



**RENORBIO**  
**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**

**AMANDA MARA TELES**

**CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA**  
**DO EXTRATO DE *Penicillium purpurogenum* DE AMBIENTE**  
**MARINHO EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO* E *IN VIVO***

**São Luís - MA**  
**2020**

**AMANDA MARA TELES**

**CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA  
DO EXTRATO DE *Penicillium purpurogenum* DE AMBIENTE  
MARINHO EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Coorientadores: Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo Santos e Prof. Dr. Fernando Almeida Souza

São Luís - MA  
2020

Teles, Amanda Mara.

Caracterização de metabólitos e atividade citotóxica do extrato de *Penicillium purpurogenum* de ambiente marinho em modelo de câncer de mama *in vitro* e *in vivo*. / Amanda Mara Teles. – São Luís, 2019.

149 f

Coorientadores: Ana Paula Silva de Azevedo e Fernando Almeida Souza.

Orientadora: Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia–Renorbio/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luis (MA), 2020.

1. Câncer. 2. Tumor de Ehlich. 3. *Penicillium purpurogenum*  
4. Antitumoral. 5. Meroterpenoides. I. Silva de Azevedo Santos, Ana Paula. II. Almeida Souza, Fernando. III. Soares Brandão Nascimento Maria do Desterro. IV. Título



Universidade Federal do Maranhão  
Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís - MA, 65080-805 [Telefone: \(98\) 3272-8000](tel:(98)3272-8000) E-mail: [renorbio@ufma.br](mailto:renorbio@ufma.br)  
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

## FOLHA APROVAÇÃO DEFESA DA TESE

**ALUNO:** Amanda Mara Teles

**TÍTULO DO PROJETO: “CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO DE *Penicillium purpurogenum* DE AMBIENTE MARINHO EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO* E *IN VIVO*”**

**PROFESSORA ORIENTADORA:** Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

BANCA EXAMINADORA	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento <b>UFMA – Presidente</b>	_____	_____
Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva <b>UEMA – Titular</b>	_____	_____
Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade <b>UFMA – Titular</b>	_____	_____
Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges <b>UFMA – Titular</b>	_____	_____
Rui Miguel Gil da Costa Oliveira <b>UFMA – Titular</b>	_____	_____
Cristina Andrade Monteiro <b>CEUMA – Suplente</b>	_____	_____
Maria do Socorro de Sousa Cartágenes <b>UFMA – Suplente</b>	_____	_____
Lidio Gonçalves Lima Neto <b>CEUMA – Suplente</b>	_____	_____

**DATA DA APROVAÇÃO:**

**HORÁRIO:**

**LOCAL:**

**AMANDA MARA TELES**

**CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO DE  
*Penicillium purpurogenum* DE AMBIENTE MARINHO EM MODELO DE CÂNCER DE  
MAMA *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia-Área de Concentração em Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em : de de 2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

*Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento*  
UFMA - Orientadora

---

*Prof. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos*  
UEMA – Co-Orientadora

---

*Prof. Dr. Fernando Almeida de Souza*  
UFMA – Co-Orientador

---

*Prof. Dr. Ana Lúcia Abreu Silva*  
UFMA – 1º Examinador

---

*Profa. Dra. Antônio Carlos Romão Borges*  
UEMA - 2º Examinador

---

*Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade*  
UFMA - 3º Examinador

---

*Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira*  
UFMA - 4º Examinador

---

*Prof. Dra. Cristina Andrade Monteiro*  
CEUMA - Suplente

---

*Prof. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes*  
UFMA – Suplente

---

*Prof. Dr. Lidio Gonçalves Lima Neto*  
CEUMA – Suplente

*Esta Tese de Doutorado é dedicada  
A minha querida e amada Mãe,  
Maria do Socorro Teles*

*Estarei eternamente grata pelo vosso amor incondicional e dedicação... Onde quer que esteja, estará sempre no meu coração...*

*Eu carrego o seu coração comigo (Eu o carrego dentro do meu coração)*

*Eu nunca estou sem ele, Aonde quer que eu vá, você vai comigo, Minha Querida...*

*E o que quer que eu faça, faço por você, Minha Amada!.....*

*Não quero o mundo... por mais belo que seja,*

*Pois você é meu mundo, minha verdade..*

*E você é o que quer que a lua signifique, Ou qualquer coisa o que o sol cante...*

*Eis o segredo mais profundo que ninguém sabe! Aqui está a raiz a raiz e o broto do broto, E o céu do céu de uma árvore chamada vida...*

*Que cresce mais alto do que a alma pode ansiar, Ou a mente possa esconder..*

*Aqui está o fenômeno que mantém as estrelas separadas..*

*Eu carrego o seu coração comigo...( eu o carrego dentro do meu coração)*

*E.E.Cummings*

*“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”*

*Charles Chaplin*

*"É preciso começar a perder a memória, ainda que se trate de fragmentos desta, para perceber que é esta memória que faz toda a nossa vida. Uma vida sem memória não seria uma vida, assim como uma inteligência sem possibilidade de exprimir-se não seria uma inteligência. Nossa memória é nossa coerência, nossa razão, nossa ação, nosso sentimento. Sem ela, não somos nada."*

*(Luis Buñuel)*

*E ainda aos que conheceram esta doença de perto, ou ainda sofrem com o câncer, que Deus em sua infinita sabedoria um dia permita em fim a descoberta da cura...*

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada mãe Maria do Socorro Teles (*in memoriam*), pois em sua simplicidade ensinou-me a ler e a escrever. E por todo seu apoio que em vida proporcionou aos meus estudos e pelo grande estímulo durante todas as fases da minha vida. Estímulos estes, sem os quais, esta importante etapa da minha vida acadêmica não seria possível.

A minha avó, Maria do Carmo, que apesar da distância geográfica sempre foi uma pessoa presente em minha vida e por ser um grande exemplo de vida.

Aos meus queridos irmãos, Rafaela e João Neto, por sua amizade, momentos de descontração, apoio e incentivo. Neto todas as caronas meu muito obrigado. A minha amada tia Claudia, uma pessoa muitíssimo especial para mim, pois sempre esteve ao meu lado e foi grande incentivadora dos meus estudos e é claro por sua amizade eterna.

Aos meus tios e tias, por ser um exemplo para mim de pessoas que persistem e lutam por aquilo em que acreditam e que é possível realizar o seu sonho mesmo que outros digam que não é possível. A prima Andrea Teles que me alugou o notebook aos fins de semana, eternamente grata. A todos os meus familiares que contribuíram direta e indiretamente para que eu chegasse onde estou hoje.

