to M1 phenotype. **Food & function**, 2018.

YORDI, E. G.; PÉREZ, E. M.; MATOS, M. J.; VILLARES, E. U. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. In: **Nutrition, well-being and health**. InTech, 2012.

YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P. A.; CRESCO, D. C.; RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012.

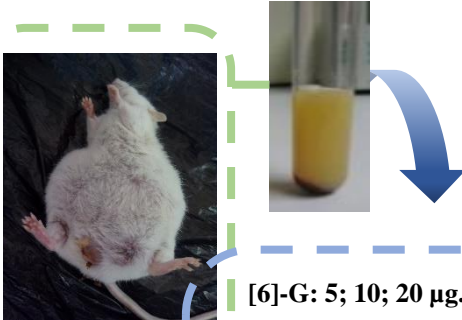
YUET, P. K. Y.; DARAH, I.; YUSUF, U. K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7782-7791, 2012.

XIE, Q. J.; CAO, X. L.; BAI, L.; WU, Z. R.; MA, Y. P.; LI, H. Y. Anti-tumor effects and apoptosis induction by Realgar bioleaching solution in Sarcoma-180 cells in vitro and transplanted tumors in mice *in vivo*. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 6, p. 2883-2898, 2014.

ZEIGER, E.; GOLLAPUDI, B.; AARDEMA, M. J.; AUERBACH, S.; BOVERHOF, D.; CUSTER, L.; DEDON, P.; HONMA, M.; ISHIDA, S.; KASINSKI, A. L.; KIM, J. H.; MANJANATHA, M. G.; MARLOWE, J.; PFUHLER, S.; POGRIBNY, I.; SLIKKER, W.; STANKOWSKI, L. F. J. R.; TANIR, J. Y.; TICE, R.; VAN, B. J.; WHITE, P.; WITT, K. L.; THYBAUD, V. Opportunities to integrate new approaches in genetic toxicology: An ILSI-HESI workshop report. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 56, n. 3, p. 277-285, 2015.

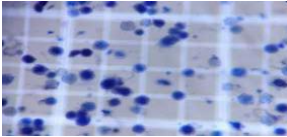
CAPÍTULO 3

S-180 ($0,5 \times 10^6$)



[6]-G: 5; 10; 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$


Azul de Tripán



- ✓ Redução Viabilidade
- ✓ Citotoxicidade

CL50 4,24


Ensaio Cometa



- ✓ Citotoxicidade
- ✓ Genotoxicidade

Ensaio Desafio

H_2O_2



Células Tumorais - S-180

[6]-G+ H_2O_2

5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

- ✓ Danos similares ao H_2O_2
- ✓ >10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
- ✓ Ampliação danos

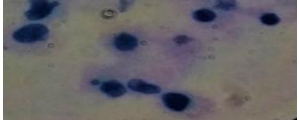
Células Normais - SP

[6]-G+ H_2O_2

< 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

- ✓ Modulação danos
- ✓ > 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
- ✓ Ampliação danos

CBMN

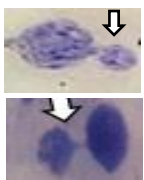


Danos citogenéticos S-180

- ⊘ Micronúcleos

Danos similares a Dox

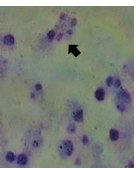
- >10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
- 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Brotos nucleares

Pontes nucleoplásmicas

- ✓ Citotoxicidade
- ↓ IDN/IDNC
- ✓ Apoptose
- ⊘ Necrose



Efeitos antitumorais por mecanismos citogenéticos do [6]-Gingerol em modelo animal de Sarcoma 180

Antitumoral effects by cytogenetic mechanisms of [6]-Gingerol in a Sarcoma 180 animal model.

Rosália Maria Tôrres de Lima, Antonielly Campinho dos Reis, José Victor de Oliveira Santos, José Williams Gomes de Oliveira Filho, Ag-Anne Pereira Melo de Menezes, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Débora Caroline do Nascimento Rodrigues, José Roberto de Oliveira Ferreira, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Ana Carolina Soares Dias, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, João Marcelo de Castro e Sousa, Md. Torequul Islam, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Artigo submetido ao periódico

Chemosphere (ANEXO C)

QUALIS A2 – Biotecnologia

Resumo

O [6]-Gingerol ((S)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-decanona) é uma substância fenólica que apresenta diversas propriedades farmacológicas, tais como ação antioxidante, antiemética, anti-inflamatória e anticancerígena. O presente estudo avaliou os efeitos antitumorais do [6]-Gingerol em células primárias de Sarcoma 180, assim como linfócitos de sangue periférico de camundongos, com aplicação de biomarcadores citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose. As células do líquido ascítico foram tratadas com [6]-Gingerol nas concentrações de 5; 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e submetidas aos ensaios de citotoxicidade com azul de Tripán e cometa, bem como ao teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese. A doxorubicina (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e o peróxido de hidrogênio (10 mM) foram utilizados como controles positivos. O [6]-Gingerol, nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentou citotoxicidade em células de Sarcoma 180 pela redução de viabilidade celular e dos índices de divisão celular, incluindo a apoptose e necrose. A genotoxicidade nas concentrações utilizadas foi pontuada pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA nos grupos testados. O [6]-Gingerol, em todas as concentrações, não induziu mecanismos aneugênicos e/ou clastogênicos (micronúcleos) significativos em células de Sarcoma 180, entretanto, induziu outras anormalidades nucleares, como pontes nucleoplasmáticas, brotos nucleares e apoptoses. Os efeitos genotóxicos observados no cotratamento com H_2O_2 (ensaio desafio) empregando células neoplásicas e normais indicaram que o [6]-Gingerol pode induzir estresse oxidativo. Os dados sugerem que o [6]-Gingerol é um candidato a formulações farmacêuticas antitumorais devido sua citotoxicidade e por mecanismos citogenéticos associados com instabilidade genética ocasionada por alterações nucleares e especialmente por apoptose.

Palavras-chave: [6]-Gingerol, genotoxicidade, apoptose, Sarcoma 180.

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (2014), preconiza que cerca de 75 milhões de pessoas serão acometidas com algum tipo de câncer até 2030, com previsão de 17 milhões de mortes em todo o mundo. A ocorrência de 600 mil casos novos de câncer no Brasil é estimada para cada ano do biênio 2018-2019 (INCA, 2017). Muitos avanços terapêuticos foram alcançados envolvendo os tipos mais comuns de câncer (mama, próstata, cólon, pulmão), no entanto, tumores raros e heterogêneos de origem mesenquimal, tais como os sarcomas, progredem em relação à compreensão dos mecanismos do câncer (POST, 2012; TAYLOR et al., 2011; POTTER; JONES; BARROTT, 2018).

Os sarcomas são relativamente mais comuns em crianças e adultos jovens, e classificam-se em duas subcategorias principais (sarcomas de tecido mole e ósseo), que são amplamente distribuídos no organismo (FRITZ, 2000; POST, 2012) e apresentam mais de 70 subtipos (DEMETRI et al., 2010; BRIDGE, 2014), decorrentes de cartilagem, músculo, vasos sanguíneos, nervos e gordura (VODANOVICH; CHOONG, 2018). Na oncologia médica, cada paciente acometido por sarcoma é um *outlier* (DEMETRI et al., 2010), e constituem <1% de todas as neoplasias existentes em centros de tratamento, o que geralmente resulta em atraso no diagnóstico (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). Modelos com sarcoma são fundamentais para o entendimento da biologia molecular do câncer (QUESADA; AMATON, 2012; MARINO-ENRIQUEZ, 2015), sendo o Sarcoma 180 (S-180) o mais utilizado em estudos experimentais por apresentar alta taxa de disseminação e índice de proliferação, permitindo o estudo comparativo no uso de substâncias naturais e/ou sintéticas potencialmente tóxicas (WAL et al., 2003; HUSAIN; VERMA, 2011; MARIÑO-ENRÍQUEZ; BOVÉE, 2016).

Com base nos três diferentes estágios da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão), os agentes quimiopreventivos devem apresentar a capacidade de inibir, retardar ou mesmo reverter o processo tumoral (MORAES; NETO; MENCK, 2012; AMAWI; ASHBY; TIWARI, 2017). O desenvolvimento de terapias antitumorais tais como cirurgia, radioterapia, quimioterapia citotóxica e métodos de tratamento seletivo aumentaram consideravelmente a sobrevivência ao câncer (KEMP, 2015; ALIMBETOV et al., 2018). Embora a quimioterapia convencional ofereça muitos avanços terapêuticos, ainda apresenta limitações graves, considerando o desenvolvimento de resistência, eficácia limitada contra uma série de tumores sólidos, efeitos adversos, intolerância e não seletividade (MINKO et al., 2013; MUGGIA; KUDLOWITZ, 2014).

A administração de fitoquímicos quimiopreventivos em pequenas doses tende, sobretudo, a afetar células cancerígenas e células tronco-cancerígenas (CSCs), aumentando ainda mais o estresse celular, levando a danos irreversíveis (TANVEER; FATHI; GUY, 2011; PRATHEESHKUMAR et al., 2012; PATIL et al., 2015), especialmente por geração terapêutica de espécies reativas de oxigênio (EROs) que ocasionam apoptose em células cancerígenas (RASTOGI, 2014). Por outro lado, as alterações induzidas por fitoquímicos em células normais podem ser toleradas sem afetar sua resposta fisiológica (TANVEER; FATHI; GUY, 2011), indicando assim, a importância de estudos com outras substâncias candidatas a agentes antitumorais.

Produtos naturais geralmente apresentam ações multidirecionadas com efeitos colaterais mínimos, tornando-os candidatos ideais para a terapêutica do câncer (PATRIDGE et al., 2016; SHANMUGAM et al., 2017). Estudos experimentais abordados por DE LIMA et al. (2018) apontaram que o fitoquímico [6]-Gingerol ([6]-G), presente no rizoma do gengibre, apresentou efeitos anti-proliferativos em testes *in vitro* empregando linhagem tumoral cervical (HeLa, CaSki, SiHa) (RASTOGI et al., 2015); leucêmica (K562, LAMA84, JURLMK1, U937, HL-60, NB4) (RASTOGI et al., 2014); hepática (HepG2) (IMPHENG et al., 2015) e glioblastoma (U87) (LEE et al., 2014), tais linhagens cancerígenas demonstraram sensibilidade ao aumento de EROs durante o tratamento com [6]-G, acarretando supressão do crescimento e indução apoptótica.

O emprego de biomarcadores citogenéticos para avaliar a atividade mutagênica/genotóxica de compostos naturais e sintéticos possibilita a análise de instabilidade genética (ROTHFUSS et al., 2011; VANDAMME, 2015), em tecidos/células normais e tumorais, sendo amplamente utilizado o teste de micronúcleo (MN) para detectar alterações citogenéticas como clastogenicidade, aneugenicidade e outras anormalidades nucleares indicativas de morte celular (KANG et al., 2013; UNO et al., 2015). O ensaio de cometa também contribui, inicialmente na avaliação de genotoxicidade por rupturas na cadeia de DNA (CORCUERA et al., 2015), bem como, danos oxidativos (DAVISON, 2016). Dessa forma, o estudo teve como objetivo avaliar, em modelo não clínico as possíveis ações antitumorais do [6]-G, por mecanismos citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose em cultura primária de S-180, com aplicação de ensaios de viabilidade celular e de biomarcadores citogenéticos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e produtos químicos

A substância isolada [6]-Gingerol ($C_{17}H_{26}O_4$) (PubChem CID: 442793), segundo o fornecedor, apresentou grau de pureza $\geq 98\%$ (HPLC) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)). O meio de cultura RPMI 1640, penicilina e estreptomicina foram obtidos da GIBCO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A doxorubicina (Dox) foi obtida da Eurofarma Laboratórios S.A. (São Paulo, Brasil); enquanto que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (São Paulo, Brasil). A Dox foi utilizada em uma única concentração ($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, solubilizada em água destilada). O H_2O_2 foi preparado a uma concentração final de 10 mM (diluído em água destilada).

2.2 Análise cromatográfica do padrão sigma [6]-G

A substância padrão [6]-G foi analisada por técnicas acopladas como HPLC-DAD, LC-MS. Para o análise preparou-se uma solução de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol 95% do padrão. A análise por HPLC-DAD foi realizada em cromatógrafo de alta eficiência (CLAE), SHIMADZU®, modelo LC-20 A. Controlador CBM-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M20, coluna C18 Phenomenex Luna, $5 \mu\text{m}$ ($250 \times 4,60 \text{ mm}$) em gradiente MeOH:H₂O (5-100% MeOH).

Os espectros de LC-HRESIMS foram obtidos utilizando um sistema Thermo Instruments MS (LTQ XL / LTQ Orbitrap Discovery) acoplado a um sistema de HPLC Thermo Instruments (detector Accela PDA, amostrador automático Accla PDA e bomba Accela). Foram utilizadas as seguintes condições: tensão capilar 45 V, temperatura capilar 250 °C, taxa de fluxo de gás auxiliar 10-20 unidades arbitrárias, taxa de fluxo do gás da bainha 40-50 unidades arbitrárias, voltagem de pulverização 4,5 kV, faixa de massa 100-2000 amu (resolução máxima 30000). O sistema de HPLC foi executado usando uma coluna C18 analítica SunFire ($5 \mu\text{m}$, 100 \AA , $4,6 \times 150 \text{ mm}$), com um gradiente de 0,1% de ácido fórmico em H₂O: ácido fórmico 0,1% em MeOH 0 - 100% em 30 min, com uma taxa de fluxo $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.3 Preparação da amostra teste

O [6]-Gingerol foi solubilizado em DMSO a 10% e posteriormente diluído em água destilada até obter-se as concentrações de 5, 10, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, escolhidas previamente em testes de viabilidade celular em células não neoplásicas com CL50 de 11,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e em células de Sarcoma 180 com IC de 5,73 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo posteriormente utilizadas nos ensaios CMBN, cometa e cotratamento com H_2O_2 . Cabe enfatizar que tais concentrações também foram relatadas em estudos de atividade antitumoral (CHAKRABORTY et al., 2012; LIN; LIN; TSAY, 2012).

2.4 Cultura primária de Sarcoma 180

As células do líquido ascítico de camundongos com S-180 foram obtidas da cavidade peritoneal (UFPI, #167/16). Após 10 dias da inoculação, o líquido ascítico, contendo células tumorais, foi removido por punção na cavidade abdominal de um animal. Em seguida, as células de S-180 foram contadas em câmara de *Neubauer* ($0,5 \times 10^6$ células/mL) e incubadas em meio de cultura RPMI1640 (1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina), mantidas em estufa a 37°C, por 72h, concomitantemente com as substâncias teste e controles.

2.5 Viabilidade celular por azul de Tripán em cultura primária de S-180

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

2.6 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)

O CBMN foi realizado de acordo com FENECH (2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI 1640 (fitohemaglutinina A GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], 1 mM.L⁻¹ 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 S-180 (0,5 x 10⁶ células/mL). Em cada frasco de cultura foram acrescentadas as soluções teste e controles. As células foram incubadas por 44 h a 37° ± 1 °C. Após este período, foram adicionados às culturas 6 µg.mL⁻¹ de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando os frascos à incubação por mais 28 h. Ao final de 72 h, as culturas foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* celular foi levemente agitado, para nova centrifugação após a adição de 5 mL de fixador (metanol:ácido acético, 5:1) e 3 gotas de formaldeído aos tubos. O procedimento foi repetido por 2 vezes utilizando fixador 3:1 e sem o formaldeído. Por fim, o sobrenadante foi descartado e 2 a 4 gotas da suspensão celular foram gotejadas sobre lâminas, as quais foram coradas com solução de Giemsa 5% por 7 minutos. As lâminas, previamente codificadas, foram analisadas em teste cego, com auxílio de microscópio óptico (1000X), considerando os danos citogenéticos presentes em 1000 células por lâmina em duplicata. O índice de divisão nuclear (IDN) foi calculado por meio da seguinte fórmula: $IDN = (M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)) / N$, 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: $IDNC = (Ap + Nec + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)) / N^*$, onde Ap representa o número de células em apoptose; Nec, o número de células em necrose; M1-M4, o número de células viáveis com 1-4 núcleos; e N*, o número total de células viáveis e não viáveis, de acordo com FENECH (2000).

2.7 Ensaio cometa

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por SPEIT; ROTHFUSS (2012). Alíquotas de 10 µL de suspensão celular de S-180 (0,5 x 10⁶ células/mL) foram homogeneizadas com agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (90 µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal 1,5%. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10, com adição de 1%

Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso), por até 72 horas a 4°C. Após esse período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH>13) por 20 minutos; e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos em cuba de eletroforese. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M e pH 7,5) e coradas com solução de prata. As lâminas foram analisadas quanto ao perfil fotomicrográfico das células (aumento de 400X em microscópio óptico) e os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD) de 100 células em duplicata. O ID foi calculado por meio da fórmula: $ID = \Sigma (\text{número de células em determinada classe de dano} \times \text{classe de dano})$, que variou de 0 a 400 e FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - n^\circ \text{ de células classe } 0$.

2.8 Estudo de mecanismo para genotoxicidade pelo cotratamento com H₂O₂ (ensaio desafio)

Avaliou-se no experimento o envolvimento do estresse oxidativo como mecanismo para a indução de genotoxicidade de acordo com LUZ et al. (2013). Para tanto, alíquotas de 10 µL de suspensão celular de S-180 / sangue periférico ($0,5 \times 10^6$ 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 ao [6]-G (5, 10, 20 µg.mL⁻¹), isoladamente e em cotratamento com H₂O₂ (10 mM), por 5 minutos. Depois, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso) por 5 minutos, a 4°C. Após este procedimento, procedeu-se a continuação do ensaio cometa, conforme o tópico anterior.

2.9 Análise estatística

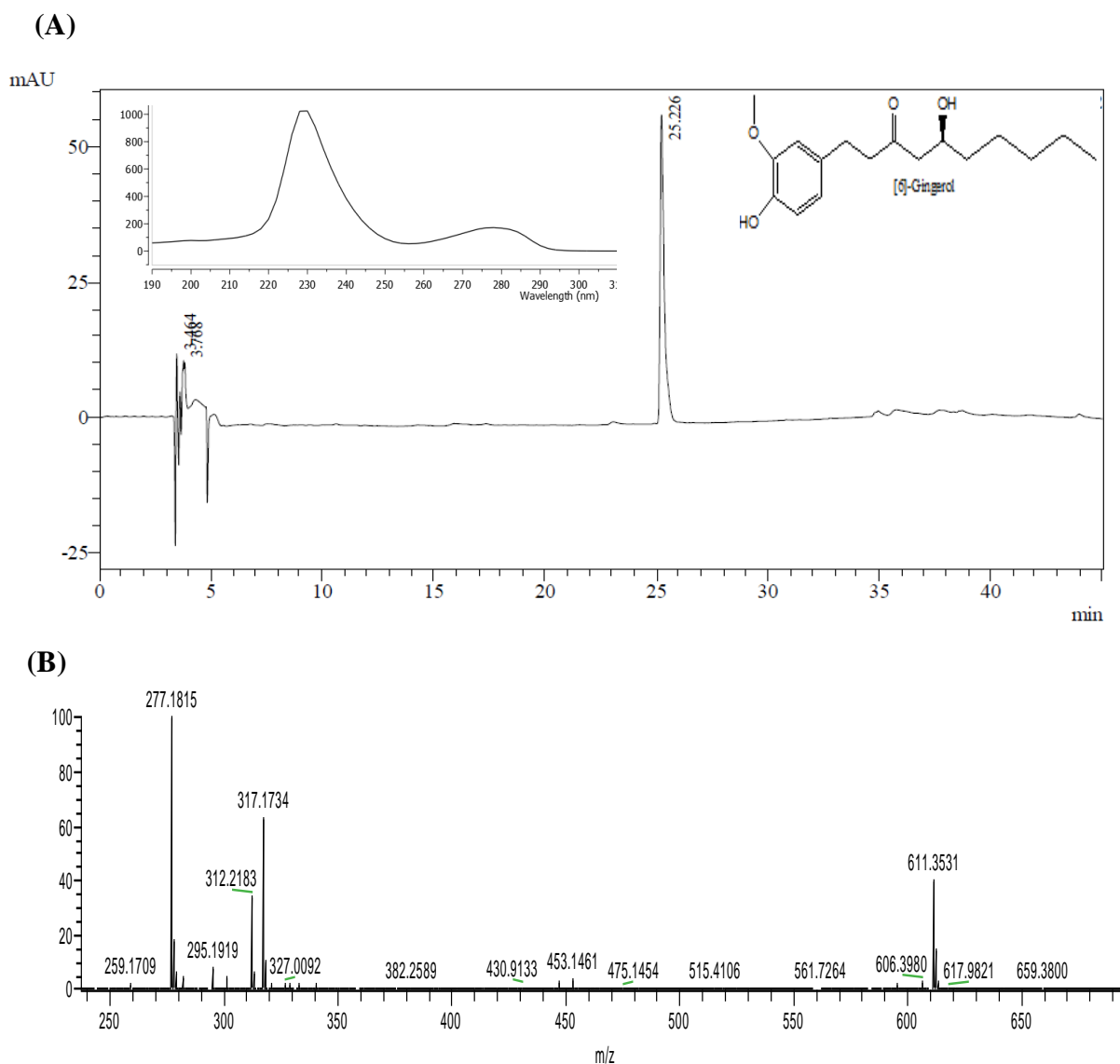
A fim de determinar as diferenças entre os tratamentos, dados expressos como a média ± desvio padrão foram comparados por análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias, seguido pelo teste de Tukey (considerando valores de $p < 0,05$ como significantes), por meio do programa *Graphpad Prism* (software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

3 RESULTADOS

3.1 Análise cromatográfica do padrão sigma [6]-G

O cromatograma do HPLC–UV e o espectro de massas HRESI-MS são apresentados nas **Figuras 1A e 1B**, respectivamente. O pico em 25.22 minutos mostrou UV do gingerol tendo absorção máxima de UV em 279 nm e um ombro em 230 nm. A molécula protonada $[M+H]^+$ apresentou íon em m/z 295.1919, íon aducto $[M+Na]^+$ em 317.1734 e um íon dímero sodiado $[2M+Na]^+$ em m/z 611.3531 identificado como [6]-G.

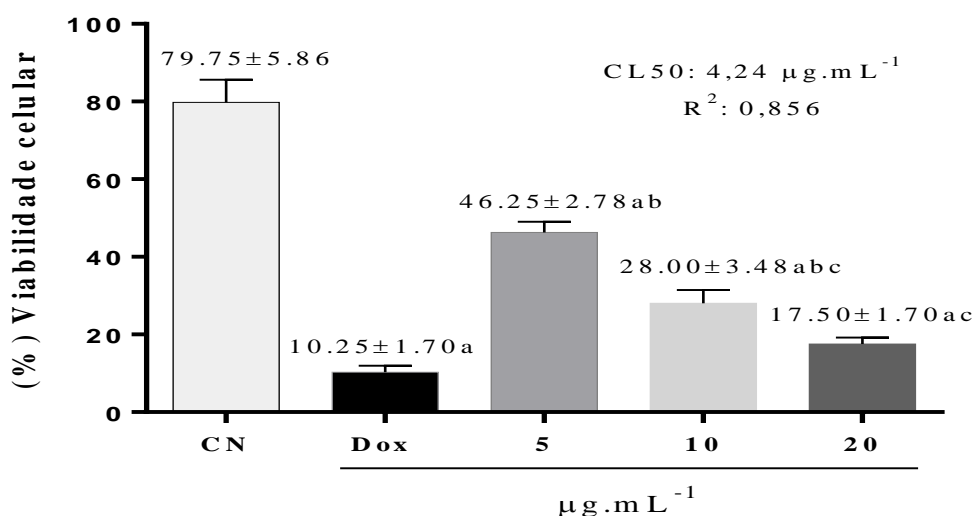
Figura 1 - Cromatograma no modo analítico em gradiente liner em 254 nm e espectro de UV do padrão [6]-G (A), espectro de massas do [6]-G (B).



3.2 Avaliação da citotoxicidade do [6]-G pelo ensaio de exclusão de azul de Tripán

O [6]-G, nas concentrações de 5, 10; 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, assim como a Dox (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) interferiram de forma significativa na viabilidade celular da cultura primária de S-180, o [6]-G apresentou IC_{50} de 4,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IC: 3,29-5,48 e $R^2=0,856$ (**Figura 2**), indicando efeitos citotóxicos pela redução das células viáveis, em comparação ao CN. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as maiores concentrações (10; 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) que apresentaram redução significativa da viabilidade em relação a menor concentração (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Verificou-se ainda, que a concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi tão citotóxica quanto a Dox, sendo possível observar elevação significativa da citotoxicidade com o aumento da concentração do [6]-G.

Figura 2 - Citotoxicidade do [6]-G pela determinação da CL_{50} e viabilidade celular pelo ensaio de exclusão por azul de Tripán em S-180 após 72 h de exposição. Valores representam a média \pm erro padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. [6]-G (5; 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a $p<0,05$ comparado ao grupo CN, ^b $p<0,05$ comparado ao grupo Dox e ^c $p<0,05$ comparado ao grupo 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

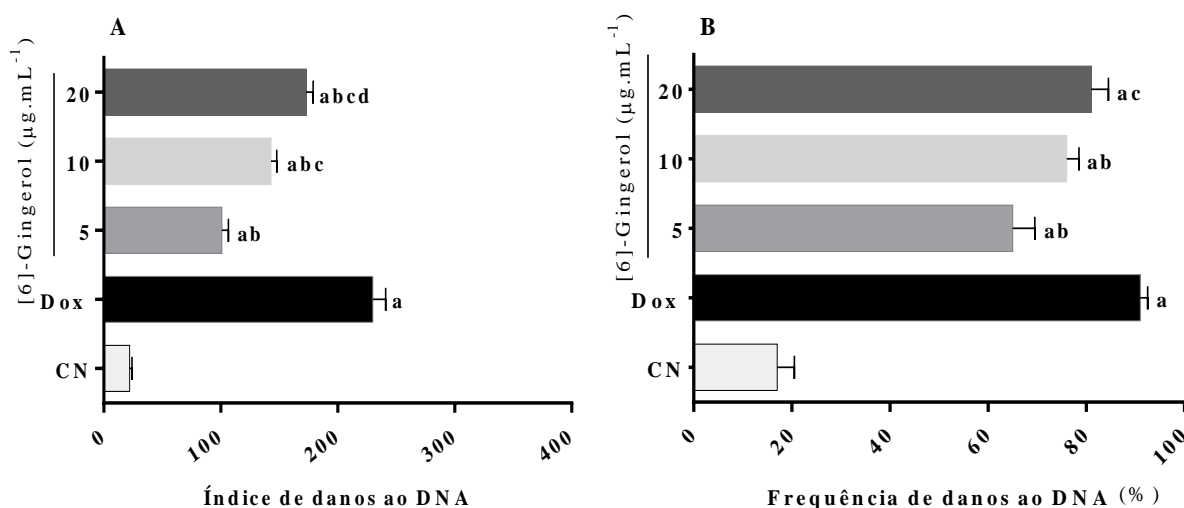


3.3 Efeitos genotóxicos do [6]-G em cultura primária de S-180 através do ensaio cometa

Na avaliação da genotoxicidade, o tratamento com [6]-G, induziu o aumento do índice de danos em células tumorais (S-180) de forma dependente da concentração. Mesmo diferindo estatisticamente do CN, apresentou efeito genotóxico menor quando comparado a Dox (**Figura 3A**). Em relação a frequência de danos, também verificou-se genotoxicidade pelo aumento

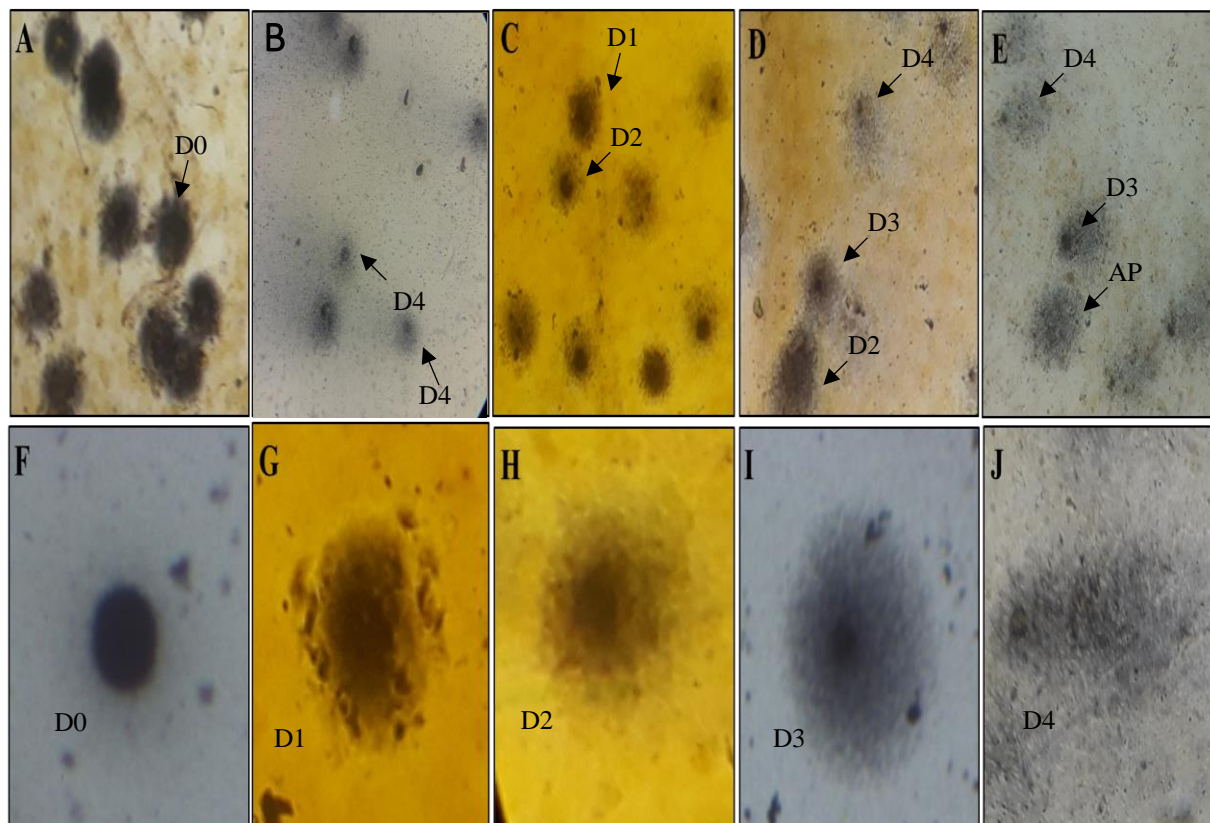
significativo em todas as concentrações do [6]-G em relação ao CN, enquanto que apenas a maior concentração induziu efeito similar a Dox. Foi observado ainda diferença significativa entre a menor ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e maior concentração ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dos grupos tratados com [6]-G para frequência de danos (**Figura 3B**).

Figura 3 - Genotoxicidade do [6]-G em cultura primária de S-180 após 72 h de exposição. **A:** Índice de Danos. **B:** Frequência de Danos. Valores representam a média \pm erro padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. [6]-G (5 ; 10 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$). ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CN, ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo Dox, ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.



O perfil fotomicrográfico (microscopia óptica 400X) expõe o esboço das células primárias de S-180 tratadas com [6]-G, sendo possível evidenciar diferenças entre os grupos em relação aos tipos (classes) de danos ao DNA (**Figura 4**). As células tumorais de S-180 expostas ao [6]-G apontaram danos crescentes de acordo com a elevação da concentração, dessa forma verificou-se nos distintos tratamentos, níveis de dano 1 e 2 ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$); 2 e 3 ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$); 3 e 4 ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo que o [6]-G apresentou similaridade de danos com o grupo tratado com Dox, especialmente na maior concentração ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pela frequência dos danos 3 e 4.

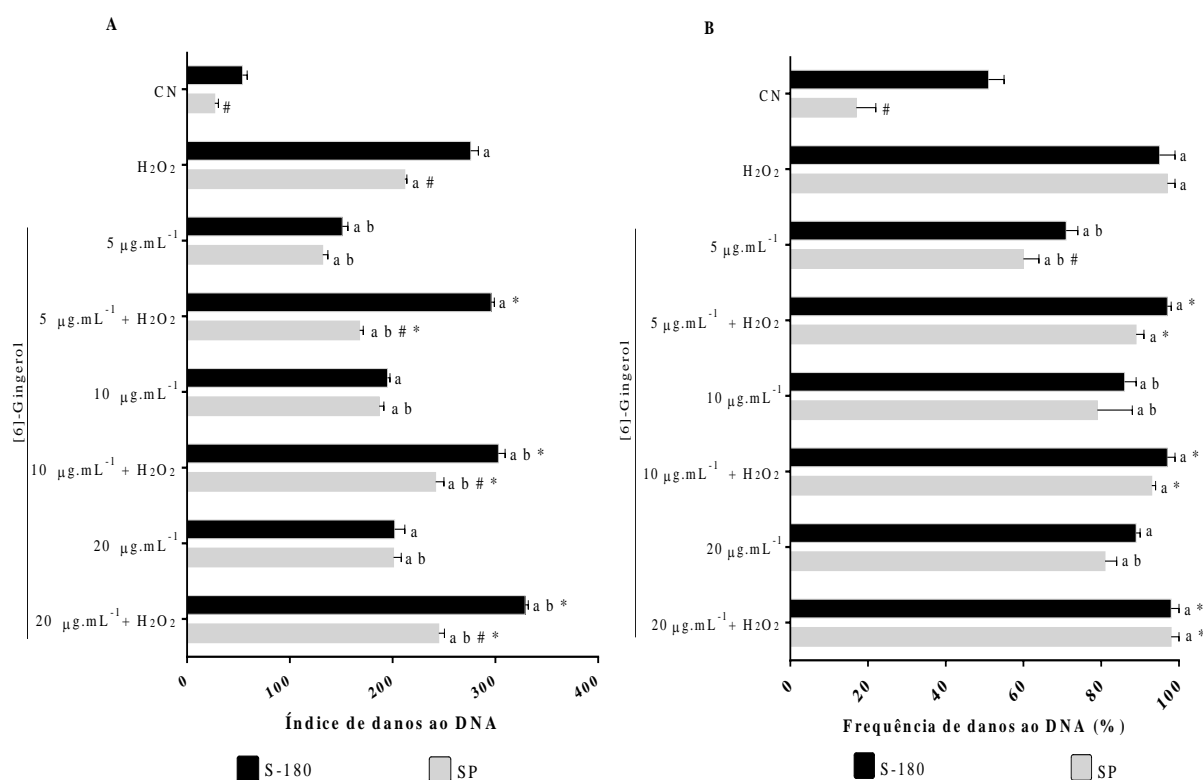
Figura 4 - Perfil fotomicrográfico de genotoxicidade do [6]-G em cultura primária de S-180 no ensaio cometa. **A:** células sem tratamento. **B:** dox ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) **C:** [6]-G $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. **D:** [6]-G $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. **E:** [6]-G $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$. **F:** Dano 0 (D0). **G:** Dano 1 (D1). **H:** Dano 2 (D2). **I:** Dano 3 (D3). **J:** Dano 4 (D4). Apoptose (AP). Coloração com nitrato de prata. Aumento de 400X.



3.4 Avaliação de um dos possíveis mecanismos genotóxicos do [6]-G em cultura primária de S-180 e sangue periférico de camundongos

Na análise do Índice de Danos (ID), verificou-se que as concentrações testadas do [6]-G induziram genotoxicidade em células de S-180 e células não tumorais de camundongos saudáveis (**Figura 5**). Os danos genotóxicos ocasionados pelo [6]-G em S-180 nas duas maiores concentrações (10 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram similares ao observado no grupo H_2O_2 , estas também diferiram quando comparadas ao CN. Entretanto, o cotratamento com H_2O_2 em células de S-180, o [6]-G ampliou significativamente os danos induzidos pelo H_2O_2 , em células de SP, esse efeito foi observado na maior concentração.

Figura 5 - Genotoxicidade do [6]-G em cultura primária de S-180 e sangue periférico (SP) de camundongos sem alterações neoplásicas em cotratamento com peróxido de hidrogênio, por mecanismos associados ao estresse oxidativo. **A:** Índice de Danos. **B:** Frequência de Danos. Valores representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes. S-180. SP: sangue periférico. CN: células não tratadas. H₂O₂: Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mM). [6]-G (5; 10 e 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). ANOVA, Two-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CN, ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo H₂O₂ e [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo S-180 na mesma concentração, * $p < 0,05$ comparado ao [6]-G sem H₂O₂ na mesma concentração.



Em células normais (SP), o [6]-G induziu toxicidade em todas as concentrações testadas no ID, sendo que, em cotratamento, a menor concentração apresentou efeitos de modulação dos danos oxidativos do H₂O₂, e ampliou os danos do H₂O₂ nas duas maiores (10 e 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Diferenças entre SP e S-180 referente aos danos genotóxicos foram observadas no CN para H₂O₂, assim como, no cotratamento em todas as concentrações. Na avaliação da frequência de danos (FD), o [6]-G demonstrou ação genotóxica similar ao H₂O₂ para o S-180 apenas na maior concentração, entretanto, no cotratamento, todas as concentrações não diferiram dos dados obtidos para o H₂O₂, em células de SP também ocorreu indução genotóxica observada pela diferença estatística com o CN, entretanto, de forma não similar ao H₂O₂. Em contrapartida, os grupos cotratados não diferiram dos dados obtidos para H₂O₂. Diferenças de resposta para danos oxidativos em células de S-180 e células não neoplásicas foram observadas no CN e [6]-G apenas na menor concentração.

3.5 Efeitos antitumorais do [6]-G em cultura primária de S-180 avaliado pelo teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese

Na avaliação dos efeitos antitumorais do [6]-G (**Tabela 1**), os dados apontam que a substância não induziu efeitos mutagênicos pela formação de micronúcleos em células de S-180 quando comparado ao CN, porém, verificou-se aumento significativo na formação de pontes nucleoplásmicas e efeito similar a Dox na maior concentrações ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$), assim como, elevação significativa no número de brotos nucleares, nas concentrações de 10 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, as quais, não diferiram dos resultados obtidos para Dox. O [6]-G induziu citotoxicidade em células tumorais de S-180 pela redução do índice de divisão celular (IDN), sobretudo na concentração maior ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e pelo índice de divisão nuclear considerando apoptose e necrose (IDNC). As concentrações de 10 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quando comparadas a Dox, não divergiram estatisticamente.

Tabela 1 - Mecanismos citogenéticos do [6]-G avaliados em células de S-180 após 72h de exposição indicativos de efeitos antitumorais, por meio do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

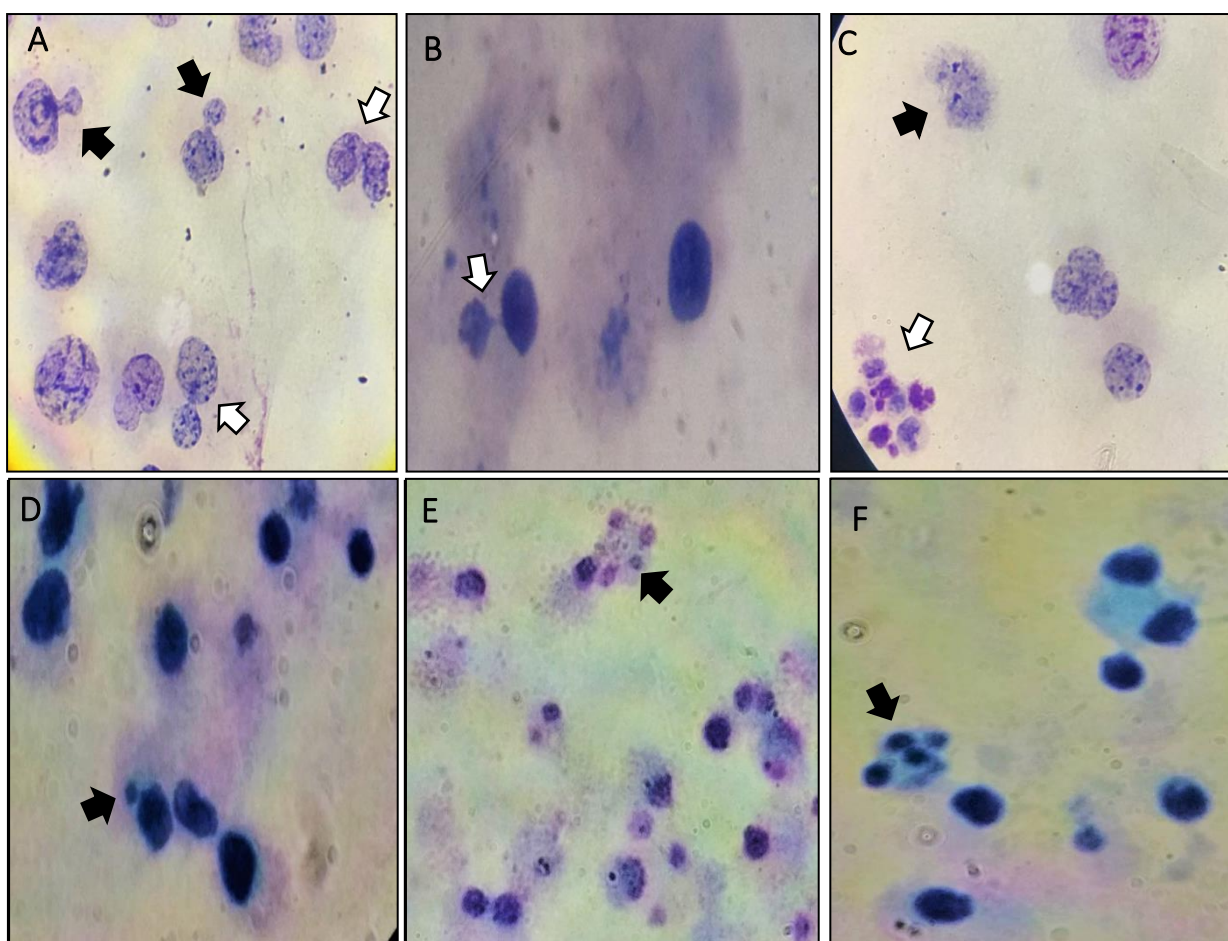
Tratamento	Danos citogenéticos			Citotoxicidade	
	Micronúcleos	Pontes	Brotos	IDN	IDNC
Sarcoma 180					
CN	1.75 ± 1.02	2.80 ± 0.41	1.70 ± 0.12	1.58 ± 0.2	1.62 ± 0.04
Dox $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$	36.50 ± 0.35^a	35.5 ± 3.53^a	17.0 ± 1.41^a	1.14 ± 0.03^a	1.12 ± 0.02^a
[6]-Gingerol					
$5 \mu\text{g.mL}^{-1}$	2.00 ± 0.41^b	4.00 ± 2.80^b	5.50 ± 0.70^b	1.49 ± 0.07^b	1.19 ± 0.03^{ab}
$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$	4.50 ± 0.70^b	18.50 ± 0.70^{abc}	15.50 ± 2.12^{ac}	1.41 ± 0.02^{ab}	1.16 ± 0.005^a
$20 \mu\text{g.mL}^{-1}$	4.50 ± 0.70^b	31.50 ± 2.12^{acd}	17.00 ± 2.82^{ac}	1.18 ± 0.06^a	1.12 ± 0.03^a

Valores representam a média \pm erro padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. Dox: ¹. [6]-G (5 ; 10 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$). ANOVA, One-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CN, ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo DOX, ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. IDN = $(M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)) / N$, onde M1-M4, representa o número de células viáveis com 1-4 núcleos e N*, o número total de células viáveis. IDNC = $(Ap + Nec + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)) / N^*$, onde Ap, representa o número de células em apoptose; Nec, o número de células em necrose; M1-M4, o número de células viáveis com 1-4 núcleos; e N*, o número total de células viáveis e não viáveis

A **Figura 6** apresenta o perfil fotomicrográfico (microscopia óptica 1000X) das alterações citogenéticas observadas em células de S-180 tratadas com [6]-G. A análise fotomicrográfica reafirma os resultados obtidos para danos citogenéticos e ação citotóxica do [6]-G frente a células primárias de S-180, sendo possível evidenciar aumento dos índices de

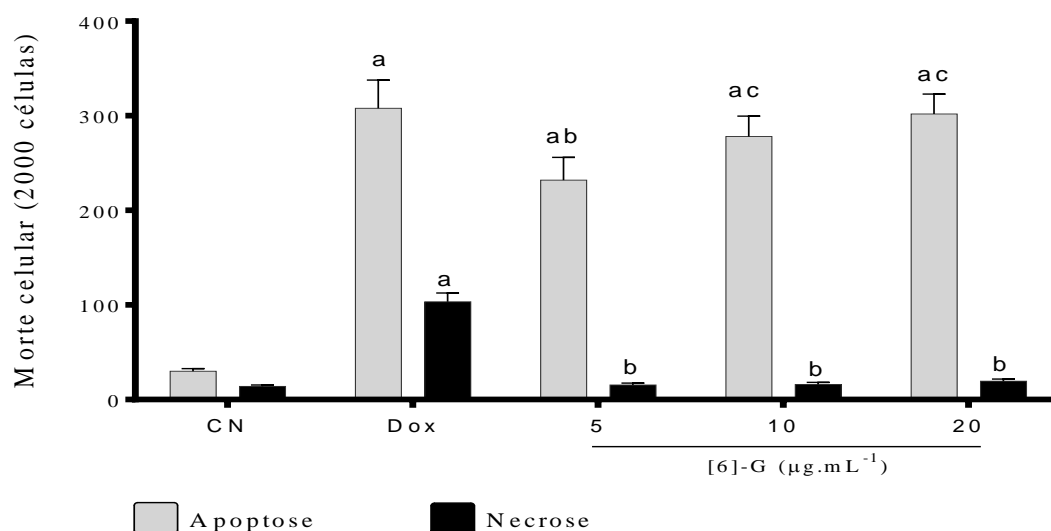
broto nucleares e pontes nucleoplásmicas, além do potencial citotóxico, evidenciado pela presença de células apoptóticas. Esses dados apontam que o [6]-G induz alterações nucleares além de atividade antitumoral por indução de citotoxicidade, especialmente por apoptose. Cabe ressaltar que as alterações induzidas pelo [6]-G foram similares à Dox, sobretudo na maior concentração.