Enfim, a todas as pessoas que passaram na minha vida e me influenciaram de alguma forma, mas não foram citadas, tenham certeza de que vocês são importantes para mim, e também às pessoas que irão ler este trabalho, com o qual eu espero que sirva de alguma forma como fonte de conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

À Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), em especial ao ponto focal do Maranhão sob a coordenação do Prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel e a toda sua equipe.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento pelo seu papel fundamental na concepção e desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Ao Laboratório de Micologia localizado no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão na pessoa da Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra pela cepa de fungo cedida e toda a infraestrutura para obtenção dos extratos durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Paula Azevedo pelo seu apoio, amizade, orientação.

Ao Laboratório de laboratório de Imunologia Aplicado ao Cancer-LIAC da UFMA na pessoa da Dra. Ana Paula Azevedo e a todos os alunos que contribuíram com esta pesquisa. Assim como ao Laboratório de Imunofisiologia-LIF da UFMA utilizando o modelo de tumor de Ehrlich, gentilmente cedido pela professora Dra. Flavia Nascimento e pela a infra estrutura utilizada assim como a todos os alunos do LIF que contribuíram com a nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Rui M. Gil da Costa pelo seu apoio, colobaração e orientação.

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) na pessoa da Profa. Dra. Ana Lucia Abreu pela utilização do microscópio para realização das fotos do histológico.

Ao Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia/IOC/FIOCRUZ Rio de Janeiro onde realizei as análises *in vitro*. na pessoa da Pesquisadora Dra. Kátia da Silva Calabrese e do professor Dr. Fernando Almeida por toda orientação recebida.

Ao Laboratório de Química da UFMA onde realizei algumas análises, na pessoa da Professora Dra. Adenilde Nascimento Mouchrek por toda infraestrutura cedida.

À Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela bolsa concedida.



*A minha querida e amada mãe Maria do Socorro Teles e a minha doce avó Maria do Carmos Teles Cabral pelo exemplo, oportunidade e incentivo aos estudos.*

TELES, AMANDA MARA. **CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO DE *Penicillium purpurogenum* DE AMBIENTE MARINHO EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO* E *IN VIVO***. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2020.

## RESUMO

O microfungo é uma fonte promissora e ainda pouco explorada de novas substâncias químicas direcionadas a atividade antitumoral, que neste cenário representam uma área com potencial de desenvolvimento. Para melhor elucidar o papel do extrato de *Penicillium purpurogenum*, este estudo investigou o efeito antitumoral *in vitro* em células tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e em modelo *in vivo* de tumor murino de Ehrlich. O extrato de *P. purpurogenum* foi fermentado por 21 dias, filtrado, concentrado e liofilizado, dando origem a dois extratos: de acetato de etila do caldo (FR1) e da biomassa micelial (FR2). Para a determinação da composição química dos extratos foi realizado análise química por infusão direta (ESI/MS). Para avaliação da citotoxicidade foi utilizado o ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]), com as linhagens de câncer de mama nos tempos de 24, 48 e 72 horas. No ensaio *in vivo* com tumor de Ehrlich foram utilizados camundongos da linhagem Swiss fêmeas separadas em sete grupos (n=10/grupo). O tratamento intraperitoneal foi feito diariamente, com solução tampão fosfato no grupo controle negativo (CTL-), com ciclofosfamida (25 mg/kg) no grupo controle positivo (CTL+) e com o extrato de fungo (FR1) nas doses 4, 20 e 100 mg/kg no grupo experimental. Metade dos animais de cada grupo foram eutanasiados 15 dias após o inóculo do tumor, e a outra metade foi mantida viva para acompanhamento da sobrevida. O desenvolvimento tumoral foi avaliado pelo peso dos animais, volume e área da pata inoculada e, após a eutanásia, o peso tumor. O sangue total foi coletado para determinação de parâmetros hematológicos. Baço, medula e linfonodo drenante foram obtidos para realização da contagem das células linfóides. Fragmentos da pata com tumor, rim e fígado foram avaliados histopatologicamente. Os resultados da análise química demonstraram que os extratos FR1 e FR2 são ricos em meroterpenoides. Na avaliação *in vitro* o extrato FR1 apresentou citotoxicidade com IC<sub>50</sub>, mas baixos quando comparados a FR2, para MCF-7 com IC<sub>50</sub> de 43,97µg/mL, 23,01µg/mL e 13,85µg/mL, enquanto que, para a MDA-MB-231, IC<sub>50</sub> de 170µg/mL, 44,60µg/mL e 25,46µg/mL em 24, 48 e 72h, respectivamente. Na verificação do índice de sensibilidade (IS) foi observado que ambos os extratos mostraram uma melhor seletividade do que as drogas padrões. No ensaio *in vivo*, o desenvolvimento do tumor após tratamento demonstrou que os grupos tratados com FR1, em todas as doses, e CTL+ apresentaram uma redução significativa da área do tumor quando comparados ao CTL-. O tratamento com FR1 promoveu ainda um aumento da expectativa de vida dos animais portadores de tumor. A celularidade dos órgãos linfóides dos animais tratados com FR1 apresentou uma redução dose dependente quando comparadas ao CTL-. Ao avaliar as citocinas no soro dos animais, a produção de TNF-α foi maior no grupo sem indução tratado com o extrato quando comparado ao CTL-. Não houve alteração dos parâmetros hematológicos analisados em nenhum dos grupos. Em relação à análise histopatológica, os grupos tratados com o extrato nas doses de 20 e 100mg/kg apresentaram infiltrados inflamatórios menos intensos. Os grupos tratados com maior concentração do extrato exibiram menores áreas de necrose. Estes resultados indicam que o extrato de *P. purpurogenum* exibe propriedade antitumoral, sugerindo ainda que seu papel imunomodulador estaria envolvido nessa resposta.

**Palavras-chave:** Câncer, tumor de Ehrlich, *Penicillium purpurogenum*, antitumoral, meroterpenoides, MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A

TELES, AMANDA MARA. **CHARACTERIZATION OF METABOLITES AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF *Penicillium purpurogenum* EXTRACT DERIVED FROM A MARINE ENVIRONMENT IN AN *IN VITRO* AND *IN VIVO* BREAST CANCER MODEL** Thesis (Doctorate in Biotechnology). Post-graduate Program in Biotechnology of the Northeast Network of Biotechnology, Focal Point Federal University of Maranhão, São Luís - MA, 2020.

## ABSTRACT

Microfungi are a promising yet unexplored source of new chemical substances with antitumor activity, which in this scenario represent an area with potential for development. To further elucidate the role of *Penicillium purpurogenum* extract, this study investigated the *in vitro* antitumor effect on breast tumor cells (MDA-MB-231 and MCF-7) and an *in vivo* murine Ehrlich tumor model. *P. purpurogenum* was fermented for 21 days, filtered, concentrated and lyophilized, giving rise to two extracts: ethyl acetate extract of the broth (FR1) and of the mycelial biomass (FR2). For the determination of the chemical composition of the extracts a chemical analysis was performed by direct infusion (ESI/MS). For the evaluation of the cytotoxicity, a MTT [(3-fluorouracil-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] assay was performed with cancer cell lines in the times of 24, 48 and 72 hours. In the *in vivo* experiment with Ehrlich's tumor, Swiss females were separated into seven groups (n = 10 / group). The intraperitoneal treatment was done daily with phosphate buffer solution in the negative control group (CTL-), with cyclophosphamide (25 mg/kg) in the positive control group (CTL+) and the fungus extract (FR1) at doses 4, 20 and 100 mg/kg in the experimental group. Half of the animals in each group were euthanized 15 days after tumor inoculation, and the other half was kept alive for survival follow-up. Tumor development was evaluated by the weight of the animals, volume and area of the inoculated paw and, after euthanasia, the tumor was weighted. Total blood was collected for the determination of haematological parameters. Spleen, medulla and draining lymph node were obtained for lymphoid cell count. Fragments of the paw with tumor, kidney and liver were histopathologically evaluated. The results of the chemical analysis demonstrated that extracts FR1 and FR2 are rich in meroterpenoids. In the *in vitro* evaluation, the FR1 extract presented cytotoxicity for MCF-7 with IC50 values of 43.97 µg / mL, 23.01 µg / mL and 13.85 µg / mL. For MDA-MB-23, IC50 values found were of 170 µg / mL, 44.60 µg / mL and 25.46 µg / mL in 24, 48 and 72 h, respectively. All these values were lower when compared to FR2. In the verification of the sensitivity index (SI) it was observed that both extracts showed a better selectivity than the standard drugs. In the *in vivo* assay, tumor development after treatment demonstrated that the FR1, at all doses, and CTL + treated groups showed a significant reduction of tumor area when compared to CTL-. Treatment with FR1 also promoted an increase in the life expectancy of the tumor bearing animals. The cellularity of the lymphoid organs of FR1 treated animals presented a dose-dependent reduction when compared to CTL-. When evaluating the cytokines in the serum of the animals, TNF-α production was higher in the non-induction group treated with the extract when compared to CTL-. There was no change in the haematological parameters analyzed in any of the groups. Regarding the histopathological analysis, the groups treated with the extract at doses of 20 and 100 mg/kg presented less intense inflammatory infiltrates. The groups treated with higher concentrations of the extract showed smaller areas of necrosis. These results indicate that the extract of *P. purpurogenum* exhibits antitumor property, suggesting that its immunomodulatory role would be involved in this response.

**Key words:** Cancer, Ehrlich tumor, *Penicillium purpurogenum*, antitumoral, meroterpenoids, MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Número estimado de novos casos mundiais de câncer de mama em 2018 .....	24
Figura 2- Mortalidade por câncer de mama no Brasil de 2006 a 2018.....	26
Figura 3- Mortalidade por câncer de mama no Maranhão e em São Luis 2008 a 2020. ....	27
Figura 4 - Esquema experimental do cultivo do fungo <i>Penicillium purpurogenum</i> .....	66
Figura 5 - Esquema experimental apresentando o processo de fermentação após 28 dias.....	67
Figura 6 - Esquema experimental apresentando o tratamento recebido pelo caldo do processo de fermentação.....	67
Figura 7 - Esquema experimental apresentando o processo de tratamento do extrato concentrado após o processo de concentração do caldo de fermentação.....	68
Figura 8 - Esquema experimental apresentando o processo de tratamento dos micélios do fungo após o processo de concentração do caldo de fermentação.....	69
Figura 9 - Divisão dos grupos experimentais.....	73
Figura 10 - Espectros de massas obtidos para as substancias presentes nos extratos de acetato de etila (FR1 e FR2) de <i>P. purpurogenum</i> . ....	80
Figura 11 - Efeito citotóxico dos extratos de <i>P. purpurogenum</i> em linhagens de células de mama, nos tempos 24, 48 e 72h dos extratos (FR1 e FR2) e os controles positivos doxorrubicina (DOX) e paclitaxel (PAC).....	82
Figura 12. Efeito do extrato <i>P. purpurogenum</i> no desenvolvimento do tumor de Ehrlich.....	84
Figura 13 - Infiltração leucocitária em tumores de Ehrlich com e sem tratamentos. Infiltrados leucocitários em tumores de Ehrlich. ....	87
Figura 14 - Efeito do tratamento com a extrato de <i>P. purpurogenum</i> sobre os órgãos linfoides. ....	89
Figura 15 - Efeito do Extrato sobre as concentrações de citocinas no soro dos animais portadores de tumor solido de Ehrlich.....	90
Figura 16 - Analise da Sobrevida do tumor solido de Ehrlich.. ....	92
Figura 17 - Curvas cineticas (24, 48 e 72h) relacionando a citotoxicidade e as concentrações dos extratos e drogas padrões testadas nas linhagens celulares....	147

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Estadiamento do câncer de mama segundo o sistema TNM .....	30
Tabela 2 Os principais subgrupos distinguidos pelos métodos histopatológicos e patológicos moleculares. ....	31
Tabela 3. Agentes antineoplásicos mais empregados na clínica e seus mecanismos .....	39
Tabela 4. Características das principais linhagens celulares relacionadas ao câncer de mama. ....	43
Tabela 5. Compostos antitumorais frente a linhagens de câncer de mama isolados a partir de fungos endófitos extraídos de plantas. ....	52
Tabela 6. Principais metabólitos bioativos isolados dos extratos de <i>P. purpurogenum</i> .....	58
Tabela 7. Compostos químicos produzidos por <i>Penicillium purpurogenum</i> após mutagêneses com antibióticos. ....	61
Tabela 8- Íons moleculares das substâncias encontradas nos extratos FR1 e FR2 de <i>P. purpurogenum</i> . ....	79
Tabela 9 - Índice de seletividade dos extratos de <i>P. purpurogenum</i> e de drogas de referência em relação a concentração inibitória para células normais de mama MCF 10A e células de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231 .....	83
Tabela 10 - Média dos escores relacionados aos parâmetros histopatológicos do tumor de Ehrlich obtido dos grupos tratados com PBS, Ciclofosfamida e extrato FR1. ....	85
Tabela 11 - Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos de Swiss .....	91
Tabela 12 - Concentração inibitória de 50% das células de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231 e células normais de mama MCF 10A após tratamento com extratos de <i>P. purpurogenum</i> , doxorrubicina ou paclitaxel .....	148