Figura 6 - Perfil fotomicrográfico (microscopia óptica -aumento de 1000X) de células S-180 tratada com [6]-G (5, 10 e 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) no teste CBMN indicativos de efeitos antitumorais. Seta preta em **A**: broto nucleares. Seta branca em **A**: ponte nucleoplásmica. Seta em **B**: ponte nucleoplásmica. Seta preta em **C**: necrose. Seta branca em **C** apoptose. Seta em **D**: micronúcleo. Seta em **E**: apoptose. Seta em **F**: apoptose. Coloração com Giemsa 5%.



O aumento da concentração do [6]-G induziu proporcionalmente na elevação do número de apoptoses em células tumorais (S-180), verificou-se ainda, que as concentrações maiores (10; 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) não diferiram entre si, além de demonstrarem efeitos citotóxicos similares a Dox em S-180, no entanto, os dados referentes a necrose indicaram ausência significativa de lesões necróticas quando comparado com o CN (**Figura 7**).

Figura 7 - Efeitos antitumorais do [6]-G por apoptose e necrose em cultura primária de S-180 após 72h de exposição. Valores representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. S-180. CN: células não tratadas. Dox: 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. [6]-G (5; 10 e 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). ANOVA, One-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CN, ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo Dox na mesma semana de tratamento.



4 DISCUSSÃO

O [6]-G é uma substância candidata a agente antitumoral por mecanismos associados a citotoxicidade, como observado no ensaio de exclusão por azul de Tripán com cultura primária de S-180 (**Figura 2**), onde verificou-se redução significativa da viabilidade celular (IC_{50} de 4,24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), especialmente na concentração maior (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), de forma similar ao antineoplásico doxorubicina (Dox). Esses dados corroboram com outros estudos sobre os efeitos antitumorais do [6]-G (LIN; LIN; TSAY, 2012; IMPHENG et al., 2015; BERNARD; MCCONNERY; HOSKIN, 2017) e com levantamento bibliográfico realizado por DE LIMA et al. (2018), no qual, em revisão sistemática acerca de estudos experimentais com o [6]-G, apontou redução da viabilidade no tratamento de células tumorais (RASTOGI et al., 2015; ZHANG et al., 2017), assim como, indução apoptótica em linhagens de carcinoma cervical (25 - 175 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), cólon (5 - 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pâncreas (5 - 20 μM), mama (2 - 10 μM), glioblastoma (10 - 100 μM) e leucemia (10 - 200 μM) (LEE et al., 2008; CHAKRABORTY et al., 2012; LIN; LIN; TSAY, 2012; KIM; KIM, 2013; LEE et al., 2014; RASTOGI et al., 2014; RADHAKRISHNAN et al., 2014).

Dentre os mecanismos propostos para a morte celular mediada pela Dox, destaca-se o aumento do estresse oxidativo, tal ação deve-se em função do grupo quinona da Dox, que pode ser oxidada a um radical semiquinona através da adição de um elétron (MINOTTI et al., 2004; SCHIMMEL et al., 2004), os radicais semiquinona reagem rapidamente com o oxigênio para gerar superóxido e peróxido de hidrogênio, causando danos ao DNA e morte celular, a Dox também age como um quelante de ferro, onde o complexo Dox-ferro catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila altamente reativos (WALLACE, 2003; OLIVEIRA et al., 2004).

O estudo da citotoxicidade se destaca como um método de rastreio com alto rendimento, estratégico na avaliação de linhagens tumorais e normais expostas a agentes anticancerígenos, possibilitando o estudo de numerosas substâncias em curto período de tempo (SINGH et al., 2016). A ação citotóxica do [6]-G em células tumorais também foi evidente pelo efeito inibitório da viabilidade em linhagem de adenocarcinoma colorretal humano (HCT-15) com IC50 de 29 μg (KUMARA et al., 2017), além de promover características antitumorais e pró-apoptóticas verificadas em linhagem cancerígena de cólon humana (HCT-116) tratada com 150 e 200 μM de [6]-G, levando a redução da taxa de crescimento celular em 22% e 28%, respectivamente.

O [6]-G também inibiu células viáveis em SW480 (17%), HT-29 (28%), LoVo (13%) e Caco-2 (8%) em concentrações de [6]-G acima de 200 μM . Estudos também apontam que o [6]-G induz parada do ciclo celular nas linhagens de câncer de cólon com aumento da fase G1 e redução da fase S da mitose (LEE; CEKANOVA; BAEK, 2008). Atividade anticancerígena da maioria dos produtos naturais geralmente atua via regulação da função imunológica, induzindo apoptose ou inibindo a proliferação celular (RAYAN; RAIYN; FALAH, 2017). Entretanto, substâncias isoladas de origem alimentar, a exemplo do [6]-G, devem ser submetidas à análise do potencial toxicogenético (LI et al., 2017), em tecidos normais e tumorais afim de verificar possíveis alterações citogenéticas (UNO et al., 2015) e analisar rupturas na cadeia de DNA (CORCUERA et al., 2015) e danos oxidativos (DAVISON, 2016).

O tratamento de células tumorais (S-180) com [6]-G conforme exposto nas **Figuras 3A** e **3B** apontaram indução de genotoxicidade pelo aumento do ID de forma dependente da concentração, e do FD, especialmente em 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com significativa similaridade com a Dox. Cabe enfatizar que na versão alcalina do ensaio cometa os danos detectados podem ser associados a quebras de fita simples e/ou duplas, sítios álcali-lábeis e danos oxidativos (QUINET et al., 2017). Em estudo realizado por LIN; LIN; TSAY (2012), utilizando

linhagens tumorais de cólon humano (LoVo), o [6]-G pode induzir além da parada do ciclo celular na fase G2/M, elevados níveis de EROs e fosforilação de p53.

A geração de EROs induzida por [6]-G é conhecida por elevar danos ao DNA em células cancerígenas (OYAGBEMI; SABA; AZEEZ, 2010), como observado em células de leucemia mieloide crônica (K562) e aguda (U937) (RASTOGI et al., 2014). Danos ao DNA causados tanto por agentes externos quanto por processos endógenos podem sobrecarregar o mecanismo de reparo funcional do DNA, podendo causar instabilidade genética com a formação de mutações (GOODMAN; WOODGATE, 2013; ALEXANDROV; STRATTON, 2014; NOTTA et al., 2016; TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017).

O [6]-G induziu danos genotóxicos em células de S-180 e em células não tumorais de sangue periférico (SP) de camundongos saudáveis (**Figura 5**), especialmente nas duas maiores concentrações, de forma similar ao observado para o H₂O₂. Esses dados apontam possíveis similaridades na produção de estresse oxidativo. Em cotratamento com o H₂O₂ em células de S-180 o [6]-G ampliou os danos oxidativos induzidos pelo peróxido, indicando efeitos oxidativos e/ou pró-oxidativos, entretanto em SP esses efeitos foram observados apenas na maior concentração.

O H₂O₂, apesar de não ser um radical livre, é uma espécie com alto potencial reativo, uma vez que participa da reação de geração do radical hidroxil (OH[•]), que possui potencial ação deletéria e constitui no mais reativo dos radicais, pois pode alterar a estrutura celular que se encontra próxima, o H₂O₂ ainda difere dos radicais livres pela maior estabilidade e capacidade de atravessar as membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004)

A supressão de EROs utilizando fitoquímicos é crucial para a quimioprevenção do câncer, e ao mesmo tempo, também foram reconhecidos como agentes indutores de EROs em uma ampla variedade de células cancerígenas (WANG; YI, 2008), as quais apresentam níveis elevados de EROs (particularmente H₂O₂), e são adaptadas para sobreviver sob estas condições. Alguns fitoquímicos perturbam ainda mais esse “equilíbrio”, elevando a quantidade de EROs para níveis letais, levando à ativação de várias vias e à apoptose em células neoplásicas. Alguns antioxidantes fenólicos atuam como pró-oxidantes em certas circunstâncias (pH elevado com altas concentrações de íons de metais de transição e O₂), que favorecem o início de seu processo de auto-oxidação (YORDI et al., 2012).

No estudo com o H₂O₂ foi possível evidenciar diferenças estatísticas de genotoxicidade pelo aumento do índice de danos entre células de S-180 e SP de camundongos saudáveis no controle negativo, no controle positivo e nos cotratamentos com o H₂O₂, enquanto que esse

efeito foi observado na frequência de danos apenas no controle negativo e na menor concentração do [6]-G. Em comparação com as células normais, as células tumorais apresentam os níveis de EROs aumentados (WANG; YI, 2008), tais condições não são prejudiciais às células tumorais, uma vez que contam com um sistema antioxidante endógeno robusto que atenua o estresse oxidativo para proliferar (MITTLER, 2017).

Ainda por mecanismos oxidativos o [6]-G pode induzir desestabilização lisossomal, assim como a mitocondrial, causando danos a cadeia de transporte de elétrons, levando à produção de EROs, o que induz ainda mais danos no DNA (YANG et al., 2010). A desestabilização lisossomal e mitocondrial tem sido reconhecida como uma característica do dano celular induzido pelo estresse oxidativo (GUICCIARDI et al., 2001; MARTINS et al., 2015; CHEN; LIU; MA, 2016; PLOTEGHER; DUCHEN, 2017). Diversos estudos apontam que o acúmulo de EROs derivadas de lisossomos e mitocôndrias é um importante fator para mecanismos de morte celular por apoptose e autofagia (NAKANISHI; WU, 2009; ZHANG et al., 2016; TSUBONE et al., 2017). Também existem relatos de que a exposição de células cancerígenas a fitoquímicos induz uma resposta sustentada ao dano do DNA que pode levar à morte celular por apoptose (RAJEMDRAN et al., 2011; AZQUETA; COLLINS, 2016).

As alterações por mecanismos citogenéticos podem levar a morte celular por apoptoses e/ou necroses, como observado em células submetidas ao teste CBMN (SISENANDO et al., 2011; MILIC et al., 2015). O [6]-G não induziu efeitos clastogênicos e aneugênicos pela formação de micronúcleos em células de S-180 (**Tabela 1**). Entretanto, existem relatos, contrários ao observado no estudo, onde o [6]-G em concentrações de 5,8 a 11,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ induz o aumento na frequência de micronúcleos em células de HepG2 (YANG et al., 2010), os efeitos mutagênicos dependem do organismo teste ou concentração/dose utilizada (ZEIGER, 2003; KING et al., 2007; YANG et al., 2011).

Entretanto, efeitos mutagênicos e instabilidade genética do [6]-G foram observados pelo aumento de pontes nucleoplásmicas na maior concentração (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), assim como, na formação de brotos nucleares, com aumento significativo em 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As pontes nucleoplásmicas podem ocorrer por meio de rearranjos (cromossomos dicêntricos, cromossomos de anel e cromossomos envolvidos em associações teloméricas), onde os cromossomos são puxados para os pólos opostos durante a anáfase (CORNÉLIO et al., 2014). A presença de brotos nucleares está ligada a fragmentos cromossômicos (LINDBERG et al., 2007), como um mecanismo para eliminar o excesso de cromossomos em um processo em resposta a aneuploidia (MANSILLA; BATALLER; PORTUGAL, 2009), bem como após a quebra de pontes nucleoplásmicas (FENECH et al., 2011).

Vale ressaltar que lesões ao material genético podem levar a formação de rearranjos cromossômicos (deleções, duplicações, inversões e translocações) (MORGANELLA et al., 2016, NIK-ZAINAL et al., 2016). Portanto, a instabilidade genômica desempenha um papel crítico na iniciação e progressão do câncer, com a presença de aneuploidia, tetraploidia, cromossomos soltos ou fragmentados (POTAPOVA; ZHU; LI, 2013; FEGURSON et al., 2015), predispondo a formação de micronúcleos (CRASTA et al., 2012; MACKENZIE et al., 2017).

Os mecanismos citogenéticos observados em células tumorais de S-180 expostas ao [6]-G pode ser relacionados com o nível de citotoxicidade pela redução IDN e IDNC, especialmente em 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de forma similar ao observado para a Dox (**Figura 6**), onde o aumento da concentração do [6]-G influenciou na elevação do número de apoptoses em células tumorais (S-180), nas concentrações maiores, estas demonstraram efeitos citotóxicos similares a Dox em S-180. Existem relatos de que o [6]-G induz a morte celular por autofagia e apoptose mediada por caspase 3 e diminuição da expressão dos genes NF- $\kappa\beta$, AKT e Bcl2 em linhagem HeLa, por outro lado, houve aumento na expressão de proteínas pró apoptóticas TNF α , Bax e citocromo C (CHAKRABORTY et al., 2012). Para Wang et al. (2003), o [6]-G pode também inibir a expressão de Bcl-2 com posterior indução de apoptose em células de HL-60. Efeitos apoptóticos do [6]-G também foram relacionados com liberação de catepsina D para o citoplasma celular, precedendo a liberação do citocromo C mitocondrial com posterior indução de apoptose em células HepG2 após tratamento com [6]-G (YANG et al., 2012).

Como relatado, o [6]-G apresenta efeitos antitumorais por indução de apoptoses (**Figura 7**). A morte celular programada é um procedimento chave no mecanismo de ação dos agentes quimioterápicos contra células tumorais (MALLICK et al., 2018; FERRARI et al., 2018; HUNKE et al., 2018). Esse processo pode ser mediado por caspases, através da ativação de receptores de morte na superfície celular, resultando na ativação da caspase-3 e 7. Quanto a via mitocondrial, o Bcl-2 foi o primeiro inibidor da apoptose a ser descoberto, atuando pelo controle dos procedimentos de permeabilização de membrana mitocondrial, regulando a liberação do citocromo C (ADAMS; CORY, 2018; STRASSER; VAUX, 2018).

Existem relatos de associação entre a viabilidade celular e apoptoses com as EROs, como descrito anteriormente. A exposição da linhagem de glioblastoma humano (U87) ao [6]-G demonstrou redução da viabilidade e aumento de apoptose em concentrações de 10-100 μM , tanto por meio da geração de EROs, quanto pelo aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas (p53, Bax,) e clivagem da Bid ao passo que também foi verificado redução do nível de proteínas anti-apoptóticas (cFLIP, Bcl-2, XIAP) (LEE et al., 2014). Em células tumorais

SW-480 (câncer de cólon) tratadas com [6]-G, observou-se clivagem significativa das pró-caspases -8 e -9 e caspases efetoras -3 e -7 de forma dependente da concentração. Verificou-se também clivagem da proteína PARP, que é um substrato de caspase-3. No tratamento das células com 200 e 300 μM de [6]-G, a forma de 116-kDa da PARP foi fragmentada em 89-kDa, confirmando uma apoptose mediada por caspase (RADHAKRISHNAN et al., 2014).

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram a capacidade antitumoral do [6]-G, por induzir citotoxicidade ao reduzir a viabilidade celular e limitar do IDN e IDNC em S-180, bem como, aumento da genotoxicidade nas concentração de 5, 10, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os efeitos genotóxicos foram associados especialmente a geração de EROs com similaridade aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio. Esses danos indicativos de instabilidade genética possivelmente não foram reparados, pois o [6]-G induziu alterações nucleares do tipo pontes nucleoplásmicas e brotos nucleares, que culminaram em apoptose, como observado pelo aumento significativo de apoptoses, especialmente nas duas maiores concentrações testadas. Os resultados apontam que o [6]-G tem efeitos antitumorais por mecanismos citogenéticos com indução de apoptose, sugerindo que a substância tem potencial antitumoral e pode ser usado em formulações para a terapia oncológica, após a aplicação de outros biomarcadores antitumorais.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Declaração ética

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Brasil, com número de protocolo: 167/16.

Agradecimentos

Agradecemos à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) e Universidade Federal do Piauí (UFPI), por fornecerem as instalações para realização do estudo, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFPI) – CAPES/IFPI.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDROV, L. B.; STRATTON, M. R. Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. **Current opinion in genetics & development**, v. 24, p. 52-60, 2014.
- BAKHOUM, SAMUEL F.; CANTLEY, LEWIS C. The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. **Cell**, v. 174, n. 6, p. 1347-1360, 2018.
- BEG, T.; SIDDIQUE, Y. H.; ARA, G.; GUPTA, J.; AFZAL, M. Antigenotoxic Effect of Genistein and gingerol on genotoxicity induced by norethandrolone and oxandrolone in cultured human lymphocytes. **International Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 177-183, 2008.
- BERNARD, Megan M.; MCCONNERY, Jason R.; HOSKIN, David W. [10]-Gingerol, a major phenolic constituent of ginger root, induces cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Experimental and molecular pathology**, v. 102, n. 2, p. 370-376, 2017.
- CHAKRABORTY, D., BISHAYEE, K., GHOSH, S., BISWAS, R., MANDAL, S. K., & KHUDA-BUKHSI, A. R. [6]-Gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in cancer cells: drug-DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells. **European journal of pharmacology**, v. 694, n. 1-3, p. 20-29, 2012.
- CHANG, W. S.; CHANG, Y. H.; LU, F. J.; CHIANG, H. C. Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. **Anticancer research**, v. 14, n. 2A, p. 501-506, 1994.
- CHEN, Z.; LIU, X.; MA, S. The roles of mitochondria in autophagic cell death. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 31, n. 8, p. 269-276, 2016.
- CORNÉLIO, D. A., TAVARES, J. C. M., PIMENTEL, T. V. C. D. A., CAVALCANTI JR, G. B., & BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Cytokinesis-block micronucleus assay adapted for analyzing genomic instability of human mesenchymal stem cells. **Stem cells and development**, v. 23, n. 8, p. 823-838, 2013.
- CRASTA, K.; GANEM, N. J.; DAGHER, R.; LANTERMANN, A. B.; IVANOVA, E. V.; PAN, Y.; PELLMAN, D. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. **Nature**, v. 482, n. 7383, p. 53, 2012.
- ELENA-REAL, C. A.; DÍAZ-QUINTANA, A.; GONZÁLEZ-ARZOLA, K.; VELÁZQUEZ-CAMPOY, A.; ORZÁEZ, M.; LÓPEZ-RIVAS, A.; DÍAZ-MORENO, I. Cytochrome c speeds up caspase cascade activation by blocking 14-3-3ε-dependent Apaf-1 inhibition. **Cell death & disease**, v. 9, n. 3, p. 365, 2018.
- FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLS, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FERGUSON, L. R.; CHEN, H.; COLLINS, A. R.; CONNELL, M.; DAMIA, G.; DASGUPTA, S.; ASHRAF, S. S. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2015. p. S5-S24.

FERRARI, S. M.; BOCCI, G.; DI DESIDERO, T.; ELIA, G.; RUFFILLI, I. RAGUSA, F.; LA MOTTA, C. Lenvatinib exhibits antineoplastic activity in anaplastic thyroid cancer in vitro and in vivo. **Oncology reports**, v. 39, n. 5, p. 2225-2234, 2018.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GOODMAN, M. F.; WOODGATE, R. Translesion DNA polymerases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. a010363, 2013.

GUICCIARDI, M. E.; MIYOSHI, H.; BRONK, S. F.; GORES, G. J. Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor- α -mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications. **The American journal of pathology**, v. 159, n. 6, p. 2045-2054, 2001.

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

HUNKE, M.; MARTINEZ, W.; KASHYAP, A.; BOKOSKIE, T.; PATTABIRAMAN, M.; CHANDRA, S. Antineoplastic Actions of Cinnamic Acids and Their Dimers in Breast Cancer Cells: A Comparative Study. **Anticancer research**, v. 38, n. 8, p. 4469-4474, 2018.

IDOLO, A.; GRASSI, T.; BAGORDO, F.; PANICO, A.; DE GIORGI, M.; SERIO, F.; DE DONNO, A. Micronuclei in Exfoliated Buccal Cells of Children Living in a Cluster Area of Salento (Southern Italy) with a High Incidence of Lung Cancer: The IMP. AIR Study. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 8, p. 1659, 2018.

IMPHENG, H.; RICHERT, L.; PEKTHONG, D.; SCHOLFIELD, C. N.; PONGCHAROEN, S.; PUNGPETCHARA, I.; SRISAWANG, P. [6]-Gingerol inhibits de novo fatty acid synthesis and carnitine palmitoyltransferase-1 activity which triggers apoptosis in HepG2. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 4, p. 1319, 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128p.

JU, S. A.; PARK, S. M.; LEE, Y. S.; BAE, J. H.; YU, R.; SUH, J.; KIM, B. S. Administration of 6-gingerol greatly enhances the number of tumor-infiltrating lymphocytes in murine tumors. **International journal of cancer**, v. 130, p. 2618-28, 2012.

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.

- KARIMZADEH, S.; HOSSEINKHANI, S.; FATHI, A.; ATAEL, F.; BAHARVAND, H. Insufficient Apaf-1 expression in early stages of neural differentiation of human embryonic stem cells might protect them from apoptosis. **European journal of cell biology**, v. 97, n. 2, p. 126-135, 2018.
- KEMP, C. J. Animal models of chemical carcinogenesis: driving breakthroughs in cancer research for 100 years. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2015, n. 10, p. pdb. top069906, 2015.
- KIM, S. O.; KIM, M. R. [6]-gingerol prevents disassembly of cell junctions and activities of MMPs in invasive human pancreas cancer cells through ERK/NF- κ B/snail signal transduction pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- KING, A. A.; SHAUGHNESSY, D. T.; MURE, K.; LESZCZYNSKA, J.; WARD, W. O.; UMBACH, D. M.; KLEIN, C. B. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 616, n. 1, p. 60-69, 2007.
- KUMARA, M.; SHYLAJAB, M. R.; NAZEEMC, P. A.; BABU, T. 6-Gingerol is the most potent anticancerous compound in ginger (*Zingiber officinale* Rosc). **Journal of Developing Drugs**, v. 6, p. 167. 2017.
- LEE, D.-H.; KIMB, D.-W.; JUNG, C.-H.; LEEA, Y. J.; PARK, D. Gingerol sensitizes TRAIL-induced apoptotic cell death of glioblastoma cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 279, n. 3, p. 253-265, 2014.
- LEE, S. H.; CEKANOVA, M.; BAEK, S. J. Multiple mechanisms are involved in 6-gingerol-induced cell growth arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells. **Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center**, v. 47, n. 3, p. 197-208, 2008.
- LIN, C. B.; LIN, C. C.; TSAY, G. J. 6-Gingerol inhibits growth of colon cancer cell LoVo via induction of G2/M arrest. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- LINDBERG, H. K.; WANG, X.; JÄRVENTAU, H.; FALCK, G. C. M.; NORPPA, H.; FENECH, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 617, n. 1, p. 33-45, 2007.
- MACKENZIE, K. J.; CARROLL, P.; MARTIN, C. A.; MURINA, O.; FLUTEAU, A.; SIMPSON, D. J.; OSBORN, R. T. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. **Nature**, v. 548, n. 7668, p. 461, 2017.
- MALLICK, S.; BARUA, A.; PAUL, G.; BANERJEE, S. N. Novel combination of 2-methoxyestradiol and cyclophosphamide enhances the antineoplastic and pro-apoptotic effects on S-180 ascitic tumour cells. **Journal of cell communication and signaling**, v. 12, n. 2, p. 467-478, 2018.

MANSILLA, S.; BATALLER, M.; PORTUGAL, J. A nuclear budding mechanism in transiently arrested cells generates drug-sensitive and drug-resistant cells. **Biochemical pharmacology**, v. 78, n. 2, p. 123-132, 2009.

MARINO-ENRIQUEZ, A. Advances in the Molecular Analysis of Soft Tissue Tumors and Clinical Implications. **Surgical Pathology Clinics**, v. 8, n.3, pp. 525-537, 2015.

MARIÑO-ENRÍQUEZ, A.; BOVÉE, J.V. Molecular Pathogenesis and Diagnostic, Prognostic and Predictive Molecular Markers in Sarcoma. **Surgical Pathology Clinics**, v. 9, n.3, pp. 457-473, 2016.

MARTINS, W. K.; COSTA, É. T.; CRUZ, M. C.; STOLF, B. S.; MIOTTO, R.; CORDEIRO, R. M.; BAPTISTA, M. S. Parallel damage in mitochondrial and lysosomal compartments promotes efficient cell death with autophagy: The case of the pentacyclic triterpenoids. **Scientific reports**, v. 5, p. 12425, 2015.

MILIC, M; ROZGAJ, R; KASUBA, V; JAZBEC, A. M; STARCEVIC, B; LYZBICKI, B; RAVEGNINI, G; ZENESINI, C; MUSTI, M; HRELIA, P; ANGELINI, S. Polymorphisms in DNA repair genes: CBMN cytome assay in workers chronically exposed to low doses of ionising radiation. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 66, n. 2, p. 109-120, 2015.

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.

MORGANELLA, S.; ALEXANDROV, L. B.; GLODZIK, D.; ZOU, X.; DAVIES, H.; STAAF, J.; BUTLER, A. The topography of mutational processes in breast cancer genomes. **Nature communications**, v. 7, p. 11383, 2016.

MORAES, M.C.; NETO, J.B.; MENCK, C.F. DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n.17, pp. 1362-1388, 2012.

MUGGIA, F.; KUDLOWITZ, D. Novel taxanes. **Anticancer Drugs**, v. 25, n. 1, pp. 593-598, 2014.

NAKANISHI, H.; WU, Z. Microglia-aging: roles of microglial lysosome-and mitochondria-derived reactive oxygen species in brain aging. **Behavioural brain research**, v. 201, n. 1, p. 1-7, 2009.

NIK-ZAINAL, S.; DAVIES, H.; STAAF, J.; RAMAKRISHNA, M.; GLODZIK, D.; ZOU, X.; VAN LOO, P. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. **Nature**, v. 534, n. 7605, p. 47, 2016.

NOTTA, F.; CHAN-SENG-YUE, M.; LEMIRE, M.; LI, Y.; WILSON, G. W.; CONNOR, A. A.; WANG, T. A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. **Nature**, v. 538, n. 7625, p. 378, 2016.

OLIVEIRA, P. J.; BJORK, J. A.; SANTOS, M. S.; LEINO, R. L.; FROBERG, M. K.; MORENO, A. J.; WALLACE, K. B. Carvedilol-mediated antioxidant protection against

doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 200, n. 2, p. 159-168, 2004.

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

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug discovery today**, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016.

PRATHEESHKUMAR, P.; SREEKALA, C.; ZHANG, Z.; BUDHRAJA, A.; DING, S.; SON, Y. O.; WANG, X.; HITRON, A.; HYUN-JUNG, K.; WANG, L.; LEE, J. C.; SHI, X. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1159-1184, 2012.

PLOTEGHER, N.; DUCHEN, M. R. Mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in lysosomal storage disorders. **Trends in molecular medicine**, v. 23, n. 2, p. 116-134, 2017.

POTAPOVA, T. A.; ZHU, J; LI, R. Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 3-4, p. 377-389, 2013.

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.

RADHAKRISHNAN, E.; BAVA, S.V.; NARAYANAN, S. S.; NATH, L. R.; THULASIDASAN, A. K. T.; SONIYA, E.V. [6]-Gingerol induces caspase-dependent apoptosis and prevents PMA-induced proliferation in colon cancer cells by inhibiting MAPK/AP-1 signaling. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104401, 2014.

RASTOGI, N.; GARA, R. K.; TRIVEDI, R.; SINGH, A.; DIXIT, P.; MAURYA, R.; MISHRA, D. P. (6)-Gingerol-induced myeloid leukemia cell death is initiated by reactive oxygen species and activation of miR-27b expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 288-301, 2014.

RASTOGI N.; DUGGAL S.; SINGH S. K.; PORWAL K.; SRIVASTAVA V. K.; MAURYA R.; BHATT M. L. B.; MISHRA D. P. Proteasome inhibition mediates p53 reactivation and anti-cancer activity of 6-Gingerol in cervical cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43310, 2015.

SCHIMMEL, K. J.; RICHEL, D. J.; VAN DEN BRINK, R. B.; GUCHELAAR, H. J. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. **Cancer treatment reviews**, v. 30, n. 2, p. 181-191, 2004.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**. 2004; 10(10):308-13.

SERUGA, B.; SADIKOV, A.; CAZAP, E.L.; DELGADO, L.B.; DIGUMARTI, R.; LEIGHL, N.B.; MESHREF, M.M. Barriers and challenges to global clinical cancer research. **The Oncologist**, v. 19, n. 1, pp. 61-67, 2014.

SHANMUGAM, M. K., WARRIER, S., KUMAR, A. P., SETHI, G., ARFUSO, F. Potential Role of Natural Compounds as Anti-Angiogenic Agents in Cancer. **Current vascular pharmacology**, v. 15, n. 6, p. 503-519, 2017.

SHUKLA, Y.; SINGH, M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 5, p. 683-690, 2007.

SISENANDO, H. A.; DE MEDEIROS, S. R. B.; SALDIVA, P. H.; ARTAXO, P.; HACON, S. S. Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by *Tradescantia* micronucleus bioassay: a toxicity assessment study. **Environmental Health**, v. 10, n. 1, p. 41, 2011.

TAMURA, R.; TAKADA, M.; SAKAUE, M.; YOSHIDA, A.; OHI, S.; HIRANO, K.; CHIBA, K. Starfish Apaf-1 activates effector caspase-3/9 upon apoptosis of aged eggs. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1611, 2018.

TANG, Z.; YANG, J.; WANG, X.; ZENG, M.; WANG, J.; WANG, A.; CHEN, J. Active DNA end processing in micronuclei of ovarian cancer cells. **BioMed Central Cancer**, v. 18, n. 1, p. 426, 2018.

TAYLOR, B. S.; BARRETINA, J.; MAKI, R. G.; ANTONESCU, C. R.; SINGER, S.; LADANYI, M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 8, p. 541-57, 2011.

TSUBONE, T. M.; MARTINS, W. K.; PAVANI, C.; JUNQUEIRA, H. C.; ITRI, R.; BAPTISTA, M. S. Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 6734, 2017.

TUBBS, A.; NUSSENZWEIG, A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 644-656, 2017.

VANDAMME, T. F. Rodent models for human diseases. **European journal of pharmacology**, v. 759, p. 84-89, 2015.

WALLACE, Kendall B. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. **Pharmacology & toxicology**, v. 93, n. 3, p. 105-115, 2003.

WANG, C. C.; CHEN, L. G.; LEE, L. T.; YANG, L. L. Effects of 6-gingerol, an antioxidant from ginger, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 17, n. 6, p. 641-645, 2003.

YANG, G.; WANG, S.; ZHONG, L.; DONG, X.; ZHANG, W.; JIANG, L.; MA, Y. 6-Gingerol induces apoptosis through lysosomal-mitochondrial axis in human hepatoma G2 cells. **Phytotherapy research**, v. 26, n. 11, p. 1667-1673, 2012.

YANG, G.; ZHONG, L.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; SUN, X.; MA, Y. Genotoxic effect of 6-gingerol on human hepatoma G2 cells. **Chemico-biological interactions**, v. 185, n. 1, p. 12-17, 2010.

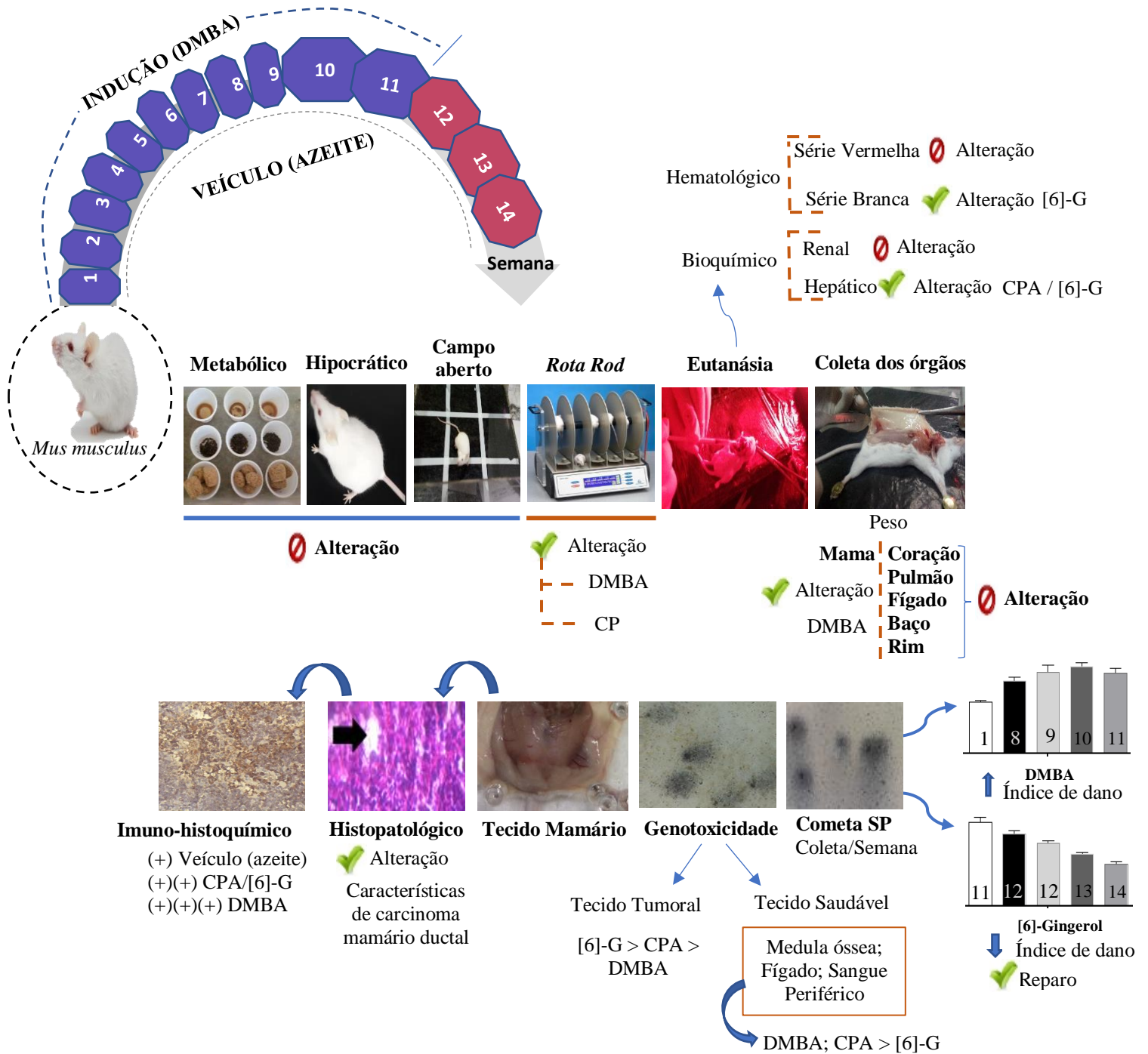
YANG, G.; ZHONG, L.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; SUN, X.; MA, Y. 6-Gingerol Prevents Patulin-induced Genotoxicity in HepG2 Cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 10, p. 1480-1485, 2011.

ZEIGER, E. Illusions of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 191-194, 2003.

ZHANG, F.; ZHU, X.; GONG, J.; SUN, Y.; CHEN, D.; WANG, J.; LI, W. Lysosome–mitochondria-mediated apoptosis specifically evoked in cancer cells induced by gold nanorods. **Nanomedicine**, v. 11, n. 15, p. 1993-2006, 2016.

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

CAPÍTULO 4



Efeitos antitumorais do [6]-Gingerol em carcinoma mamário induzido com 7,12-dimetilbenzantraceno, em camundongos fêmeas

Antitumor effects of [6]-Gingerol in mammary carcinoma induced with 7,12-dimethylbenzanthracene, in female mice

Rosália Maria Tôrres de Lima, Antonielly Campinho dos Reis, José Victor de Oliveira Santos, José Williams Gomes de Oliveira Filho, Leane Brunelle dos Santos Alves, Ag-Anne Pereira Melo de Menezes, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Gilberto Santos Cerqueira, Muhammad Torequl Islam, Luciano da Silva Lopes, João Marcelo de Castro e Sousa, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Artigo submetido ao periódico

Journal of Pharmacy and Pharmacology (ANEXO D)

QUALIS B1 – Biotecnologia

Resumo

Evidências científicas sugerem que extratos e substâncias químicas isoladas do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) apresentam atividades farmacológicas como antiproliferativa, anti-invasiva, antitumoral e anti-inflamatória. Apesar da eficácia dos antineoplásicos, estudos apontam seletividade reduzida, efeitos colaterais e riscos de instabilidade genética em células normais. O estudo avaliou o efeito antitumoral do [6]-Gingerol((S)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-decanona) em murinos com carcinoma mamário, induzido por 7,12-dimetilbenzantraceno, com aplicação de marcadores toxicogenéticos. Três grupos de camundongos fêmeas (n=5), não gestantes, foram submetidas à indução do câncer de mama, durante 11 semanas com o 7,12-dimetilbenzantraceno (6 mg.kg⁻¹, v.o.), e terapias com [6]-Gingerol (10 mg.kg⁻¹, v.o.) e ciclofosfamida (25 mg.kg⁻¹, i.p.), por 3 semanas. A confirmação do carcinoma mamário foi realizada por análises histopatológica e imuno-histoquímica para o Ki-67. O grupo controle foi tratado com azeite de oliva (10 mL.kg⁻¹, v.o.). Não foram observadas alterações hipocráticas e comportamentais durante a terapia como o [6]-Gingerol. A substância não induziu alterações hematológicas na série vermelha, no entanto, induziu aumento de eosinófilos, como também alterações hepáticas, sendo observado aumento significativo de alanina aminotransferase, contudo, verificou-se ausência de alterações renais (ureia e creatinina). Mecanismos citogenéticos indicativos de genotoxicidade foram observados pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA, especialmente para o tecido mamário. Em sangue periférico, os danos ao DNA foram reparados, de forma contrária ao observado para ciclofosfamida. Efeitos antitumorais foram observados pelo aumento de apoptoses na mama, com menos evidências em células não neoplásicas, em comparação a ciclofosfamida. Os mecanismos citogenéticos estão envolvidos nos efeitos antitumorais do [6]-Gingerol, mas novos testes devem ser realizados para o seu uso na terapia do câncer.

Palavras-chave: [6]-Gingerol, câncer de mama, ensaio cometa, apoptose.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna mais diagnosticada e a principal causa de mortalidade por câncer no Brasil para o sexo feminino (INCA, 2017), representa a segunda maior taxa de mortalidade entre mulheres americanas (SIEGEL et al., 2017), cerca de 41% das pacientes diagnosticadas em idade acima dos 65 anos (BRAITHWAITE; DEMB; HENDERSON, 2016). Para o Brasil, estimam-se 59.700 casos novos de CM, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco previsto de 56.33 ocorrências a cada 100 mil mulheres (INCA, 2017). O CM é um problema de saúde global que afeta mulheres e, em menor proporção, homens (FERLAY et al., 2013) e apresenta impacto social que não pode ser negligenciado, uma vez que aproximadamente 15 mil mortes são causadas no Brasil a cada ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Pacientes diagnosticadas com CM recebem tratamento multimodal, que envolve modalidades padronizadas, como cirurgia, radioterapia e terapia medicamentosa, esta última consiste geralmente em terapia hormonal e quimioterapia, que depende principalmente da morte de células cancerígenas por compostos citotóxicos (AKRAM et al., 2017; ELLIS et al., 2017; GREENLEE et al., 2017; MASOUD; PAGÈS, 2017). Apesar das amplas opções terapêuticas, os tratamentos do CM produzem muitos efeitos colaterais, que impactam diretamente na qualidade de vida e no sucesso do tratamento (NOUNOU et al., 2015; ACS, 2016). Assim, faz-se necessário a busca por químicos isolados ou combinados que reduzam os efeitos colaterais (PERINI et al., 2018), sobretudo, de compostos citotóxicos, uma vez que, células normais também são afetadas (SINGH et al., 2016).

As plantas terrestres são promissoras na terapêutica do câncer, devido a muitos fitoquímicos que podem atuar seletivamente em células cancerígenas (SINGH et al., 2016; KAUR et al., 2018) por bloquear a conversão metabólica do pró-carcinogênico, além de modular eventos celulares e de sinalização envolvidos no crescimento, invasão e metástase de células cancerígenas (SINGH et al., 2016; EFFERTH et al., 2017; OCHWANG'I et al., 2018). Especiarias e seus constituintes bioativos, como os gingeróis presentes no rizoma do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) apresentam ação anticancerígena em tumores mamários (LI et al., 2017). O [6]-Gingerol é a substância majoritária encontrado no rizoma (CHANG et al., 2015), ao qual são reportadas ações benéficas frente à eventos neoplásicos (JU et al., 2012).

Estudos pré-clínicos e clínicos concentraram-se no desenvolvimento de terapias eficazes para pacientes com CM (SLETTA et al., 2017), o modelo de carcinogênese mamária induzida quimicamente por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é importante na avaliação de agentes

quimioterápicos (KEMP, 2015; ABBA et al., 2016). O DMBA é um carcinógeno indireto que requer ativação metabólica prévia por enzimas do citocromo P450 (CYP1A1 e CYP1B1) (ALVARADO et al., 2017), para formar o metabólito dihidrodiolepóxido (LÍŠKA et al., 2011), como iniciador tumoral em animais (MIYATA et al., 2001; WIJNHOVEN et al., 2001) com semelhanças as observadas no câncer humano (MIYATA, 2001).

Métodos combinados para avaliar a atividade mutagênica e genotóxica de compostos naturais são de extrema importância, uma vez que permite a análise de vários órgãos no mesmo animal, além de avaliar diferentes parâmetros genéticos (ROTHFUSS et al., 2011). O ensaio cometa demonstra capacidade para medir danos ao DNA (VASQUEZ, 2012), reparo (COLLINS et al., 2009), e efeitos pró-oxidantes de vários compostos endógenos e exógenos (ANDERSON; PHILLIPS, 1999) em tecidos sob condições fisiológicas normais ou tumorais. Dessa forma, o estudo teve por objetivo avaliar os possíveis efeitos antitumorais do [6]-G, em modelo animal para carcinoma mamário induzido quimicamente por DMBA, identificado por análises histopatológicas e imuno-histoquímica, com aplicação de marcadores citogenéticos e monitoramento de alterações metabólicas, comportamentais, bioquímicas, hematológicas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Produtos químicos e preparação das amostras

A substância isolada [6]-Gingerol ([6]-G) ($C_{17}H_{26}O_4$) (PubChem CID: 442793) grau de pureza $\geq 98\%$ (HPLC), foi adquirido por meio da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), assim como os demais produtos químicos e reagentes necessários para a realização deste estudo. A substância isolada [6]-G foi solubilizada em DMSO a 10% e diluído em água destilada estéril até atingir a dose final de 10 mg.Kg^{-1} , sendo posteriormente utilizado no teste *in vivo*, administrado oralmente em camundongos. A dose foi escolhida com base em estudos prévios *in vitro* e *ex vivo* sobre efeitos tóxicos e citogenéticos em linhagens tumorais e Sarcoma 180 de murinos (dados não mostrados). O DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em azeite de oliva, e administrado oralmente na dose de 6 mg/kg/semana segundo DE ALENCAR et al. (2018).

2.2 Análise cromatográfica do padrão sigma [6]-G

O composto padrão [6]-G foi analisado por técnicas acopladas como HPLC-DAD, LC-MS. Para o análise preparou-se uma solução de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol 95% do padrão. A análise por HPLC-DAD foi realizada em cromatógrafo de alta eficiência (CLAE), SHIMADZU®, modelo LC-20 A. Controlador CBM-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M20, coluna C18 Phenomenex Luna, 5 μm (250 x 4,60 mm) em gradiente MeOH:H₂O (5-100% MeOH).

Os espectros de LC-HRESIMS foram obtidos utilizando um sistema Thermo Instruments MS (LTQ XL / LTQ Orbitrap Discovery) acoplado a um sistema de HPLC Thermo Instruments (detector Accela PDA, amostrador automático Accla PDA e bomba Accela). Foram utilizadas as seguintes condições: tensão capilar 45 V, temperatura capilar 250 °C, taxa de fluxo de gás auxiliar 10-20 unidades arbitrárias, taxa de fluxo do gás da bainha 40-50 unidades arbitrárias, voltagem de pulverização 4,5 kV, faixa de massa 100-2000 amu (resolução máxima 30000). O sistema de HPLC foi executado usando uma coluna C18 analítica SunFire (5 μm , 100 Å, 4,6 × 150 mm), com um gradiente de 0,1% de ácido fórmico em H₂O: ácido fórmico 0,1% em MeOH 0 - 100% em 30 min, com uma taxa de fluxo 1 mL.min⁻¹.

2.3 Animais

Os animais utilizados no estudo foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias – CCA, da Universidade Federal do Piauí. Para o monitoramento toxicogenético do DMBA, camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, da linhagem *Swiss*, albinos, com 6 a 7 semanas de idade, não gestantes e pesando entre 20 a 30 g, foram submetidas a aclimação por uma semana, sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, e um ciclo de 12 horas claro/escuro, com livre acesso a ração tipo *pellets* (Purina®) e água. Os animais foram segmentados nos grupos: (1) Veículo (azeite de oliva 10 mL.kg⁻¹, v.o.); (2) DMBA (6 mg.kg⁻¹, v.o.); (3) [6] -G (10 mg.kg⁻¹, v.o.) e (4) ciclofosfamida (CPA) (25 mg.kg⁻¹, i.p.). O guia de teste sobre toxicologia genética da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD n°489, 2014) foi utilizado para estabelecer a quantidade de animais, todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (#167/16, ANEXO E).

2.4 Indução química do câncer de mama *in vivo* com o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA)

Os animais foram separados em quatro grupos. O grupo 1 (n = 5), recebeu tratamento com azeite de oliva (10 mL.kg⁻¹, v.o.) por 14 semanas; sendo os demais grupos expostos ao DMBA (6 mg.kg⁻¹, v.o.), por 11 semanas. Os animais de todos os grupos foram pesados semanalmente e a dose individual calculada baseada no peso (BARROS et al., 2013). A formação do tumor foi monitorada durante 11 semanas, por apalpações físicas e mensuração do diâmetro com o uso de um paquímetro digital. Após a detecção do tumor mamário, 2 grupos (n=5), tiveram a administração com DMBA interrompida e receberam terapia com [6]-G (10 mg.kg⁻¹, v.o.) e CPA (25 mg.kg⁻¹, i.p.), respectivamente, por 3 semanas. Ambas as linhas mamárias foram dissecadas e submetidas à necropsia completa, após o tratamento dos animais, para avaliação macro e microscópica de neoplasias primárias. O produto das ressecções mamárias e da necropsia foram encaminhados para exame macroscópico (com especial atenção à determinação das dimensões e alterações à superfície de corte das peças), fixação em formalina 10% tamponada e processamento histotécnico automático.