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos Realizados.....	20
3	REVISÃO DE LITERATURA .....	21
3.1	Aspectos gerais sobre o câncer .....	21
3.2	Câncer de mama.....	23
3.2.1	Incidência da doença .....	23
3.2.2	Fatores de risco.....	28
3.2.3	Classificação da doença e aspectos gerais do diagnóstico por imagem .....	29
3.2.3.1	Estadiamento .....	30
3.2.3.2	Classificação Molecular .....	31
3.2.3.3	Tratamento do CM e alvos farmacológicos utilizados.....	35
3.2.3.4	Radioterapia .....	36
3.2.3.5	Quimioterapia.....	36
3.2.3.6	Imunoterapia.....	39
3.2.3.7	Eletroporação .....	41
3.3	Linhagens celulares para estudos <i>in vitro</i> .....	42
3.4	Modelo <i>in vivo</i> .....	44
3.4.1	Tumor de Ehrlich.....	46
3.5	Bioprodutos isolados de fungos como agentes antitumorais no tratamento do câncer de mama.....	51
3.5.1	Gênero <i>Penicillium</i> .....	55
3.5.2	<i>Penicillium purpurogenum</i> .....	56
3.5.3	Atividades biológicas em cepas selvagens de <i>P. purpurogenum</i> .....	57
3.5.4	Atividades anticâncer em cepas de <i>P. purpurogenum</i> .....	60
3.5.5	Meroterpenóides e o <i>P. purpurogenum</i> .....	63
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
4.1	Obtenção do Fungo .....	66
4.2	Cultivo de fungo <i>P. purpurogenum</i> .....	66
4.3	Obtenção do Extrato de fungo .....	67
4.4	Avaliação da composição química dos extratos FR1 e FR2 por infusão direta (ESI/MS).....	69
4.5	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> .....	70
4.5.1	Cultura Celular .....	70

4.5.2	Citotoxicidade dos extratos FR1 e FR2 de <i>Penicilium purpurogenum</i> .....	70
4.5.3	Índice de seletividade .....	71
4.6	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> .....	72
4.6.1	Local de experimentação .....	72
4.6.2	Animais e aspectos éticos .....	72
4.6.3	Inoculação do tumor e tratamento dos animais .....	72
4.6.4	Índice da qualidade de sobrevivência.....	74
4.6.5	Avaliação do desenvolvimento tumoral .....	74
4.6.6	Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	74
4.6.7	Avaliação da celularidade nos órgãos linfoides .....	75
4.7	Quantificação de citocinas .....	75
4.8	Avaliação histopatológica.....	75
4.9	Análise estatística .....	76
5	RESULTADOS .....	78
5.1	Caracterização química do extrato de <i>P. purpurogenum</i> .....	78
5.2	Citotoxicidade dos extratos FR1 e FR2 frente a linhagens celulares MCF-7, MDA-MB231 e MCF10A.....	81
5.3	Avaliação do Efeito do extrato FR1 no desenvolvimento do Tumor sólido de Ehrlich 83	
5.4	Análise histopatológica do tumor de Ehrlich em animais tratados diariamente com o extrato FR1 de <i>P. purpurogenum</i> .....	85
5.5	Avaliação da Celularidade dos órgãos Linfoides.....	88
5.6	Efeito dos Extratos sobre as concentrações de citocinas no soro dos animais portadores de tumor sólido de Ehrlich.....	90
5.7	Avaliação dos Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	91
5.8	Avaliação do extrato FR1 sobre a sobrevivência de animais portadores de carcinoma sólido de Ehrlich.....	91
6	DISCUSSÃO .....	93
7	CONCLUSÃO.....	106
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	107
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108
	ANEXO A .....	140
	ANEXO B .....	143
	ANEXO C .....	144
	ANEXO D .....	147
	ANEXO E.....	148
	ANEXO F.....	149

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de grande complexidade, tratando-se de uma patologia multifatorial em que estão envolvidas diversas vias bioquímicas e imunológicas. Esta doença é caracterizada por um crescimento anormal de células além dos seus limites, o que pode ocasionar a invasão de partes adjacentes do corpo ou mesmo a migração de células tumorais para outros órgãos, processo denominado metástase, que é a principal causa de morte por câncer (WHO, 2015).

Dentre os diversos tipos desta doença, encontra-se o câncer de mama (CM) como a neoplasia de maior incidência na população feminina mundial (GLOBOCAN, 2008; JEMAL et al., 2011). O CM é uma das principais causas de óbito por câncer feminino no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018), que chegou a 17.572 obitos em 2018 (INCA, 2020; FERLAY et al., 2010). No Brasil foram estimados aproximadamente 59.700 casos novos de câncer de mama, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018)

Com isto, estudos avançam no desenvolvimento de melhores métodos diagnósticos e de tratamento para o CM. Em 2019, mais de vinte e quatro mil publicações foram registradas na página eletrônica da US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed) afirmando uma enorme busca por novas estratégias terapêuticas frente ao câncer em todo mundo.

Com base na quantidade de pesquisas relacionadas ao CM, observa-se que existe uma necessidade urgente de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos ou preventivos para esse câncer. Dentro disto, os fitomedicamentos ou fitoterápicos recebem destaque na literatura com novos mecanismos moleculares fornecendo uma área potencial para tal desenvolvimento (SHANG et al., 2018). Portanto, substâncias bioativas em potencial estão sendo desenvolvidas e/ou extraídas com base na sua atividade seletiva contra alvos moleculares relacionados ao câncer (KUSARI et al., 2012).

Essas substâncias bioativas podem ser obtidas através de microrganismos e por seus metabólitos que demonstram potenciais anticancerígenos, tornando-se alvo de diversas pesquisas em explorar tais atividades dos mesmos frente a linhagens celulares do CM (CALDERANI et al., 2018). O interesse de pesquisas em microfungos como fonte de componentes ativos tem tido um notável aumento, e uma



atenção particular foi dada ao *Penicillium* que surgem como grandes produtores de meroterpenóides e suas aplicações já são usadas em diversas áreas da medicina e biotecnologia, como anticancerígenos ou agentes imunomoduladores (SAMSON et al., 2014).