2.5 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica para Ki-67

Os fragmentos de tecido mamário, para avaliação histopatológica, foram fixados em formaldeído a 3,5% em tampão fosfato (pH 7,6), adicionando solução de sacarose a 1% e armazenados durante 12h a 4°C, até à 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 foi submetido a imersão em xileno PA e lavados duas vezes em parafina, antes da formação dos blocos em parafina (BEHMER; TOLOSA; NETO, 1976). Os blocos foram seccionados (4 µM) em micrótomo e as secções distendidas em lâminas. Posteriormente, as secções distendidas foram desparafinizadas em três banhos sucessivos de xileno PA e desidratadas em diluições decrescentes de etanol, conforme supracitado, as lâminas seguiram para coloração com hematoxilina e eosina (ELGENGAIHI et al., 2016) onde, após lavagem e secagem, as lâminas foram cobertas por lamínulas com auxílio de bálsamo do Canadá.

A partir dos blocos confeccionados secções de 3 µm foram preparadas, conforme ensaio histopatológico supracitado. Após a desparafinação, a recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH 6,0), por 20 minutos a 95°C. A peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de H₂O₂, durante 10 minutos, para reduzir a ligação não específica. Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpo primário, Ki-67 (MIB-1, Dako), diluídos em diluente de

anticorpo por 1h. Os locais de ligação ao anticorpo foram visualizados pela incubação com solução de diaminobenzidina-H₂O₂ (DAB, Dako). Uma secção de tecido normal (mama do grupo tratado com azeite) foi utilizada como controle. A imunorreacção foi analisada semiquantitativamente nos tratamentos em triplicata, de acordo com os critérios estabelecidos por VAN SLOOTEN et al. (1996), considerando a intensidade da coloração nuclear de 400 células, analisadas em microscópio (LEICA, S9APO), de acordo com o seguinte *score*: 0-25% de células marcadas (leve, +), 25-75% (moderada, ++) ou 75-100% (expressiva, +++) (DE ALENCAR et al., 2018). Em todos os casos, a coloração acastanhada nuclear foi adotada como padrão para positividade da imunorreacção (LI et al., 2015).

2.6 Monitoramento toxicológico durante a indução do carcinoma mamário e tratamento com [6]-G

2.6.1 Análise metabólica e hipocrática

Para a investigação metabólica os animais da linhagem *Swiss*, albinos com seis a sete semanas de idade e pesando entre 25 a 30 g de todos os grupos (1) azeite (10 mL.kg⁻¹), (2) DMBA (6 µg. Kg⁻¹), (3) CPA (25 mg.Kg⁻¹) e (4) [6]-G (10 mg.Kg⁻¹), foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas de aço inoxidável (32 x 25 x 36,5 cm), durante 14 semanas. Os animais receberam de forma livre ração e H₂O filtrada. Para estimar a taxa metabólica, a quantidade de ração ingerida, água consumida, micção e defecação foram medidos 3 vezes por semana. Durante as semanas de tratamento, os animais experimentais foram monitorados quanto às possíveis alterações da atividade geral, frênto vocal, irritabilidade, resposta ao toque, contorção, reflexo de endireitamento, tônus muscular, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, calda em *straub*, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte, 30 minutos e 1h após administração semanal das substâncias.

2.6.2 Campo aberto

Na avaliação do campo aberto foi utilizada 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), na qual, após 30 minutos e 1h de cada administração, cada animal

foi colocado individualmente no aparato, sendo avaliado o número de cruzamentos com as quatro patas pelas divisões no piso do aparato (atividade locomotora espontânea), frequência do comportamento de autolimpeza e número de levantamentos das patas dianteiras, sem apoiar-se nas paredes do aparato. Após cada avaliação individual, foi realizada a assepsia do equipamento com álcool 70%. O campo aberto foi realizado semanalmente.

2.6.3 *Rota rod*

A avaliação da coordenação motora e relaxamento muscular dos animais após a administração dos compostos foi realizada pelo teste *rota rod*, onde, após o intervalo de 5 minutos dos animais serem testados no campo aberto, estes foram submetidos ao *rota rod*. Os camundongos foram colocados com as quatro patas numa barra cilíndrica giratória, de aço inoxidável, com 25 mm de diâmetro, a uma velocidade de rotação de 17 rpm, por um período de 3 min. O tempo de permanência na barra em segundos (TP), e o número de quedas (NQ), foram mensurados em triplicata (MACHADO et al., 2015). O *rota rod* também foi repetido a cada semana.

2.6.4 Eutanásia e coleta dos órgãos

Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados por sobredose de solução anestésica (pentobarbital sódico + xilazina [1:1], i.p.). O coração, pulmão, fígado, baço e rim foram imediatamente separados em caixa de gelo. Os órgãos foram lavados com solução tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4), pesados, encaminhados para avaliação genotóxica, mutagênica e conservados em solução de formalina a 10%, por 24h para posterior manutenção em solução de álcool 70%.

2.6.5 Análise hematológica e bioquímica

Na avaliação hematológica, o número de eritrócitos, teor de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram determinados como séries vermelhas, enquanto que o número de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos em séries brancas, e plaquetas, a análise foi realizada em aparelho hematológico automático (Advia 120/*HematologySiemens*). Na análise bioquímica, o sangue proveniente da pulsão cardíaca foi

colhido logo após eutanásia dos animais, e centrifugado a 4000 x g, durante 5 min (a 4°C). O plasma foi submetido a uma análise bioquímica automática, em aparelho Labmax 240, com kits comerciais Labtest®, para os parâmetros de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

2.7 Avaliação citogenética em modelo *in vivo* de carcinoma mamário induzido quimicamente por DMBA e tratamento com [6]-G

2.7.1 Ensaio cometa em diferentes tecidos (sangue periférico caudal, fígado, medula óssea e mama direita)

Procedeu-se o ensaio cometa na versão alcalina conforme descrito por SPEIT; HARTMANN (2005). Alíquotas de 10 µL de sangue periférico caudal dos camundongos foram coletadas durante a 1^a, 8^a, 9^a, 10^a e 11^a semanas de tratamento com DMBA e de forma contínua na 12^a, 13^a e 14^a semana de terapia nos grupos [6]-G e CPA. Em seguida, foram homogeneizados com agarose low melting point 0,75% (90 µL), o material foi espalhado sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%. Além disso, alíquotas de 10 µL do macerado dos tecidos fígado, medula óssea e mama direita foram processados conforme supracitado. As lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso), por até 72 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH > 13), por 20 minutos e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0.90 V/cm), por 15 minutos em cuba de eletroforese. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com nitrato de prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi calculado por meio da fórmula: $ID = \sum (\text{número de células em determinada classe de dano} \times \text{classe de dano})$, que variou de 0 a 400; e FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - \text{n}^\circ \text{ de células classe } 0$.

2.8 Análise estatística

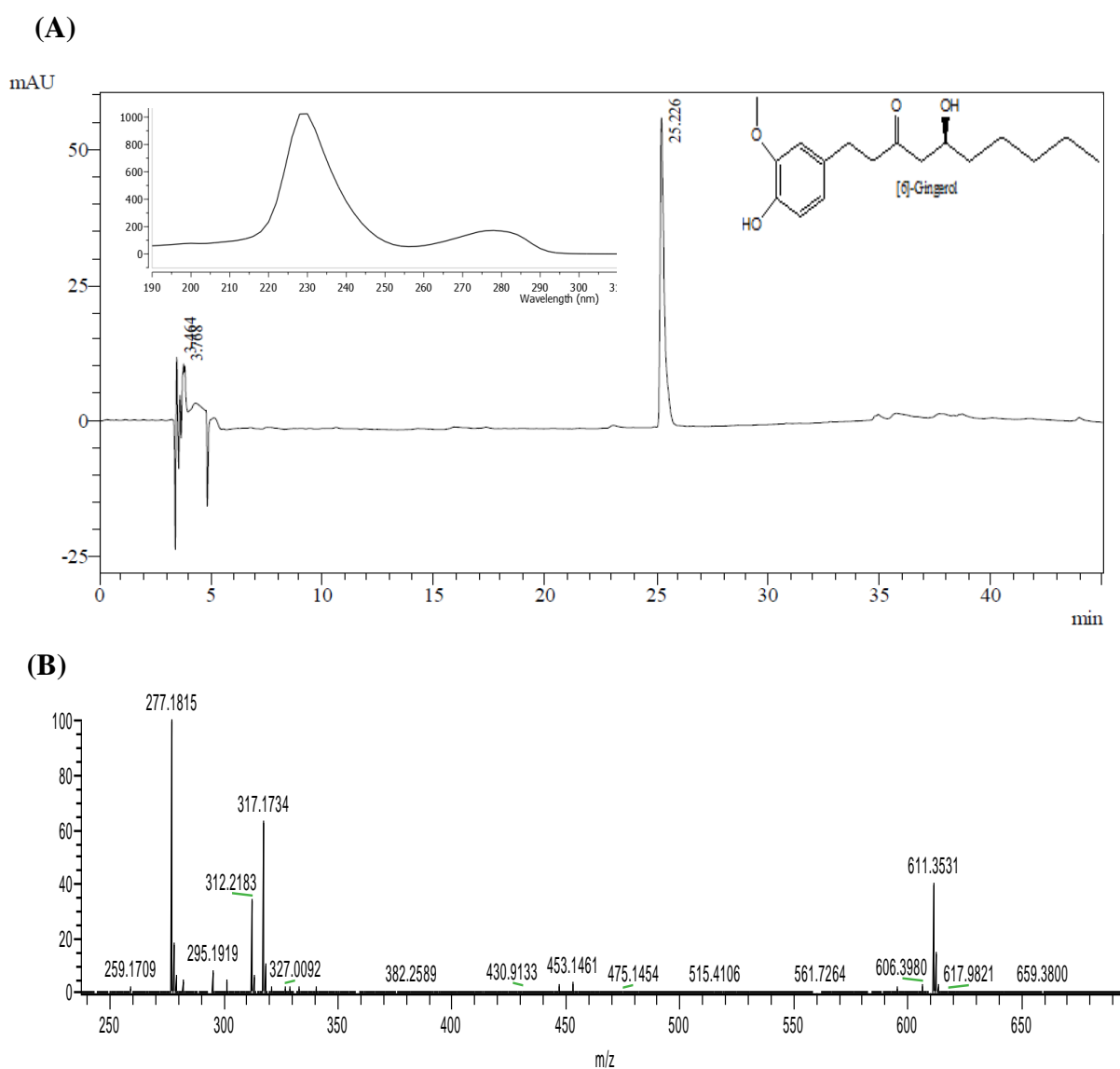
A fim de determinar as diferenças entre os tratamentos, dados expressos como a média \pm desvio padrão foram comparados por análise de variância (ANOVA), de duas vias, seguido pelo teste de *Tukey* e *T* de *Student* (considerando valores de $p < 0,05$ significantes), por meio do programa *GraphPad Prism*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

3 RESULTADOS

3.1 Confirmação do padrão [6]-G por HPLC-UV e HPLC-ES-MS

O cromatograma do HPLC-UV e o espectro de massas HRESI-MS são apresentados nas **Figuras 1A e 1B**, respectivamente. O pico em 25.22 minutos mostrou UV do gingerol tendo absorção máxima de UV em 279 nm e um ombro em 230 nm. A molécula protonada $[M+H]^+$ apresentou íon em m/z 295.1919, íon aducto $[M+Na]^+$ em 317.1734 e um íon dímero sodiado $[2M+Na]^+$ em m/z 611.3531 identificado como [6]-G.

Figura 1 - Cromatograma no modo analítico em gradiente linear em 254 nm e espectro de UV do padrão [6]-G (A), espectro de massas do [6]-G (B).



3.2 Monitoramento comportamental (atividade motora), metabólico e peso de órgãos

Não foram observadas alterações na atividade locomotora espontânea, bem como autolimpeza e levantamentos no grupo veículo (azeite de oliva -10 mL.Kg⁻¹), cabe enfatizar que o azeite de oliva foi utilizado para diluir e veicular o DMBA nos camundongos. Durante as 11 semanas para a indução do câncer de mama empregando o DMBA, verificou-se alterações pontuais nos parâmetros comportamentais, especificamente no rota rod, pela redução do tempo de permanência na barra giratória na 5^a e 11^a semana, assim como aumento significativo do número de quedas na 11^a semana, quando comparado com o grupo veículo (azeite) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Avaliação comportamental e atividade locomotora de camundongos fêmeas, durante 14 semanas de tratamento com azeite, 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e terapias químicas com ciclofosfamida (CPA) e [6]-G.

Grupos e semanas de tratamento	Parâmetros comportamentais e atividade locomotora					
	Campo aberto			Rota rod		
	Cruzamento	Autolimpeza	Levantamento	TP (s)	NQ	
Veículo (Azeite) 10 mL.kg ⁻¹	S 1	83,2 ± 20,6	5,0 ± 2,14	12,0 ± 6,1	180,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2
	S 2	81,0 ± 16,8	14,4 ± 3,0	24,0 ± 7,4	174,4 ± 4,4	1,4 ± 0,8
	S 3	83,6 ± 33,4	11,4 ± 5,1	24,0 ± 19,5	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 4	57,2 ± 9,44	14,0 ± 2,9	16,8 ± 2,1	176,8 ± 2,1	0,0 ± 0,0
	S 5	55,0 ± 14,8	12,6 ± 6,1	12,8 ± 6,2	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 6	52,2 ± 21,4	9,8 ± 4,0	13,6 ± 8,0	180,0 ± 0	0,0 ± 0,0
	S 7	37,0 ± 26,4	8,4 ± 11,3	9,6 ± 5,5	180,0 ± 0	0,0 ± 0,0
	S 8	73,1 ± 15,0	7,7 ± 3,4	23,9 ± 5,4	180,0 ± 0	0,0 ± 0,0
	S 9	80,0 ± 16,8	12,3 ± 5,2	27,7 ± 7,5	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 10	82,3 ± 31,4	13,0 ± 4,4	22,4 ± 5,5	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 11	56,5 ± 12,0	8,9 ± 2,3	23,6 ± 7,5	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 12	55,0 ± 14,0	9,1 ± 3,5	21,8 ± 4,7	180,0 ± 0	0,0 ± 0,0
	S 13	55,2 ± 20,1	13,2 ± 5,1	18,5 ± 5,5	180,0 ± 0	0,0 ± 0,0
	S 14	39,0 ± 27,0	11,2 ± 5,1	14,0 ± 4,5	180,0 ± 0	0,0 ± 0,0
DMBA 6 mg.kg ⁻¹	S 1	68,2 ± 23,0	9,6 ± 4,8	20,6 ± 5,9	177,0 ± 1,7	1,4 ± 0,6
	S 2	82,0 ± 30,0	15,8 ± 6,1	27,2 ± 4,6	176,0 ± 2	0,4 ± 0,2
	S 3	65,0 ± 14,6	11,2 ± 1,3	19,6 ± 3,43	180,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1
	S 4	76,8 ± 11,3	15,8 ± 7,5	19,4 ± 10,6	176,6 ± 1,6	0,6 ± 0,1
	S 5	76,4 ± 18,9	15,4 ± 13,9	20,4 ± 4,0	174,2 ± 3,1 ^a	0,8 ± 0,3
	S 6	62,2 ± 24,3	11,4 ± 4,7	26,6 ± 12,1	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 7	60,8 ± 7,1	14,7 ± 10,3	19,8 ± 7,0	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 8	63,0 ± 5,8	10,3 ± 4,5	23,7 ± 7,3	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 9	70,5 ± 6,2	12,3 ± 7,0	18,5 ± 5,2	180,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	S 10	69,4 ± 3,9	13,4 ± 3,7	19,3 ± 4,3	180,0 ± 0	0,0 ± 0,0
	S 11	80,2 ± 14,0	15,3 ± 5,3	20,3 ± 5,3	165,0 ± 8,0 ^a	1,8 ± 1,5 ^a
CPA 25 mg.kg ⁻¹	S 12	54,6 ± 18,2	18,2 ± 6,2	22,6 ± 5,5	165,0 ± 9,0 ^a	4,3 ± 1,1 ^a
	S 13	78,0 ± 22,3	17,7 ± 4,7	21,8 ± 4,1	164,9 ± 7,5 ^a	1,8 ± 0,2 ^a
	S 14	68,2 ± 18,3	20,3 ± 9,7	32,0 ± 6,3	177,7 ± 1,1	1,8 ± 0,1 ^a
[6]-G 10 mg.kg ⁻¹	S 12	45,42 ± 10,24	13,71 ± 11,61	11,85 ± 10,44	180,0 ± 0,0	0 ± 0
	S 13	47,71 ± 6,36	12 ± 5,53	13,57 ± 6,77	180,0 ± 0,0	0 ± 0
	S 14	45 ± 6,95	15,14 ± 5,27	13,42 ± 3,2	180,0 ± 0,0	0 ± 0

Os valores representam a média ± desvio padrão (n=5-7). [6]-G: [6]-Gingerol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. CPA: ciclofosfamida. TP: tempo de permanência. NQ = número de quedas. S: semana de tratamento. ANOVA (two way), pós-teste de Tukey. Valores significantes de p<0,05 comparado ao grupo azeite (a), CPA (b).

No grupo que recebeu o tratamento com o antineoplásico convencional (CPA) ocorreu no teste *Rota rod* redução do tempo de permanência na 12^a e 13^a semanas, além de aumento no número de quedas em todas as semanas de terapia com CPA. Não foram observadas alterações na atividade locomotora e comportamental do [6]-G em relação ao grupo veículo (azeite). Após a avaliação hipocrática (dados não mostrados), não foi observado atividade motora diminuída, ataxia, perda do reflexo de endireitamento, alterações da frequência respiratória, analgesia, lacrimejamento, salivação, perda da aderência, ptose palpebral e sinais de diminuição do tônus muscular esquelético nos animais durante a indução do câncer de mama nas 11 primeiras semanas, bem como nas 3 semanas subsequentes com o tratamento utilizando CPA e [6]-G.

Durante a avaliação metabólica (**Tabela 2**) não foram evidenciadas alterações significativas no grupo [6]-G quanto ao peso corporal, consumo de ração, consumo de água, micção e defecação, quando comparadas ao grupo tratado com o veículo (azeite). O DMBA e a CPA não induziram alterações metabólicas (dados não mostrados).

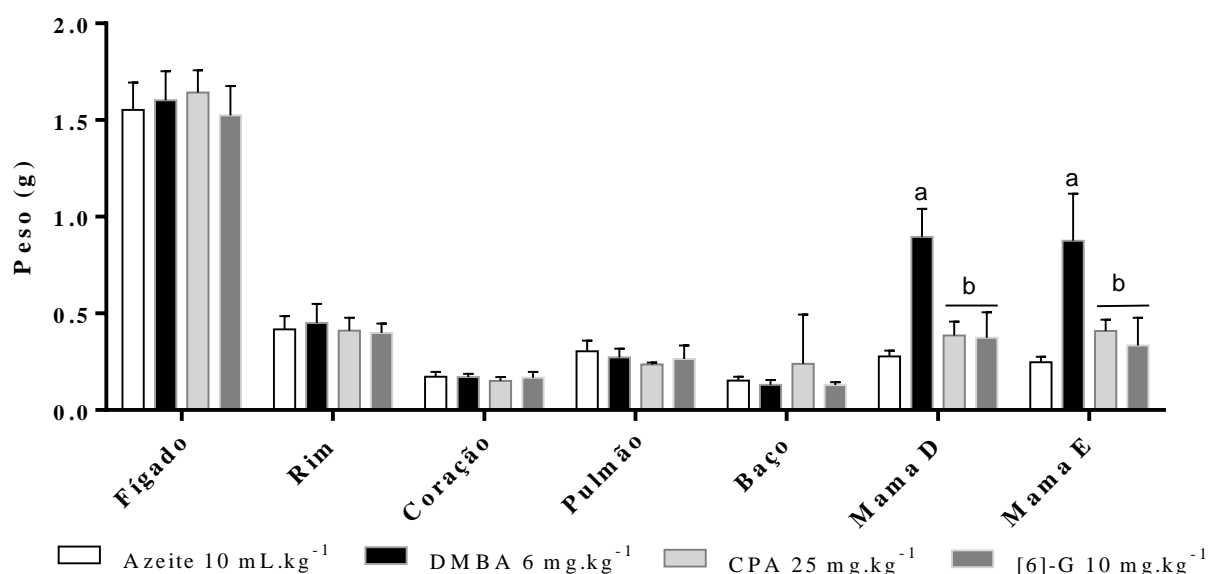
Tabela 2 - Perfil metabólico durante terapia com [6]-G durante as semanas 12, 13 e 14 em camundongos *Swiss* fêmeas e com o veículo (azeite de oliva).

Parâmetros Semana 12	Grupos	
	Veículo (azeite)	[6]-G 10 mg.kg ⁻¹
Peso corporal (g)	27,55 ± 3,30	26,49 ± 0,74
Consumo de ração (g)	9,41 ± 3,56	13,14 ± 0,48
Consumo de água (mL)	18,92 ± 7,66	24,3 ± 0,5
Micção (mL)	1,85 ± 1,49	2,5 ± 0,2
Defecação (g)	2,83 ± 0,88	3,3 ± 1,59
Parâmetros Semana 13	Grupos	
	Veículo (azeite)	[6]-G 10 mg.kg ⁻¹
Peso corporal (g)	27,10 ± 3,99	25,83 ± 0,79
Consumo de ração (g)	9,09 ± 2,52	6,86 ± 0,25
Consumo de água (mL)	20,27 ± 7,68	23,3 ± 2,5
Micção (mL)	1,36 ± 0,79	0,5 ± 0,0
Defecação (g)	2,77 ± 1,02	4,67 ± 0,77
Parâmetros Semana 14	Grupos	
	Veículo (azeite)	[6]-G 10 mg.kg ⁻¹
Peso corporal (g)	26,28 ± 0,45	25,12 ± 0,84
Consumo de ração (g)	12,43 ± 1,58	5,12 ± 0,25
Consumo de água (mL)	23,11 ± 1,45	24,3 ± 0,5
Micção (mL)	1,44 ± 0,59	0,5 ± 0,0
Defecação (g)	3,24 ± 1,23	3,3 ± 1,59

Os valores representam a média ± desvio padrão. [6]-G: [6]-Gingerol. (Teste T de Student).

Em relação a mensuração do peso dos órgãos (fígado, rins, coração, pulmão, baço), não foi observado nenhuma alteração significativa durante a terapia com DMBA, CPA e [6]-G em comparação ao grupo veículo (azeite) (**Figura 2**). Entretanto, houve um aumento significativo no peso das mamas direita e esquerda dos animais tratados com DMBA em relação ao grupo azeite. Observou-se ainda que tanto o grupo CPA quanto [6]-G reduziram de forma significativa o peso das mamas direita e esquerda em relação ao grupo DMBA.