Dentre os fungos do gênero *Penicillium*, destaca-se o *Penicillium purpurogenum* como um fungo de ambiente marinho, sendo fortemente enfatizado por seu potencial biológico, demonstrando possuir metabólitos secundários presentes e interessantes para estudos antitumorais.

Essa espécie, acompanhando as propriedades do seu gênero, apresenta uma constituição rica em meroterpenóides, e os estudos têm comprovado que o extrato de *P. purpurogenum* tem um potencial anti-cancerígeno e anti-inflamatório correlacionando a ações biológicas aos metabólitos secundários presentes. A afirmação anterior é comprovada por Chai et al. (2012) e Wu et al. (2014) ao estudarem o extrato do *P. purpurogenum* de ambiente marinho, onde observaram a presença de metabólitos secundários com potencial anti-cancerígeno. Li et al. (2017) demonstraram que a cepa de *P. purpurogenum* MHZ 111 possuía meroterpenóides com propriedades anti-inflamatórias. Xia et al. (2017) e Wu et al. (2015) ao pesquisarem a cepa de *P. purpurogenum* G59 observaram que os metabólitos presentes tinham efeito citotóxico frente a linhagem K562.

Em estudos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), pesquisou-se a presença de fungos em solos e ambientes marinhos da região litorânea maranhense e foi encontrada cepa de *P. purpurogenum*. Esta encontra-se depositada na coleção de fungos do Laboratório de Micologia localizado no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão e foi cedido pela Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra.

A presença deste fungo propiciou pesquisas produzindo extrato de fungo e caracterizando quimicamente esse extrato assim como demonstrar uma efetiva atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* nunca antes descrita para uma cepa *P. purpurogenum* da região maranhense, de ambiente marinho poluído e que não sofreu nenhuma mutação em laboratório. Considerou-se, ainda, o fato de ser uma cepa de fungo que pode ser cultivada em larga escala, sendo capaz de produzir metabólitos extra e intracelulares, gerando fármacos e/ou medicamentos que podem ser usados como adjuvantes no tratamento de câncer.

Teve-se como hipótese que o extrato de fungo de ambiente marinho poluído que não sofreu mutação em laboratório atua seletivamente contra células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), além de melhorar a resposta dos camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich. Diante disto, surge o interesse desta pesquisa por metabólitos derivados de um microrganismo que possam ser utilizados como protótipos de novos medicamentos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar os metabólitos e avaliar o potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* de extrato de *P. purpurogenum* em linhagens de câncer de mama.

### 2.2 Objetivos Específicos Realizados

- Obter e caracterizar quimicamente os extratos de *P. purpurogenum*;
- Determinar por meio de Espectrometria de Massa Tandem com Ionização por Electropulverização (ESI-MS/MS) componentes químicos presentes nas amostras de extrato de fungo;
- Verificar o potencial citotóxico dos extratos de fungo sobre linhagem de adenoma carcinoma mamário receptor hormonal positivo MCF-7 e receptor hormonal negativo MDA-MB-231 e na célula de mama normal MCF-10A;
- Avaliar no modelo de tumor de Ehrlich a atividade antitumoral do extrato de fungo com maior potencial citotóxico *in vitro*;
- Estimar a sobrevivência dos animais tratados com extrato em presença ou não do tumor de Ehrlich;
- Aferir a celularidade dos órgãos linfóides (baço, medula e linfonodo) nos animais com tumor de Erlich tratados com fração de *P. purpurogenum*;
- Pesquisar os parâmetros bioquímicos e citocinas no soro de animais com tumor de Erlich tratados com fração de *P. purpurogenum*;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Aspectos gerais sobre o câncer

O câncer é uma das doenças mais desafiadoras para ciência desde o século XIX (BELLO, 2010). Esse termo derivado do grego *Karkinos* e do latim *cancri*, significa “caranguejo”. Tal comparação possui semelhança entre as veias dilatadas de um tumor e as pernas do animal, assim como também pela agressividade e imprevisibilidade de ambos (BUENO, 2003).

Os primeiros registros da doença decorrem do Egito, onde os primeiros relatos foram gravados com ideogramas sobre lâminas delgadas de papiros, no ano 1.600 a.C. em que se encontra a descrição de quarenta e oito casos médicos de forma bastante racional e dedicado a clínica cirúrgica. Um dos casos é intitulado como “Instruções relativas a tumores protuberantes nas mamas” e representa o primeiro registro de descrição de um câncer de mama (CM). (BLAND&COPELAND, 1993; BELLO, 2010).

O processo de descrição dos tipos de câncer teve um relativo progresso com a invenção do microscópio em 1529 quando se estabeleceu a importância da anatomia na descrição e no diagnóstico de diversos tipos de câncer (SUTELIFFE, 1992). Mesmo com todo o processo de descrição dessas doenças em diversas partes do mundo, só no final do século XIX e início do século XX é que o câncer começa a surgir nos países desenvolvidos como um problema de saúde pública em substituição as doenças endêmicas (BELLO, 2010).

Neste período, ocorreu o processo de reorganização global que determinou grande modificação nos padrões de saúde-doença no mundo, a transição epidemiológica. Essa transição se deu pela mudança no perfil de mortalidade com diminuição da taxa de doenças infecciosas e aumento concomitante da taxa de doenças crônico-degenerativas, em especial as doenças cardiovasculares e o câncer (GUERRA et al, 2005).

O câncer é a uma das principais causa de morte em todo o mundo, representando cerca de 9,6 milhões de mortes, ou uma em cada seis mortes, em 2018. O câncer de pulmão, próstata, colo-retal, estômago e fígado são os tipos mais comuns de câncer em homens, enquanto mama, câncer colorretal, pulmonar, cervical e tireóide são os mais comuns entre as mulheres (WHO, 2018).

Aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda. Só no Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2010).

Esse termo câncer (neoplasias malignas) é utilizado para nomear um grupo amplo de doenças caracterizadas pelo descontrole da divisão celular e invasão de outras estruturas orgânicas (BRASIL, 2010). O câncer é definido clinicamente por ser uma doença caracterizada pela ocorrência de anormalidades genéticas em uma ou em um grupo de células normais no interior do corpo levando a um crescimento descontrolado, sendo estas denominadas neoplásicas (MNT, 2013). Quando originado em tecidos epiteliais recebe a denominação de carcinoma, como pele ou mucosas. Se a origem for em tecidos conjuntivos, como o tecido de sustentação da mama, é chamado sarcoma (PEREIRA, 2015).