Figura 2 - Perfil do peso de órgãos de camundongos fêmeas, após 11 semanas de tratamento com DMBA e terapia com CPA e [6]-G (12^a, 13^a e 14^a semana). Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5). [6]-G: [6]-Gingerol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. CPA: ciclofosfamida. ^a p<0,05 comparado ao azeite, ^b p<0,05 comparado ao grupo DMBA, ^c p<0,05 comparado ao grupo CPA (ANOVA, duas vias, pós-teste de Tukey).

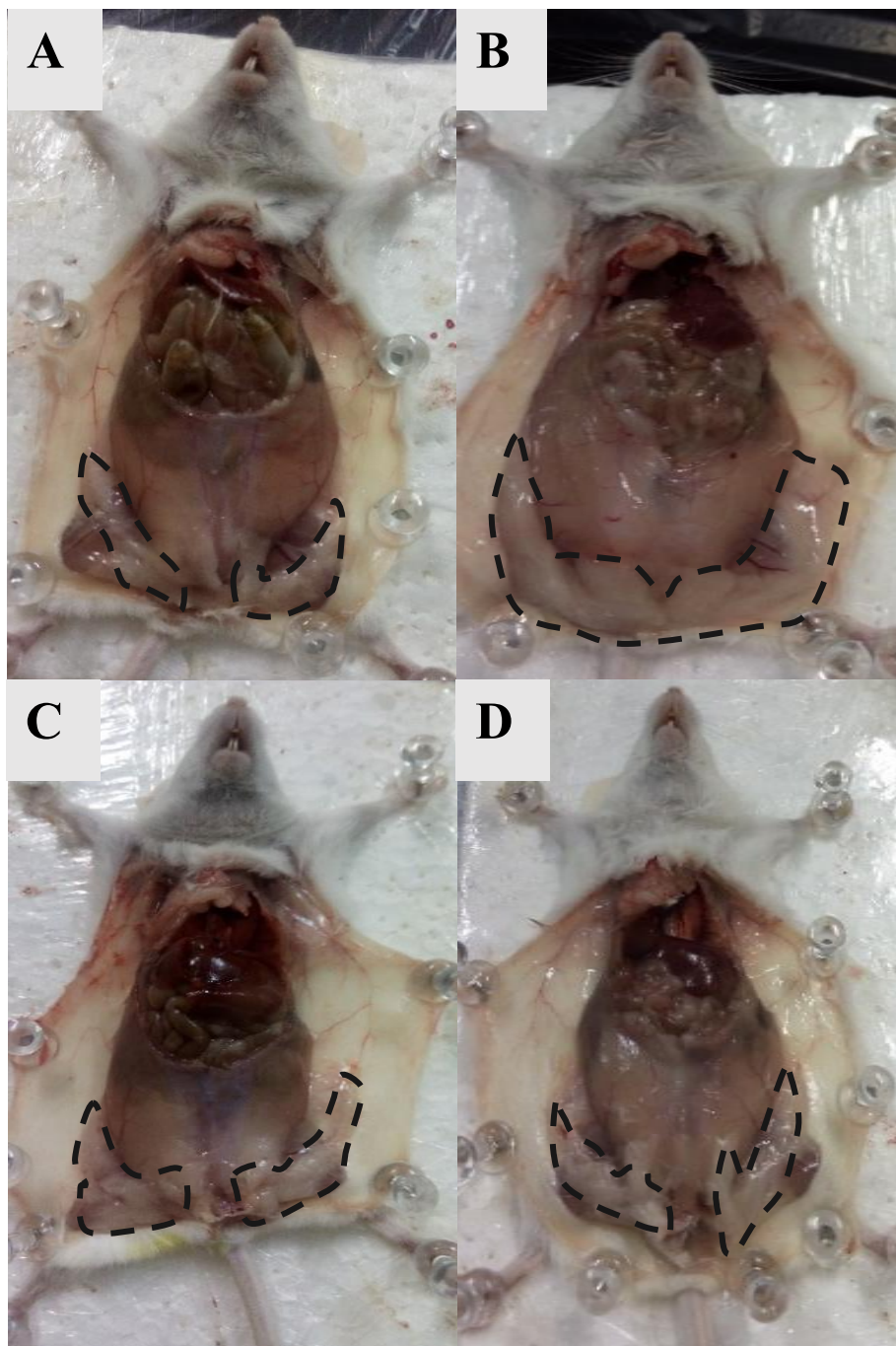


3.3 Perfil macroscópico, histopatológico e imuno-histoquímico (Ki-67) em tecido mamário de tratadas com DMBA e terapia com [6]-G

As mamas dos animais do grupo DMBA apresentaram características de processos inflamatórios, como aumento visual do tamanho, além disso, também foram observadas áreas mais vascularizadas. Os animais tratados com CPA e [6]-G, apresentaram redução no tamanho das mamas, bem como redução da vascularização em relação ao grupo com DMBA (**Figura 3**). A avaliação histopatológica e o perfil imuno-histoquímico da mama direita inguinal foi realizada com todos os grupos tratados com DMBA, da mesma forma procedeu-se com aqueles que receberam as terapias com [6]-G e CPA, e veículo (azeite), a escolha da mama direita foi

direcionada pelas características macroscópicas, bem como por apresentar maior peso tecidual, quando comparado à mama esquerda.

Figura 3 - Perfil macroscópico das mamas dos animais, após indução do câncer com DMBA e em terapia com CPA e [6]-G. CPA: ciclofosfamida. [6]-G: [6]-Gingerol. (A) Grupo veículo (azeite), (B) grupo com DMBA, (C) terapia com CPA, (D) terapia com [6]-G.



3.4 Perfil hematológico e bioquímico após indução do câncer de mama e terapia com [6]-G e ciclofosfamida

Ao final da terapia com [6]-G, não foram evidenciadas alterações hematológicas na série vermelha, apenas na série branca, com um aumento significativo no número de eosinófilos quando comparado ao grupo veículo (azeite) (**Tabela 3**), observou-se ainda, alterações bioquímicas para enzimas hepáticas após tratamento com CPA pelo aumento significativo de AST e ALT quando comparado ao grupo veículo (azeite), da mesma forma, o [6]-G também apresentou elevação do ALT de forma similar ao CPA.

Tabela 3 - Perfil hematológico e bioquímico após terapia com [6]-G e CPA, em camundongos com câncer de mama induzido pelo DMBA.

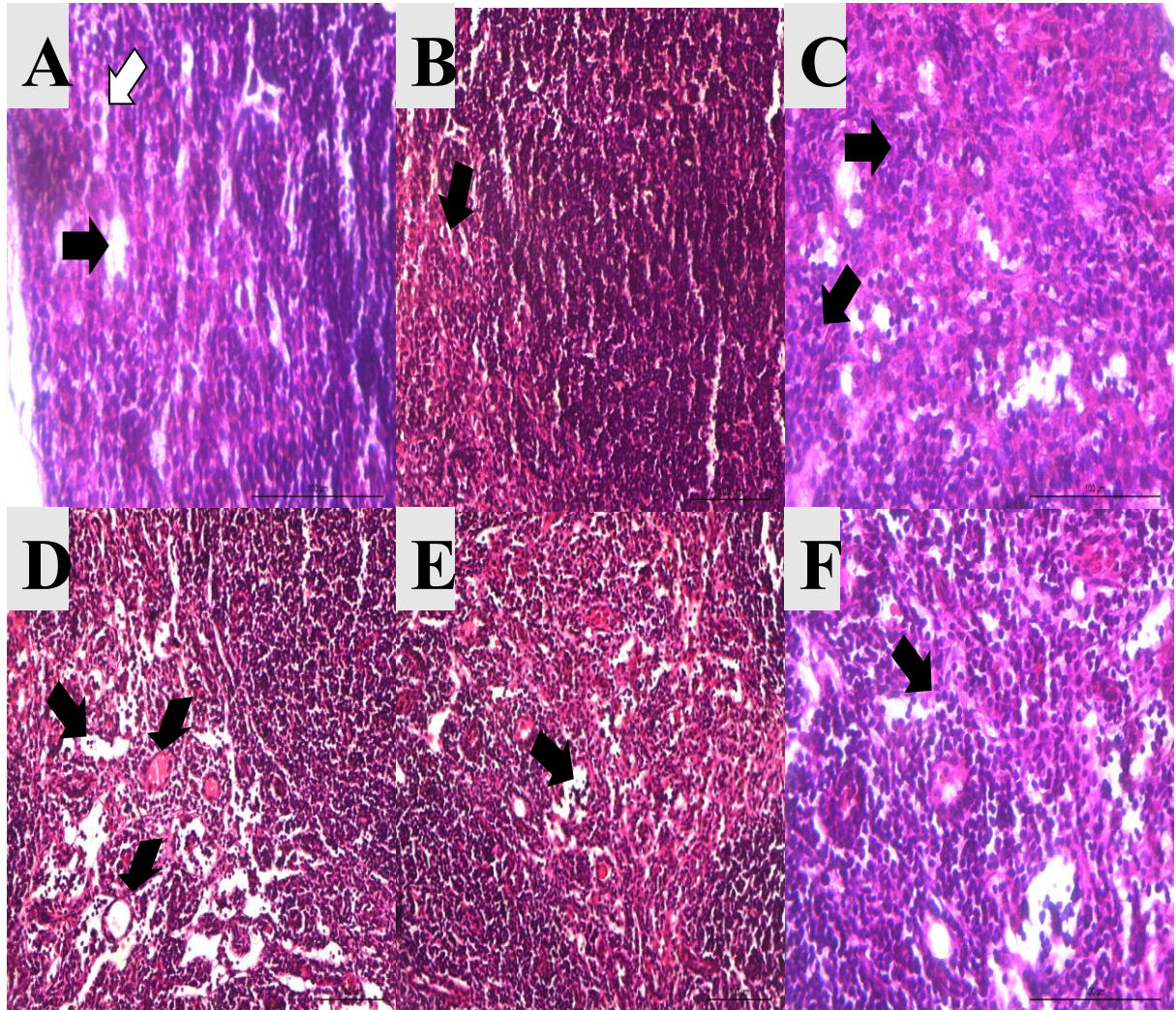
Perfil hematológico	Veículo (10 mL.Kg ⁻¹)	CPA (25 mg.kg ⁻¹)	[6]-G (10mg.mL ⁻¹)
<i>Série vermelha</i>			
HEM (10 ⁶ /L)	9,8 ± 0,10	9,97 ± 0,54	8,67 ± 0,93
HGB (g/dL)	14,72 ± 1,16	15,5 ± 1,16	14,87 ± 1,31
HTC (%)	54,22 ± 3,27	56,5 ± 2,86	53,6 ± 4,75
<i>Série Branca</i>			
Leucócitos (10 ³ /μL)	3216 ± 826,88	3398,0 ± 840,7	2957,28 ± 434,47
Neutrófilos (%)	9,87 ± 1,42	8,76 ± 2,51	9,12 ± 1,91
Linfócitos (%)	74,37 ± 5,38	77,8 ± 4,62	75,59 ± 4,23
Eosinófilos (%)	0,2 ± 0,05	0,14 ± 0,05	0,65 ± 0,15 ^{ab}
Monócitos (%)	15,42 ± 4,83	12,8 ± 4,21	14,16 ± 0,84
Basófilos (%)	0,48 ± 0,11	0,42 ± 0,17	0,41 ± 0,90
<i>Outros</i>			
Plaquetas (10 ³ /μL)	1120,1 ± 134,6	1034,0 ± 100,7	1059,00 ± 26,49
Perfil bioquímico	Veículo (10 mL.Kg ⁻¹)	CPA (25 mg.kg ⁻¹)	[6]-G (10mg.mL ⁻¹)
<i>Renais</i>			
Ureia (mg/dL)	33,5 ± 9,32	36,0 ± 8,71	38,33 ± 3,51
Creatinina (mg/dL)	0,42 ± 0,05	0,46 ± 0,05	0,45 ± 0,05
<i>Hepáticos</i>			
AST (U/L)	128,70 ± 6,35	156,6 ± 6,65 ^a	137,5 ± 5,97 ^b
ALT (U/L)	60 ± 7,87	113,3 ± 2,08 ^a	106,30 ± 3,05 ^a

Valores representam a média ± desvio padrão (n = 5-7). [6]-G: [6]-Gingerol; HEM: hemácias; HGB: hemoglobina, HTC: hematócrito. AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. ANOVA (one way), pós-teste de Tukey. (a) p<0,05 comparado ao veículo (azeite). (b) p<0,05 comparado ao CPA.

O perfil histopatológico da mama direita inguinal 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 (**Figuras 4 A, 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 ao tecido mamário dos animais tratados com [6]-G (10 mg.kg⁻¹), foi observado hiperplasia ductal atípica e citoplasma mais claro e heterogêneo. As

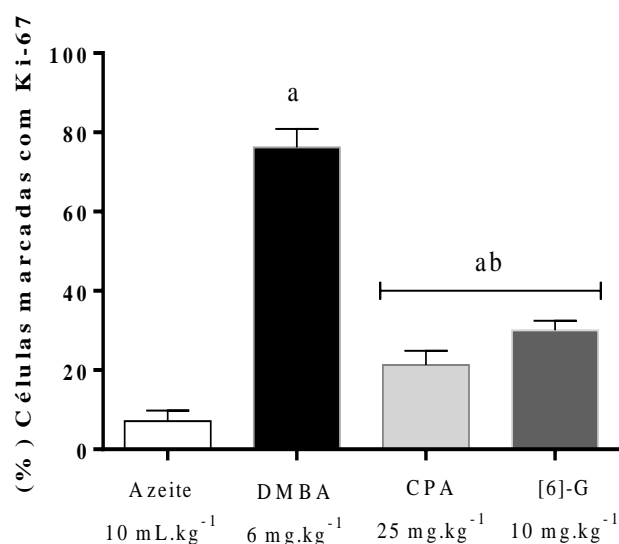
características apresentadas nos animais do grupo [6]-G ainda são sugestivas do carcinoma mamário (**Figuras 4 D, E e F**).

Figura 4 - 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 [6]-G (**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 e E**: hiperplasia ductal atípica. **F**: citoplasma mais claro e heterogêneo. Coloração H&E (aumento de 200X).



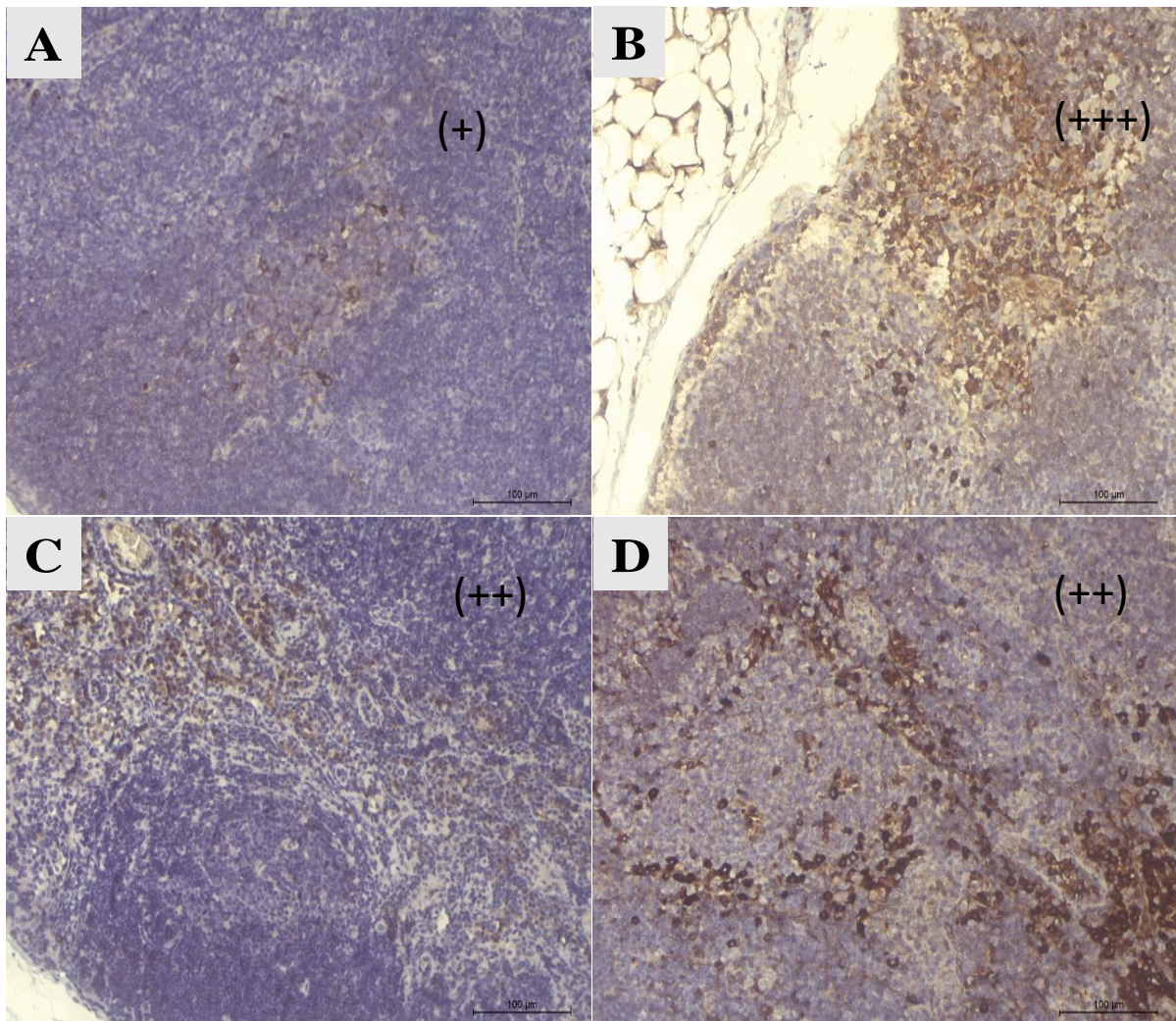
A avaliação do marcador celular Ki-67, indicou um aumento significativo na proliferação celular no tecido mamário dos animais tratados com DMBA após o estabelecimento do câncer de mama. A terapia com CPA e [6]-G reduziram de forma significativa a marcação com Ki-67 em relação ao DMBA, vale ressaltar, que não houve diferença estatística entre CPA e [6]-G, demonstrando efeitos similares entre o antineoplásico convencional e o [6]-G na redução da marcação do antígeno Ki-67 (**Figura 5**).

Figura 5 - Avaliação do percentual de células do tecido mamário marcadas com Ki-67 em camundongos fêmeas, após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com CPA e [6]-G. Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5). [6]-G; [6]-Gingerol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. CPA = ciclofosfamida. ANOVA (two way), pós-teste de Tukey. $p < 0,05$ comparado ao Azeite^a, DMBA^b.



No perfil imuno-histoquímico é possível observar que o grupo azeite demonstrou leve marcação (+ [7,16 \pm 2,61]), enquanto que o DMBA demonstrou expressiva marcação (+++ [76,24 \pm 4,64]). Ambos, CPA e [6]-G obtiveram marcação moderada (++ [21,25 \pm 3,59]/[30,00 \pm 2,49]), indicando possíveis reduções de proliferação celular no tecido mamário (**Figura 6**).

Figura 6 - 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 [6]-G. **A**: controle veículo (azeite de oliva) – leve marcação (+ [7,16 \pm 2,61]). **B**: DMBA – expressiva marcação (+++ [76,24 \pm 4,64]). **C**: CPA – com marcação moderada (++ [21,25 \pm 3,59]) e **D**: [6]-G – marcação moderada (++ [30 \pm 2,49]), *Score* mensurado pela contagem individual de 400 células com núcleo acastanhado (aumento de 200 X).

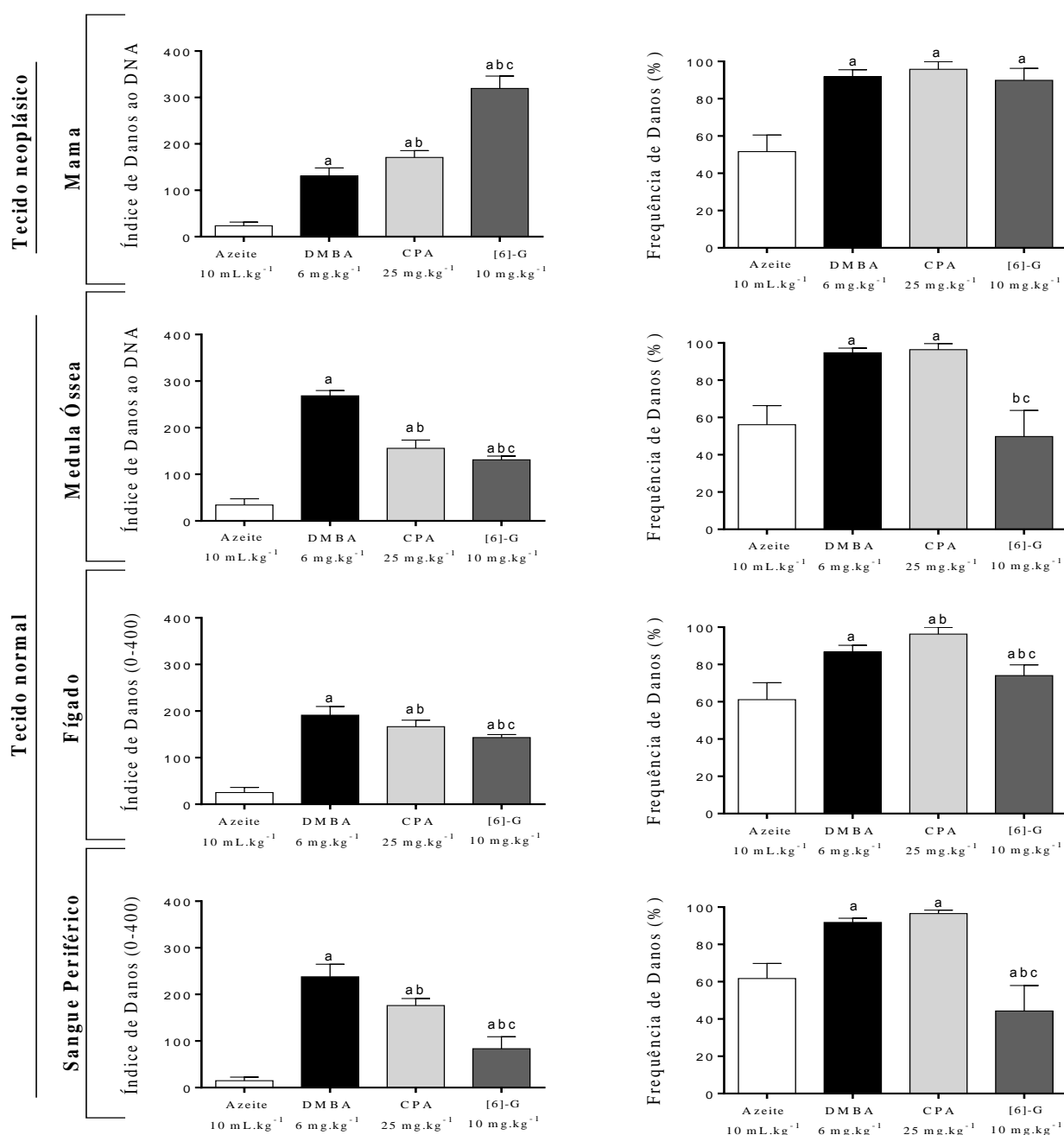


3.5 Mecanismos citogenéticos induzidos pelo DMBA, CPA e [6]-G

3.5.1 Genotoxicidade em células não tumorais e tumorais após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com [6]-G

O DMBA induziu danos genotóxicos indicativos de instabilidade genética em células da mama e células de tecidos não neoplásicos (medula óssea, fígado e linfócitos de sangue periférico), observou-se aumento significativo dos índices e frequências de danos, quando comparado ao veículo (azeite) (**Figura 7**). O grupo CPA na avaliação ID diferiu dos efeitos promovidos pelo DMBA, porém, na frequência de danos FD, apresentou efeitos similares ao DMBA em tecidos saudáveis (medula óssea, linfócitos de sangue periférico).

Figura 7 - Estudo da genotoxicidade do [6]-G 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⁻¹), seguidas de 3 semanas de terapia com o grupo [6]-G (10 mg.kg⁻¹) e ciclofosfamida (CPA, 25 mg.kg⁻¹). Valores representam a média ± desvio padrão (n=5). [6]-G: [6]-Gingerol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. ^a p<0,05 comparado ao grupo azeite, ^b p<0,05 comparado ao DMBA e ^c p<0,05 comparado ao CPA (ANOVA, one way, pós-teste de Tukey).



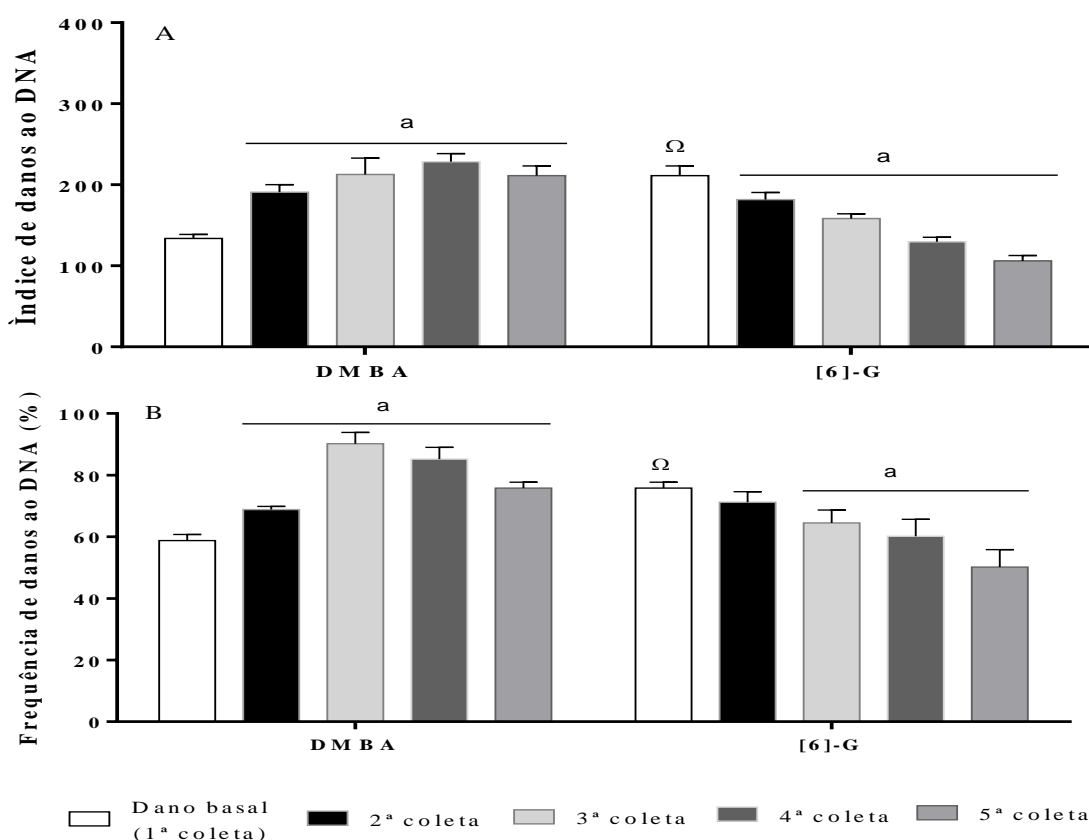
O [6]-G, assim como o grupo CPA, promoveu indução genotóxica após 3 semanas de terapia (12^a, 13 e 14^a semana) em células neoplásicas e não neoplásicas, no entanto, vale ressaltar que o [6]-G obteve maiores danos significativos no tecido mamário em relação ao antineoplásico (CPA), e valores significativamente menores para ID e FD nos tecidos não

neoplásicos, indicando que o [6]-G foi mais eficiente que o CPA, uma vez que causou mais danos no tecido tumoral e menos efeitos genotóxicos em tecidos saudáveis.

3.5.2 Avaliação da capacidade de reparo de danos ao DNA em células nucleadas de sangue periférico durante e após o tratamento com DMBA e terapia com [6]-G

No estudo da capacidade de reparo em linfócitos de sangue periférico, foi possível observar aumento significativo do ID e FD durante o tratamento com o DMBA, onde todas as coletas (8^a, 9^a, 10^a, 11^a semana) diferiram do controle (1^a semana-dano basal). Entretanto, durante a terapia do [6]-G, houve redução do ID e FD após exposição ao DMBA, indicando possível capacidade de reparo durante a terapia com [6]-G para linfócitos de sangue periférico, uma vez que os dados coletados diferiram quando comparados ao controle (11^a semana-dano basal) (**Figura 8**).

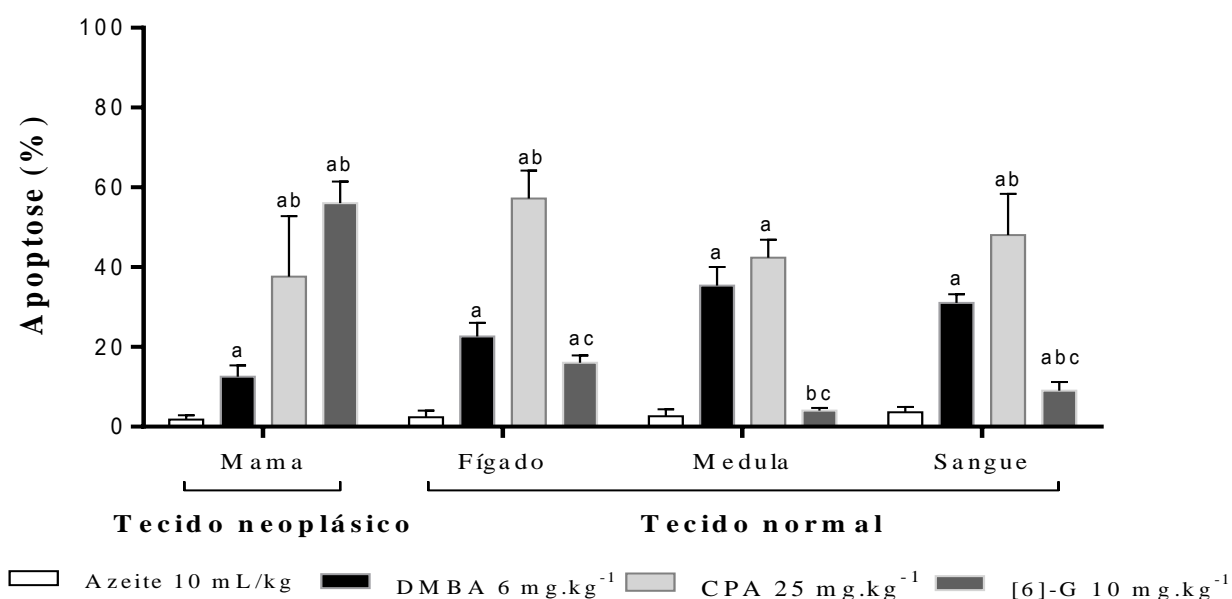
Figura 8 - Estudo de reparo de danos ao DNA, em linfócitos de sangue periférico de camundongos fêmeas, durante a indução do câncer de mama com DMBA (6 mg.kg^{-1}) e terapia com [6]-G (10 mg.kg^{-1}). **A** - índice de danos (0 - 400) e **B** - frequência de danos (0-100). Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5). ANOVA, two way, pós-teste de Tukey. ^ap<0,05 comparado aos danos basais e Ω comparado ao dano basal da primeira coleta.



3.6 Avaliação da apoptose após indução do câncer de mama com DMBA e terapia com [6]-G e CPA

Em relação aos níveis de apoptoses observados, por fragmentação nuclear com o teste cometa, o [6]-G, na mama direita, induziu mais apoptoses que o DMBA, bem como CPA. De forma contrária, na medula óssea e sangue periférico, o DMBA e a CPA induziram mais danos apoptóticos que o [6]-G, e embora no tecido hepático o [6]-G tenha indicado danos apoptóticos similares ao DMBA, foi observado atividade apoptótica inferior quando comparada ao antineoplásico convencional (**Figura 9**).

Figura 9 - Avaliação do percentual de apoptose em diferentes tecidos de camundongos fêmeas, após 11 semanas de indução do câncer de mama com DMBA e terapia com [6]-G. Valores representam a média \pm desvio padrão (n = 5). [6]-G; [6]-Gingerol. DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno. CPA = ciclofosfamida. ANOVA (duas vias), pós-teste de Tukey. $p < 0,05$ comparado ao Azeite^a, DMBA^b e CPA^c.



4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, o DMBA induziu carcinoma mamário, confirmado por análise histopatológica, apresentando ainda, expressiva marcação imuno-histoquímica para a proteína Ki-67. O Ki-67 é um marcador muito específico detectando não apenas a proliferação celular, mas também o reparo celular (ALVARADO et al., 2017). A ligação do Ki-67 se relaciona como evidência de proliferação celular, visto que essa proteína nuclear, está expressa em todas as fases do ciclo celular, tornando o Ki-67 um importante fator prognóstico no câncer de mama

(PETRELLI et al., 2015). As mamas dos animais que receberam terapia com [6]-G, demonstraram menor marcação para KI-67 em comparação ao grupo DMBA, com efeitos antiproliferativos similares a CPA.

O exame histopatológico das glândulas mamárias dos animais testados apresentou dados que corroboram com outros estudos, onde fêmeas de roedores (ratos, camundongos) que receberam exclusivamente DMBA, apresentaram aumento da carga tumoral com alteração do processo normal de diferenciação celular, hiperplasia ductal atípica, heterogeneidade celular, atipia de células ductais e contorno nuclear irregular (BISHAYEE et al., 2013; MINARI et al., 2016; ZINGUE et al., 2016; ALESSANDRA-PERINI et al., 2018), ao passo que, a coloração imuno-histoquímica de Ki67 também evidenciou ação hiperproliferativa em tumores induzidos por DMBA (ALVARADO et al., 2017; DENSON et al., 2018), como também observado no presente estudo.

No monitoramento toxicológico, o [6]-G não induziu alterações comportamentais para atividade motora durante terapia de carcinoma mamário, indicando que a administração do [6]-G não induziu nos camundongos, comportamento associado à excitação (FENTRESS, 1988), ansiedade (KYZAR et al., 2011), atividade sedativa ou tóxica (HÅNELL; MARKLUND, 2014). Em estudo realizado por KIM et al. (2018), o [6]-G demonstrou potenciais preventivos e / ou terapêuticos no manejo do déficit de memória e no comprometimento cognitivo em camundongos C57BL/6 com amnésia, o gingerol demonstrou efeito neuroprotetor na prevenção da neurotoxicidade mitocondrial de células neuronais, além de regular a expressão da proteína priônica para proteger os neurônios (JEONG et al., 2012).

Entretanto, durante o tratamento com o DMBA (6 mg/Kg/semana) foram observadas alterações comportamentais no teste *Rota rod*, assim como a CPA (25 mg/Kg/semana), podendo possivelmente sugerir ação miorreaxante, visto que o animal não conseguiu manter o equilíbrio sobre a barra giratória, tais alterações podem sugerir efeitos tóxicos durante o período de tratamento (HÅNELL; MARKLUND, 2014). Os dados comportamentais para o DMBA e CPA foram concordantes com os trabalhos de KHAN et al. (2016).

Entretanto, os animais tratados com [6]-G não apresentaram mudanças metabólicas significativas, portanto, não apresentaram indícios de toxicidade sistêmica, considerando que a avaliação da coordenação motora deve ser testada em candidatos a fármacos (MACHADO et al., 2015), uma vez que, a toxicidade pode ser avaliada mediante alterações motoras (BIAGIONI et al., 2016), da mesma forma, a toxicidade sistêmica de substâncias químicas também pode ser avaliada por meio de alterações no desenvolvimento ponderal dos animais experimentais, como redução do consumo de água e ração e alterações na excreção de urina e

fezes (PINTO et al., 2007), perda de peso, piloereção, cromodacriorreia, estereotípias e mortes (OECD, 2009).

Os grupos [6]-G e CPA não apresentaram toxicidade por sua interferência no peso dos órgãos (fígado, rins, pulmão, coração e baço) quando comparados ao grupo veículo (azeite). Em relação ao tecido mamário, verificou-se aumento significativo do peso no grupo tratado com o carcinógeno DMBA, em contrapartida, nos grupos que receberam a terapia do CPA e [6]-G houve redução do peso das mamas, tais informações podem possivelmente ser associadas a atividade antiproliferativa observadas na análise do Ki67. O peso dos órgãos fornece informações toxicológicas preliminares e podem indicar alterações nos sistemas dos quais fazem parte, alterações no peso do fígado podem sugerir uma hipertrofia hepatocelular, no baço podem fornecer indícios de toxicidade hematopoiética e, no caso dos rins, hipertrofia tubular ou doença crônica progressiva (GAD, 2006; SELLERS et al., 2007).

O [6]-G, no estudo, apresentou similaridade nos mecanismos citogenéticos ao antineoplásico CPA. A CPA, usada como controle no estudo, é uma droga inativa *in vitro*, a qual necessita ser metabolizada por enzimas do complexo P-450 no fígado para tornar-se ativa, trata-se do agente alquilante mais comumente utilizado no tratamento do CM, que reage com as bases do DNA, produzindo ligação cruzada entre filamentos de DNA, impedindo replicação efetiva (FISHER et al., 1997; COLVIN, 2001; BEAR et al., 2006), e atua destruindo células em processo de divisão desordenada, inibindo o crescimento acelerado e a disseminação de tumores (ALMEIDA, 2010).

O [6]-G, nas análises hematológicas não apresentou toxicidade. Ao final da terapia não foram evidenciadas alterações hematológicas na série vermelha, apenas na série branca, com um aumento no número de eosinófilos quando comparado ao grupo veículo (azeite), possivelmente como uma resposta do organismo a infecções ou reações de sensibilidade. Entretanto, foi observado alterações bioquímicas para enzimas hepáticas após tratamento de forma similar a CPA, pelo aumento significativo de AST e ALT. Mas, cabe enfatizar que as terapias com CPA e [6]-G ocorreram após 11 semanas de indução química do câncer de mama com o DMBA. Em estudo realizado por ARORA et al. (2014), o DMBA induziu toxicidade em vários órgãos de roedores, produziu EROs, afetou a atividade das enzimas antioxidantes plasmáticas, bem como induziu hepatotoxicidade, como evidenciado no estudo para CPA e [6]-G.

Na avaliação genotóxica, o teste cometa foi aplicado na sua versão alcalina (TICE et al., 2000; DUSINSKA; COLLINS, 2009), o que favorece a fragmentação nuclear por diversos tipos de danos, tais como sítios álcali lábeis, quebras de fitas, e também danos oxidativos em

células eucarióticas e procarióticas (SINGH et al., 1988, FAIRBAIRN; OLIVE; NEILL, 1995; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015), como relatado RASTOGI et al. (2014), o [6]-G induziu danos ao DNA, como observado após 3 semanas de terapia (12^a, 13^a e 14^a semana) em tecido mamário, fígado e sangue periférico. Entretanto, durante a terapia do [6]-G, houve redução do ID e FD indicando possível capacidade de reparo durante a terapia com [6]-G para linfócitos de sangue periférico. Estudos relatam que o [6]-G induz EROs mitocondrial em linhagens leucêmicas crônica (K562) e aguda (U937), levando a interrupção do ciclo em G2/M, como também contribui para a atividade da caspase 3 em células tratadas com [6]-G com aumento 3 (três) vezes maior entre as linhagens de leucemia mielóide crônica (K562, LAMA84, JURLMK1) e aguda (U937, HL-60, NB4) quando comparadas a células mononucleadas de sangue periférico (PBMCs) normais, sugerindo que [6]-G não induziu danos em células normais (PBMCs) (RASTOGI et al., 2014).

A exposição das células LoVo ao [6]-G ocasionou elevação dos níveis de EROs intracelular e fosforilação de p53, sugerindo o que [6]-G poderia promover efeitos benéficos no tratamento do câncer de cólon em células Hela com [6]-Gingerol, aumento da taxa de parada celular na fase G0-G1, redução da expressão de ciclinas (A, D1, E1), indução de apoptótica por aumento da proporção Bax:Bcl2, libertação de citocromo c, clivagem de caspase 3, 8, 9 e PARP em células tratadas (LIN; LIN; TSAY, 2012; ZHANG et al., 2017).

Danos ao DNA foram observados durante a indução do câncer, com o DMBA e durante a terapia com CPA em células de tecidos não neoplásicos (medula óssea, fígado e linfócitos de sangue periférico), pelo aumento significativo dos índices e frequências de danos, quando comparado ao veículo (azeite). Estudos demonstram que o DMBA induziu toxicidade em vários órgãos de roedores, estresse oxidativo e danos ao DNA (ARORA et al., 2014; ZINGUE, et al., 2018), a maior susceptibilidade do fígado a danos causados por agentes químicos é presumivelmente uma consequência do seu papel primário no metabolismo dos xenobióticos (AL-ATHAR, 2004). A exposição ao DMBA, pode levar a alterações toxicológicas no fígado, incluindo estresse oxidativo e produção de metabólitos carcinogênicos (DIGIOVANI; JUCHAU, 1980).

Corroborando com a genotoxicidade do [6]-G observada em mamas, efeitos apoptóticos, possivelmente, oriundos de danos ao DNA foram observados. Em estudos realizados sobre os efeitos anti-proliferativos do [6]-G em linhagens tumorais hepática (HepG2) (IMPHENG et al., 2015), cervical (HeLa, CaSki, SiHa) (RASTOGI et al., 2015) e leucêmica (K562, LAMA84, JURLMK1, U937, HL-60, NB4) (RASTOGI et al., 2014) foi possível

observar supressão do crescimento celular por aumento de EROs e indução apoptótica, além de exercer inibição na migração e motilidade de células tumorais mamárias (LEE et al., 2008).

De forma contrária, na medula óssea e sangue periférico, o DMBA e a CPA induziram danos apoptóticos, o [6]-G é uma substância fenólica, e relatos indicam que os fenólicos ativam múltiplas vias de sinalização celular (AVTANSKI; PORETSKY, 2018), induzem a morte de células cancerígenas, por meio de mecanismos que envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), em contextos celulares específicos, como também podem como pró-oxidantes desencadear vias que destroem as células cancerígenas, elevando o nível intracelular de estresse oxidativo (LEE et al, 2013; RUSSO et al., 2017).

Em geral, os quimioterápicos são tóxicos/citotóxicos aos tecidos de rápida proliferação caracterizados por alta atividade mitótica, e apresentam efeitos colaterais sobre as células de crescimento rápido no organismo (ORIYAMA et al., 2017). De fato, o problema com a quimioterapia padrão é a ocorrência das drogas convencionais não distinguirem com precisão células não neoplásicas e malignas em crescimento, ou seja, enquanto as células estão se dividindo, acabam se tornando alvos dos antineoplásicos (EFFERTH et al., 2017). No estudo o [6]-G apresentou efeitos antitumorais por mecanismos citogenéticos de danos ao DNA e por indução de apoptoses.

5 CONCLUSÃO

No modelo animal induzido quimicamente pelo pró-carcinógeno DMBA, seguido de terapia com [6]-G (10 mg.Kg⁻¹) e ciclofosfamida/CPA (25 mg.Kg⁻¹) foi possível pontuar os seguintes aspectos:

- (1) Durante a indução do câncer, foi possível observar que o (DMBA- 6 mg.kg⁻¹) e a CPA (25 mg.kg⁻¹) induziram alterações comportamentais pela redução do tempo de permanência e aumento do número de quedas do *Rota Rod* quando comparados ao veículo (azeite de oliva).
- (2) Na mensuração do peso dos órgãos (fígado, rim, coração, pulmão, baço) não se observaram alterações entre os grupos (Veículo, DMBA, CPA, [6]-G). Entretanto, o DMBA induziu aumento nas mamas, por proliferação celular, como observado pela marcação com Ki-67.
- (3) Nas terapias por 3 semanas (CPA; [6]-G) se observou redução significativa no peso das mamas, assim como, menor marcação para o antígeno Ki-67.

- (4) O [6]-G e a CPA não induziram alterações hematológicas na série vermelha, entretanto, observou-se no grupo [6]-G aumento dos eosinófilos (série branca), e alterações bioquímicas em enzimas hepáticas para CPA (AST e ALT) e [6]-G (ALT).
- (5) O DMBA, [6]-G e CPA induziram danos genotóxicos em células da mama, como também em medula, fígado e sangue periférico, entretanto, os danos no grupo [6]-G foram significativamente menores em tecidos não neoplásicos, observaram-se ainda efeitos de reparo ao DNA na terapia com [6]-G, em linfócitos de sangue periférico.
- (6) O [6]-G induziu significantes níveis de apoptoses, especialmente no tecido neoplásico mamário.
- (7) Os marcadores citogenéticos são importantes no monitoramento de indução do câncer com DMBA e em estudos e atividades antitumorais. O [6]-G apresentou importantes respostas relacionadas à redução da proliferação e indução apoptótica de células tumorais.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Agradecimentos

Agradecemos à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) e Universidade Federal do Piauí (UFPI), por fornecerem as instalações para realização do estudo, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFPI) – CAPES/IFPI.