Essas alterações no descontrole da divisão celular resultam em uma protuberância denominada tumor que podem se propagar para outras partes do corpo através do sistema sanguíneo e linfático (MNT, 2013). Assim, pessoas de todas as idades podem ser afetadas, entretanto há associação entre envelhecimento e a maioria dos tipos de câncer (BRASIL, 2010).

Um diagnóstico correto do câncer é essencial para o tratamento adequado e eficaz, pois todo tipo de câncer requer um regime de tratamento específico que engloba uma ou mais modalidades, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Determinar os objetivos do tratamento e dos cuidados paliativos é um primeiro passo importante, e os serviços de saúde devem ser integrados e centrados nas pessoas (WHO, 2018).

Dentro dos inúmeros tipos de câncer, o CM sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama feminina ocupa a primeira posição mais frequente em todas as regiões brasileiras (INCA, 2019).

Esse tipo de câncer apresenta como principais sinais e sintomas um nódulo na mama e/ou axila, dor mamária e alterações da pele que a recobrem, como abaulamentos ou retrações com aspecto semelhante à casca de laranja (CANTINELLI et al., 2006). Sendo estes localizados no quadrante superior externo,

e em geral, as lesões são indolores, fixas e com bordas irregulares, acompanhadas de alterações da pele quando em estágio avançado (INCA, 2002).

Ainda, o CM vem sendo desde 2007 uma das principais causas de morte de mulheres no mundo. No Brasil, estimam-se que 66.280 casos novos de câncer de mama, para cada ano do triênio 2020-2022. Esse valor corresponde a um risco estimado de 61,61 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2019). Desta forma, o CM está entre os tipos de câncer mais comuns, com maiores taxas de incidência em todo o mundo (HUSSEIN et al., 2019).

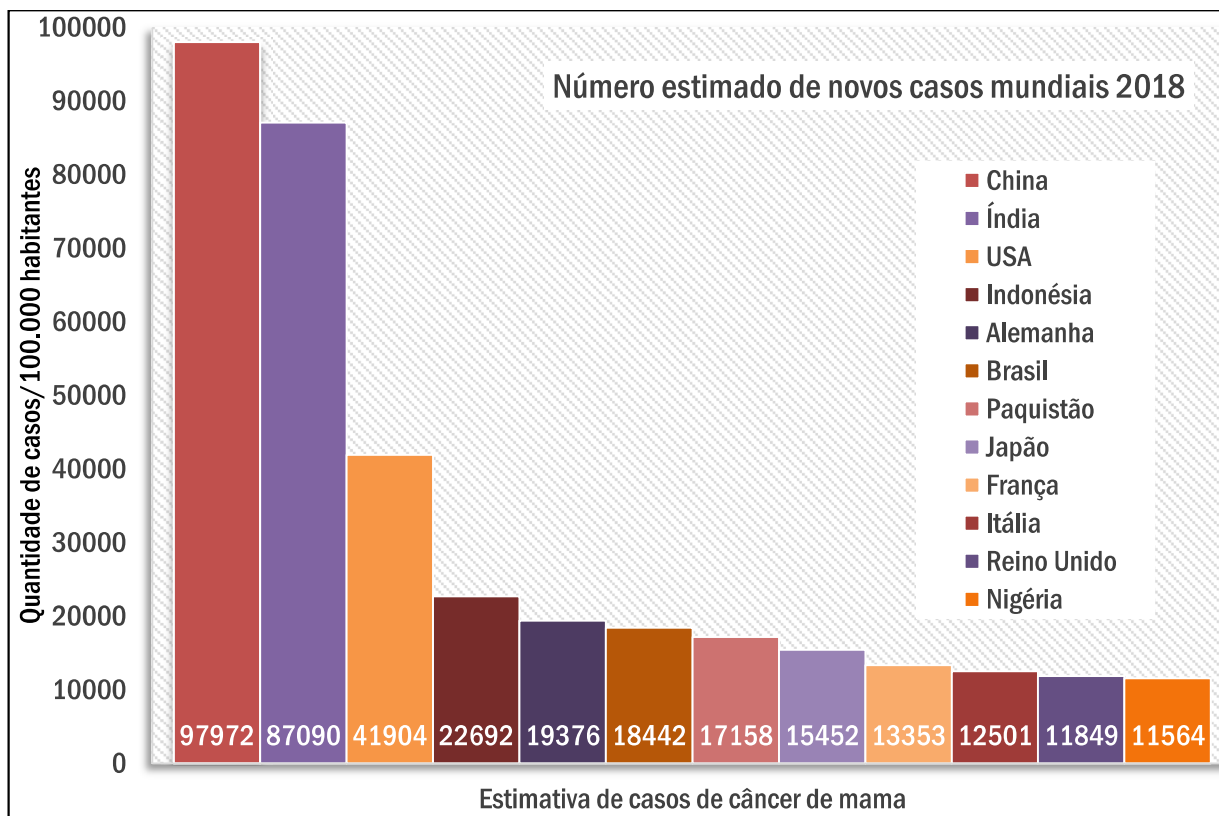
## **3.2 Câncer de mama**

### **3.2.1 Incidência da doença**

O CM é o tipo de neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada e apontada como uma das principais causas de morte relacionadas a esse tipo de doença em todo o mundo (TORRE et al., 2017; CHEN&ZHANG, 2018). As estatísticas apontam um milhão de novos casos registrados mundialmente, sendo as estimativas por país apresentadas na Figura 1. Os dados relacionados a incidência do CM assinalam como a principal causa de morte relacionada a tumores entre mulheres, compreendendo 24,2% segundo a mais recente estimativa mundial (BRAY et al., 2018).

Essa incidência relacionada a morte está prevista aumentar mundialmente para 85 a cada 100.000 mulheres até o ano de 2021, visto que a morbidade e mortalidade desta doença persistiram aumentar em todo o mundo nos últimos anos. Esta foi responsável por 458.000 mortes em 2008, refletindo assim a sua intensa capacidade de invasão e metástase (WHO, 2012; HAN et al. 2013; FERLAY et al. 2015).

Em 2012, foram diagnosticados 1,67 milhão de novos casos do CM, representando 25% das mulheres afetadas por esta doença (HAN et al. 2013). Embora a taxa de mortalidade entre 2009 e 2014 tivesse diminuído mundialmente, em 34% desde 1990, quase 230.480 de novos casos de CM invasivo e 39.520 de CM foram diagnosticados entre mulheres nos Estados Unidos em 2011 (DESANTIS et al., 2011; DESANTIS et al., 2014).



**Figura 1.** Número estimado de novos casos mundiais de câncer de mama em 2018  
 Fonte: Global Cancer Observatory (GCO) (2018)

Em 2012, o CM nos Estados Unidos incidia a cada uma entre oito mulheres (HAGHIGHAT et al. 2012). Porém, em 2015, a mortalidade no mesmo país estava em declínio, fato atribuído ao diagnóstico precoce e a melhorias no tratamento realizadas durante os anos anteriores (TORRE et al., 2015).

A ocorrência dos casos esteve visualizada através de dados estatísticos, e em outras áreas populosas, além de países como Estados Unidos, essa doença já era deparada, principalmente em países em desenvolvimento do sul da Ásia (MOORE et al. 2009; BADAR et al. 2011).

No Irã, a relevância do crescimento de casos variava de 10 a cada 100.000 pessoas, sendo 7.000 novos casos relatados anualmente (HAGHIGHAT et al. 2012). No Paquistão a prevalência do CM também aumentava durante os anos (KHOKER et al. 2012). Na Grã-Bretanha, pertencente ao continente europeu, essa taxa era mais alarmante, visto que uma a cada doze mulheres até os 85 anos de idade apresentava o CM. Na Bélgica, 145,2 mulheres e 66,3 na Polônia a cada 100 mil, sofrem de CM (AKRAM et al. 2017).

Sabe-se que o CM é um problema mundial, porém a taxa de incidência/mortalidade é muito maior nos países em desenvolvimento, ocorrendo 62% das

mortes nesses países com 883.000 casos notificados comparados a 794.000 casos notificados em países desenvolvidos (FERLAY et al.; TORRE et al., 2015).

Em todo o mundo, haverá cerca de 2,1 milhões de casos de câncer de mama recém-diagnosticados em 2018, representando quase 1 em cada 4 casos de câncer entre mulheres. É a principal causa de morte por câncer em mais de 100 países. As taxas de incidência de câncer de mama são mais altas na Austrália e Nova Zelândia, nos países do norte da Europa e Europa Ocidental. Em termos de mortalidade, as taxas de câncer de mama mostram menos variabilidade, com a maior mortalidade estimada na Melanésia, onde Fiji tem as maiores taxas de mortalidade em todo o mundo (BRAY et al. 2018)

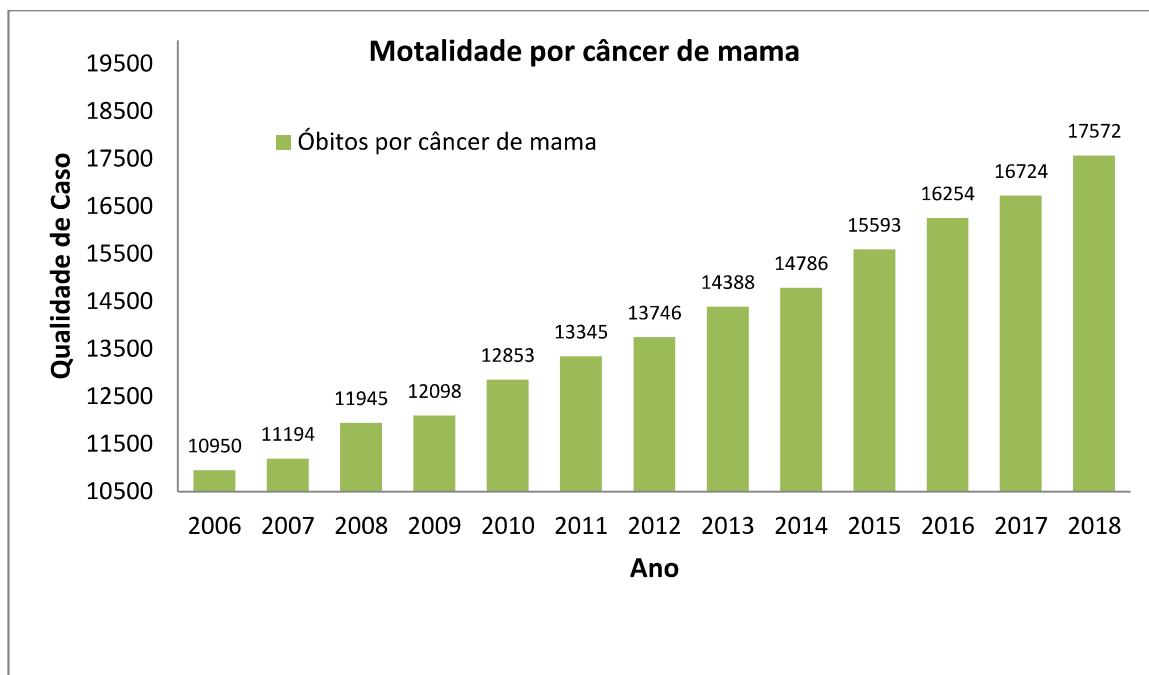
Na América do Sul, por exemplo, a incidência e a mortalidade crescem durante o decorrer dos anos. Nesses países, o CM ocupa aproximadamente metade do total de casos de câncer de mama no mundo, ainda, os dados reafirmam este sendo a principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres nessas áreas (ELGAILI et al., 2010; ACS; LY et al.; JEMAL et al., 2011; TORRE et al., 2015).

A prevalência do CM nas áreas em desenvolvimento reflete os problemas relacionados ao diagnóstico em estágios avançados em países com recursos limitados devido a um déficit na capacidade de promover detecção, diagnóstico e tratamento precoces. Dessa forma, a sobrevivência nos países desenvolvidos é de cerca de 73% comparando-se a apenas 57% nos países em desenvolvimento (TORRE et al., 2015).

Essa incidência do câncer é uma tendência mundial, mas a mortalidade será crescente apenas nos países em desenvolvimento, entre eles o Brasil. Este quadro pode correlacionar as condições de vida, acessos aos serviços de saúde e as características do adoecimento e mortalidade por câncer (SILVA, 2012), relacionando principalmente com o aumento da expectativa de vida (SILVA, 2012).

No Brasil, o câncer é a segunda principal causa mais comum de morte, seguido pelas doenças cardíacas e cerebrovasculares (BARBOSA et al., 2015). Em 2012, as mortes por CM foram as principais do país, representando 15,2% do total de mortes. Em 2014, foram relatados 190 mil casos de mortalidade no câncer de mama entre as mulheres, sendo 14786 registrados como obitos por CM, conforme a Figura 2 (INCA, 2014).





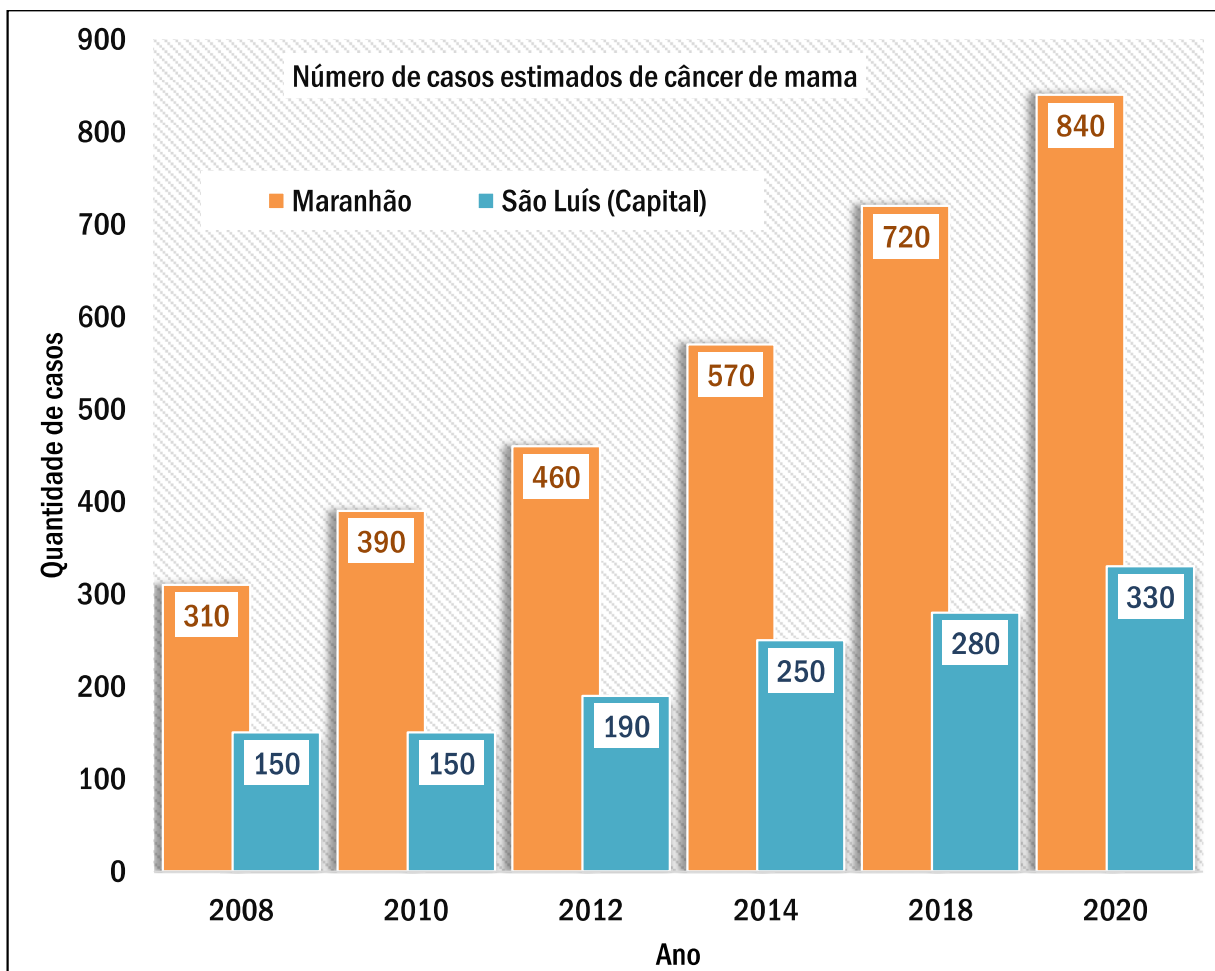
**Figura 2.** Mortalidade por câncer de mama no Brasil de 2006 a 2018.  
Fonte: Adaptado de Brasil (2016) e Inca (2019)

O Brasil apresentou o CM entre os mais comuns dentre as mulheres em 2014 (BARBOSA et al., 2015). Perfil semelhante também foi observado nas estimativas para o biênio 2016-2017 (INCA, 2015). Para biênio 2018-2019 as estimativas para o país apontavam para 59.700 casos novos de câncer de mama, para cada ano, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres.

Em 2017, a OMS estimou que anualmente fossem diagnosticados 42 casos de CM a cada 100.000 mulheres. Ainda relatou a estimativa de que 12 a cada 100.000 mulheres venham a óbito (OMS, 2017).

Essas taxas de mortalidade por esse tipo de tumor no Brasil permanecem crescendo, assim como, no estado do Maranhão, pertencente a região Nordeste do Brasil (Figura 3).

A distribuição da incidência por região geográfica mostrou que o nordeste está em segundo lugar e concentra 27,8% da incidência. Existe, entretanto, grande variação na magnitude e nos tipos de câncer entre as diferentes regiões do Brasil. A incidência do câncer de mama tem impacto importante, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama feminina ocupa a primeira posição mais frequente em todas as regiões brasileiras, com um risco estimado de 44,29 por 100 mil na região nordeste (INCA, 2019).



**Figura 3.** Mortalidade por câncer de mama no Maranhão e em São Luis 2008 a 2020.  
Fonte: Adaptado de INCA.

Estudos nacionais e locais relacionam o aumento do número de casos com o diagnóstico tardio da doença e também pela mesma ser altamente heterogênea e apresentar múltiplas vias de sinalização para sua iniciação e progressão (INCA, 2014; OMS, 2017; PDQ, 2017).

No Maranhão, Lima et al. (2011) avaliaram práticas preventivas entre mulheres de 10-49 anos perfazendo o total de 3.360 mulheres entrevistadas nessa faixa etária. Desse total, apenas 30% relataram o autoexame da mama e entre as mulheres acima de 35 anos, 71,6% nunca realizaram o principal exame de diagnóstico da doença. O mesmo déficit no número de casos de diagnóstico da doença foi notificado por Ross (2016) entrevistando 211 mulheres na faixa etária 38 a 69 anos de Caxias-MA.

Ainda no Maranhão, Rêgo et al. (2015) tomaram por base os óbitos notificados pelo SIM (Sistema de Informações sobre Mortalidade) do Ministério da Saúde através das informações contidas na Declaração de Óbito (DO) nos anos

2002, 2006 e 2012, usando as variáveis ano, local