REFERÊNCIAS

- ABBA, M. C.; ZHONG, Y.; LEE, J.; KIL, H.; LU, Y.; TAKATA, Y.; SIMPER, M. S.; GADDIS, S.; SHEN, J.; ALDAZ, C. M. DMBA induced mouse mammary tumors display high incidence of activating Pik3caH1047 and loss of function Pten mutations. **Oncotarget**, v. 7, n. 39, p. 64289, 2016.
- ACS. Cancer Treatment & Survivorship Facts & figures 2016-2017. Atlanta: **American Cancer Societ**. American Cancer Society, 2016.
- AKRAM, M.; IQBAL, M.; DANİYAL, M.; KHAN, A. U. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological research**, v. 50, n. 1, p. 33, 2017.
- ALESSANDRA-PERINI, J.; PERINI, J. A.; RODRIGUES-BAPTISTA, K. C.; DE MOURA, R. S.; JUNIOR, A. P.; DOS SANTOS, T. A.; SOUZA, P. J. C.; NASCIUTTI, L. E.; MACHADO, D. E. Euterpe oleracea extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA in breast experimental cancer. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 116, 2018.
- ALMEIDA, J. R. C. Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade. In: **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. 2010, 358p.
- ALVARADO, A.; LOPES, A. C.; FAUSTINO-ROCHA, A. I.; CABRITA, A. M.; FERREIRA, R.; OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, B. Prognostic factors in MNU and DMBA-induced mammary tumors in female rats. **Pathology-Research and Practice**, v. 213, n. 5, p. 441-446, 2017.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B. J. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 1015-1025, 1999.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.
- ARORA, R.; BHUSHAN, S.; KUMAR, R.; MANNAN, R.; KAUR, P.; SINGH, A. P.; ARORA, S. Hepatic dysfunction induced by 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene and its obviation with erucin using enzymatic and histological changes as indicators. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112614, 2014.
- AVTANSKI, D.; PORETSKY, L. Phyto-polyphenols as potential inhibitors of breast cancer metastasis. **Molecular Medicine**, v. 24, n. 1, p. 29, 2018.
- BARROS, A. C. S.; MURANAKA, E. N. K.; MORI, L. J.; PELIZON, C. H. T.; IRIYA, K.; GIOCONDO, G.; PINOTTI, J. A. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 59, n. 5, p. 257-261, 2004.
- BEAR, H. D.; ANDERSON, S.; SMITH, R. E.; GEYER JR, C. E.; MAMOUNAS, E. P.; FISHER, B.; PAIK, S. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National

Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 13, p. 2019-2027, 2006.

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.; DE OLIVEIRA, R. C.; DE OLIVEIRA, R.; DA SILVA, J. A.; DOS ANJOS-GARCIA, T.; RONCON, C. M.; COIMBRA, N. C. 5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the dorsomedial hypothalamus connected to dorsal raphe nucleus inputs modulate defensive behaviours and mediate innate fear-induced antinociception. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 532-545, 2016.

BISHAYEE, A.; MANDAL, A.; THOPPIL, R. J.; DARVESH, A.S.; BHATIA, D. Chemopreventive effect of a novel oleanane triterpenoid in a chemically induced rodent model of breast cancer. **International journal of cancer**, v. 133, n. 5, p. 1054-1063, 2013.

BRAITHWAITE, D.; DEMB, J.; HENDERSON, L. M. Optimal breast cancer screening strategies for older women: current perspectives. **Clinical interventions in aging**, v. 11, p. 111, 2016.

CHANG, K.; KUO, C. 6-Gingerol modulates proinflammatory responses in dextran sodium sulfate (DSS)-treated Caco-2 cells and experimental colitis in mice through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation. **Food & Function**, v.6, p. 3334–334, 2015.

COLLINS, A. R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 24-32, 2009.

COLVIN, O. M. Antitumor alkylating agents. **Cancer Principles and Practice of Oncology, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**, p. 363-376, 2001.

DE ALENCAR, M. V. O. B.; ISLAM, M. T.; DE LIMA, R. M. T.; PAZ, M. F. C. J.; DOS REIS, A. C.; DA MATA, A. M. O. F.; FILHO, J. W. G. O.; CERQUEIRA, G. S; FERREIRA, P. M. P.; SOUSA, J. M. C.; MUBARAK, M. S.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. Phytol as an anticarcinogenic and antitumoral agent: An in vivo study in swiss mice with DMBA-Induced breast cancer. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, p. 1–13, 2018.

DENSON, K. E.; MUSSELL, A. L.; SHEN, H.; TRUSKINOVSKY, A.; YANG, N.; PARASHURAMA, N.; CHEN, Y.; FRANGOU, C.; YANG, F.; ZHANG, J. The Hippo Signaling Transducer TAZ Regulates Mammary Gland Morphogenesis and Carcinogen-induced Mammary Tumorigenesis. **Scientific reports**, v. 8, 2018.

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

EFFERTH, T.; SAEED, M. E.; MIRGHANI, E.; ALIM, A.; YASSIN, Z.; SAEED, E.; KHALID, H. E.; DAAK, S. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 50284, 2017.

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.

ELLIS, M.; SUMAN, V.; HOOG, J.; GONCALVES, R.; SANATI, S.; CREIGHTON, C. J. Ki67 proliferation index as a tool for chemotherapy decisions during and after neoadjuvant aromatase inhibitor treatment of breast cancer: results from the American College of Surgeons Oncology Group Z1031 Trial (Alliance). **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 10, p. 1061, 2017.

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

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

FERLAY, J.; STELIAROVA-FOUCHER, E.; LORTET-TIEULENT, J.; ROSSO, S.; COEBERGH, J. W.; COMBER, H.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 6, p. 1374-1403, 2013.

FISHER, B.; ANDERSON, S.; WICKERHAM, D. L.; DECILLIS, A.; DIMITROV, N.; MAMOUNAS, E.; ABRAMSON, N. Increased intensification and total dose of cyclophosphamide in a doxorubicin-cyclophosphamide regimen for the treatment of primary breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-22. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 5, p. 1858-1869, 1997.

GAD, S. Statistics and experimental design for toxicologists and pharmacologists. Boca Raton, Florida: **Taylor & Francis Group**, 2006. 567p.

GREENLEE, H.; DUPONT-REYES, M. J.; BALNEAVES, L. G.; CARLSON, L. E.; COHEN, M. R.; DENG, G.; BOYCE, L. M. Clinical practice guidelines on the evidence-based use of integrative therapies during and after breast cancer treatment. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 3, p. 194-232, 2017.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G.V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. GE01, 2015.

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

IMPHENG, H.; RICHERT, L.; PEKTHONG, D.; SCHOLFIELD, C. N.; PONGCHAROEN, S.; PUNGPETCHARA, I.; SRISAWANG, P. [6]-Gingerol inhibits de novo fatty acid synthesis and carnitine palmitoyltransferase-1 activity which triggers apoptosis in HepG2. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 4, p. 1319, 2015.

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

JEONG, J. K.; SEO, J. S.; MOON, M. H.; LEE, Y. J.; SEOL, J. W.; PARK, S. Y. Hypoxia-inducible factor-1 alpha regulates prion protein expression to protect against neuron cell damage. **Neurobiology of aging**, v. 33, n. 5, p. 1006. e1-1006. e10, 2012.

JU, S. A.; PARK, S. M.; LEE, Y. S.; BAE, J. H.; YU, R.; SUH, J.; KIM, B. S. Administration of 6-gingerol greatly enhances the number of tumor-infiltrating lymphocytes in murine tumors. **International Journal of Cancer**, v. 130, p. 2618-28, 2012.

KAUR, V.; KUMAR, M.; KUMAR, A.; KAUR, K.; DHILLON, V. S.; KAUR, S. Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: Implications in cancer chemoprevention and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 564-586, 2018.

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. 069906, 2015.

KHAN, A. A.; SIDDIQUI, N.; AKHTAR, M.; ALI, Z.; YAR, M. S. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 6-(2-Amino-substituted phenyl)-4-(substituted phenyl)-1, 2, 4-triazine-3, 5 (2H, 4H)-dione Derivatives as Anticonvulsant Agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 349, n. 4, p. 277-292, 2016.

KIM, C. Y.; SEO, Y. LEE, C.; PARK, G. H.; JANG, J. H. Neuroprotective Effect and Molecular Mechanism of [6]-Gingerol against Scopolamine-Induced Amnesia in C57BL/6 Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

KYZAR, E.; GAIKWAD, S.; ROTH, A.; GREEN, J.; PHAM, M.; STEWART, A. et al. Towards high-throughput phenotyping of complex patterned behaviors in rodents: focus on mouse self-grooming and its sequencing. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 2, p. 426-31, 2011.

LEE, H. S.; SEO E. Y.; KIM W. K. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 5, p. 313-319, 2008.

LEE, WAI-LENG.; HUANG, JING-YING.; SHYUR, LIE-FEN. Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

LI, Y.; LI, S.; MENG, X.; GAN, R. Y.; ZHANG, J. J.; LI, H. B. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Breast Cancer. **Nutrients**, v. 9, n. 7, 2017.

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.

LÍŠKA, J.; ONDKOVÁ, S.; MACEJOVÁ, D.; BRTKO, J. Histological evaluation of rat mammary tumours after treatment with retinoic acid analogues — phytol, ttnpb and vitamin d3 analogue seocalcitol. **Biologia**, v. 66, n.2, p. 365-369, 2011.

MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; SOUSA, É. B.; COSTA, I. H. F.; MACHADO, K. C.; de SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Spectroscopic studies on the in vitro antioxidant capacity of isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 225, p. 47-53, 2015.

MASOUD, V.; PAGÈS, G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 8, n. 2, p. 120–134, 2017.

MINARI, J. B.; OGAR, G. O.; BELLO, A. J. Antiproliferative potential of aqueous leaf extract of *Mucuna pruriens* on DMBA-induced breast cancer in female albino rats. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 17, n. 4, p. 331-343, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Ministério da Saúde: Rio de Janeiro; 2013.

MIYATA, M.; FURUKAWA, M.; TAKAHASHI, K.; GONZALES, F.J.; YAMAZOE, Y. Mechanism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced immunotoxicity: role of metabolic activation at the target organ. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 86, p. 302–309.

NOUNOU, M. I.; ELAMRAWY, F.; AHMED, N.; ABDELRAOUF, K.; GODA, S.; SYED-SHA-QHATTAL, H. Breast Cancer: conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies. **Breast Cancer: basic and clinical research**, v. 9, p. 17-34, 2015.

OCHWANG'I, D. O.; KIMWELE, C. N.; ODUMA, J. A.; GATHUMBI, P. K.; KIAMA, S. G.; EFFERTH, T. Cytotoxic activity of medicinal plants of the Kakamega County (Kenya) against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 215, p. 233-240, 2018.

OECD In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, No.489, OECD Publishing, Paris. **Test Guideline TG-489**. 2014. Disponível em: <http://www.oecd-library.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264224179-en> Acesso em 20 julho de 2016.

OECD. Test Guideline 452: Chronic Toxicity Studies. **Guideline for Testing of Chemicals**. Section 4: Health Effects, 2009. Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/test-no-452-chronic-toxicity-studies-9789264071209-en.htm>> Acesso em 20 julho de 2017.

ORIYAMA, T.; YAMAMOTO, T.; YANAGIHARA, Y.; NARA, K.; ABE, T.; NAKAJIMA, K.; SUZUKI, H. Evaluation of the permeation of antineoplastic agents through medical gloves of varying materials and thickness and with varying surface treatments. **Journal of pharmaceutical health care and sciences**, v. 3, n. 1, p. 13, 2017.

PERINI, A. J.; PERINI, J. A.; RODRIGUES-BAPTISTA, K. C.; DE MOURA, R. S.; JUNIOR, A. P.; DOS SANTOS, T. A.; SOUZA, P. J. C.; NASCIUTTI, L. E.; MACHADO, D. E. Euterpe oleracea extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA in breast experimental cancer. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 116, 2018.

PETRELLI, F.; VIALE, G.; CABIDDU, M.; BARNI, S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. **Breast cancer research and treatment**, v. 153, n. 3, p. 477-491, 2015.

PINTO, M.V.; MELLO, F.B.; ROBERTO, J.; MELLO, B. Avaliação toxicológica de preparação fitoterápica contendo Piper methysticum Forst Piperaceae (Kava Kava ®) sobre o

desenvolvimento pré-natal em ratos Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 818-824, 2007.

RASTOGI, N.; DUGGAL, S.; SINGH, S. K.; PORWAL, K.; SRIVASTAVA, V. K.; MAURYA, R.; BHATT, M. L. B.; MISHRA, D. P. Proteasome inhibition mediates p53 reactivation and anti-cancer activity of 6-Gingerol in cervical cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43310, 2015.

RASTOGI, N.; GARA, R. K.; TRIVEDI, R.; SINGH, A.; DIXIT, P.; MAURYA, R.; MISHRA, D. P. (6)-Gingerolinduced myeloid leukemia cell death is initiated by reactive oxygen species and activation of miR-27b expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 288-301, 2014.

ROTHFUSS, A.; HONMA, M.; CZICH, A.; AARDEMA, M. J.; BURLINSON, B.; GALLOWAY, S. Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 723, p. 108-120, 2011.

RUSSO, G. L.; TEDESCO, I.; SPAGNUOLO, C.; RUSSO, M. Antioxidant polyphenols in cancer treatment: friend, foe or foil? In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2017.

SELLERS, R. S.; MORTAN, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; YANO, B. L.; SCHAFER, K. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: OrganWeight Recommendations for Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v.35, p.751-755, 2007.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2017.

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.

SINGH, S.; SHARMA, B.; KANWAR, S. S.; KUMAR, A. Lead phytochemicals for anticancer drug development. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1667, 2016.

SLETTA, K. Y.; TVEITARÅS, M. K.; LU, N.; ENGELSEN, A. S.; REED, R. K.; GARMANN-JOHNSEN, A.; STUHR, L. Oxygen-dependent regulation of tumor growth and metastasis in human breast cancer xenografts. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0183254, 2017.

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

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

VAN 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.

VASQUEZ, M. Z. Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 747, n. 1, p. 142-156, 2012.

WIJNHOFEN, S. W.; KOOL, H. J.; MULLENDERS, L. H. F.; SLATER, R.; ZEELAND, A. A.; VRIELING, H. DMBA-induced toxic and mutagenic response vary dramatically between NER-deficient Xpa, Xpc and Csb mice. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 1099–1106, 2001.

ZINGUE, S.; CISILOTTO, J.; TUECHE, A. B.; BISHAYEE, A.; MEFEGUE, F. A.; SANDJO, L. P.; NDE, C. B. M.; WINTER, E.; MICHEL, T.; NDINTEH, D. T.; AWOUNFACK, C. F.; SILIHE, K. K.; TANEKOU, T. T. M.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; NJAMEN, D. *Crateva adansonii* DC, an African ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity in vitro and prevents experimental mammary tumorigenesis in vivo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 190, p. 183-199, 2016.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O [6]-Gingerol, em concentrações acima de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ induz toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade em *A. cepa*, sendo também indutor de citotoxicidade pela redução da viabilidade em cultura primária de S-180, linhagem HL-60 e PBMC, porém, com maior influência seletiva para células tumorais. Os dados sugerem que os mecanismos citogenéticos tais como toxicidade, citotoxicidade e danos ao DNA são compatíveis com atividade antitumoral para o [6]-Gingerol. Cabe enfatizar que efeitos antitumorais foram evidenciados pela genotoxicidade e mutagenicidade (pontes nucleoplasmáticas, brotos nucleares) em células do líquido ascítico de Sarcoma 180 e indução citotóxica ao diminuir a viabilidade celular, assim como, redução do índice de divisão celular (IDN), e índice de divisão nuclear considerando apoptose e necrose (IDNC) em células de Sarcoma 180. Esses efeitos podem ser associados com a geração de EROs, com similaridade aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio. Corroborando com os efeitos antitumorais observados com o modelo murino de Sarcoma 180, o [6]-Gingerol também induziu genotoxicidade pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA em carcinoma mamário ductal, com mais especificidade para tecido mamário e com danos induzidos ao DNA de linfócitos reparados. Significantes níveis de apoptoses, especialmente em células tumorais foram observados, com efeitos similares ao observado para o antineoplásico CPA. Os estudos de revisão sistemática apontam efeitos antiproliferativos e anti-invasivos do [6]-Gingerol por meio da inibição de ciclinas (A, B1, CDKs, Bcl2), bem como indução apoptótica de células tumorais, a partir do aumento de EROs, p53, p27, p21, BAX e clivagem PARP. Enquanto, o estudo em foco sugere que o [6]-G tem efeitos antitumorais também por mecanismos apoptóticos associados a danos citogenéticos, com potencial para terapia oncológica.

ANEXO A – COMPROVAÇÃO DA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO

Received: 2 February 2018 | Revised: 31 May 2018 | Accepted: 5 June 2018

DOI: 10.1002/ptr.6134

REVIEW

WILEY

Protective and therapeutic potential of ginger (*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: A comprehensive review

Rosália Maria Tôres de Lima^{1,2} | Antonielly Campinho dos Reis² |
 Ag-Anne Pereira Melo de Menezes^{1,2} | José Victor de Oliveira Santos² |
 José Williams Gomes de Oliveira Filho^{1,2} | José Roberto de Oliveira Ferreira³ |
 Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar^{1,2} | Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata^{1,2} |
 Ishaq N. Khan⁴ | Amirul Islam⁵ | Shaikh Jamal Uddin⁵ | Eunūs S. Ali⁶ |
 Muhammad Torequl Islam^{7,8} | Swati Tripathi⁹ | Siddhartha Kumar Mishra¹⁰ |
 Mohammad S. Mubarak¹¹ | Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^{1,2}

¹ Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

² Laboratory of Genetical Toxicology, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

³ Laboratory of Experimental Cancerology, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

⁴ Institute of Basic Medical Sciences, Khyber Medical University, Peshawar, Pakistan

⁵ Pharmacy Discipline, School of Life Sciences, Khulna University, Khulna, Bangladesh

⁶ Gaco Pharmaceuticals and Research Laboratory, Dhaka-1000, Bangladesh; College of Medicine and Public Health, Flinders University, Bedford Park, Australia

⁷ Department for Management of Science and Technology Development, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁸ Faculty of Pharmacy, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁹ Amity Institute of Microbial Technology, Amity University, Noida, India

¹⁰ Cancer Biology Laboratory, School of Biological Sciences (Zoology), Dr. Harisingh Gour Central University, Sagar, India

¹¹ Department of Chemistry, The University of Jordan, Amman, Jordan

Correspondence

Muhammad Torequl Islam, Department for Management of Science and Technology Development, & Faculty of Pharmacy, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam.
 Email: muhammad.torequlislam@tdt.edu.vn

Mohammad S. Mubarak, Department of Chemistry, The University of Jordan, Amman 11942, Jordan.
 Email: mmubarak@ju.edu.jo

Present Address

Eunūs S. Ali, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Northwestern University Feinberg School of Medicine, 320 E Superior St, Chicago, IL 60611, USA.

Natural dietary agents have attracted considerable attention due to their role in promoting health and reducing the risk of diseases including cancer. Ginger, one of the most ancient known spices, contains bioactive compounds with several health benefits. [6]-Gingerol constitutes the most pharmacologically active among such compounds. The aim of the present work was to review the literature pertaining to the use of ginger extract and [6]-gingerol against tumorigenic and oxidative and inflammatory processes associated with cancer, along with the underlying mechanisms of action involved in signaling pathways. This will shed some light on the protective or therapeutic role of ginger derivatives in oxidative and inflammatory regulations during metabolic disturbance and on the antiproliferative and anticancer properties. Data collected from experimental (in vitro or in vivo) and clinical studies discussed in this review indicate that ginger extract and [6]-gingerol exert their action through important mediators and pathways of cell signaling, including Bax/Bcl2, p38/MAPK, Nrf2, p65/NF- κ B, TNF- α , ERK1/2, SAPK/JNK, ROS/NF- κ B/COX-2, caspases-3, -9, and p53. This suggests that

ANEXO B – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Manuscript Details

Manuscript number	BIOPHA_2018_5676
Title	Toxic/cytotoxic, cytogenetic and antitumor evaluation of [6]-gingerol in non-clinical studies
Article type	Research Paper

Abstract

[6]-gingerol ((S)-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone) ([6]-G) is a phenolic compound with pharmacological properties. The aim of the study was to evaluate the toxicogenic effects of [6]-G on *Artemia salina*, *Allium cepa*, *Saccharomyces cerevisiae* and antitumor activity on ascitic fluid cells of Sarcoma 180 (S-180) and HL-60. In the toxic and genotoxic analyzes the concentrations of 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, being that, on cytotoxic evaluation by means of the MTT test (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) serial dilutions (1.56 - 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) in S-180, HL-60 lineage and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). In the MTT test, the inhibitory concentration (CI50) of [6]-G showed better cytotoxic efficiency in HL-60 (1.14) and S-180 (5.73), requiring a higher CI50 in PBMC (11.18), indicating its possible selectivity. The lowest tested concentration (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of [6]-G showed no toxic and oxidative effects on *A. cepa* and *S. cerevisiae*, respectively. However, at higher concentrations (> 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) toxicity and genotoxicity were observed mainly at 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in the *A. cepa*. Cytogenetic mechanisms indicative of apoptosis, such as toxicity, cytotoxicity and nuclear abnormalities (bridges, fragments, delays, loose chromosomes and micronuclei) suggest that [6]-G is a compound of importance for antitumor pharmaceutical formulations.

Keywords	[6]-gingerol; antioxidant; toxicogenic; antitumor.
Manuscript region of origin	South America
Corresponding Author	João Marcelo Sousa
Corresponding Author's Institution	Federal University of Piauí
Order of Authors	Rosalia Maria Tôrres de Lima, Antonielly Campinho dos Reis, José Victor de Oliveira Santos, José Roberto de Oliveira Ferreira, Antônio Lima Braga, José Williams Gomes de Oliveira Filho, Ag-Anne Pereira Melo de Menezes, Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata, Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar, Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade, Paulo Ferreira, Juan Carlos Ramos Goncalves, João Marcelo Sousa, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

ANEXO C – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Rosália Maria Tôrres de Lima,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Chemosphere

Title: Antitumoral Effects of [6]-Gingerol [(S)-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone] in Sarcoma 180 through Cytogenetic Mechanisms

Corresponding Author: Siddhartha Mishra

Co-Authors: Rosália Maria Tôrres de Lima; Antonielly Campinho dos Reis; José Victor de Oliveira Santos; José Roberto de Oliveira Ferreira; José Williams Gomes de Oliveira Filho; Ana Carolina Soares Dias; Ag-Anne Pereira Melo de Menezes; Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata; Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar; Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade; Márcia Fernanda Correia Jardim Paz; Débora Caroline do Nascimento Rodrigues; Paulo Michel Pinheiro Ferreira; João Marcelo de Castro e Sousa; Muhammad Torequi Islam; Ana Amélia de Carvalho Melo cavalcante

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: [https://ees.elsevier.com/chem/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Rosália Maria&lname=Tôrres de Lima&email=rosaliatlma@gmail.com](https://ees.elsevier.com/chem/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Rosália%20Maria&lname=Tôrres%20de%20Lima&email=rosaliatlma@gmail.com)

Or log in: <https://ees.elsevier.com/chem/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=rosaliatlma@gmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at siddharthakm@yahoo.com; siddhartha.km@gmail.com.

Thank you,

Chemosphere

ANEXO D – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Journal of Pharmacy and Pharmacology <onbehalfof+JPPedoffice+wiley.com@manuscriptcentral.com>

Sab, 08/março/2019 15:32

Você;

rbiotufpi.br@gmail.com;

8

08-Mar-2019

Dear Dr. Alencar:

Your manuscript entitled " Antitumoral effects of 6-Gingerol in 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary carcinomas in mice" by Lima, Rosalia; Alencar, Marcus; Reis, Antonielly; Santos, Victor; Oliveira Filho, Williams; Alves, Leane; Menezes, Ag-Anne ; Mata, Ana ; Dias, Ana; Alves, Even; Islam, Muhammad; Lopes, Luciano; Sousa, João; Melo-Cavalcante, Ana, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Pharmacy and Pharmacology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is JPP-19-0804.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/jppharm> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jppharm>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Pharmacy and Pharmacology.

Sincerely,

Journal of Pharmacy and Pharmacology Editorial Office

ANEXO E – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – UFPI

	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL <small>Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceoapi@ufpi.edu.br</small>	
---	---	---

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/ sw/iss
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^a. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora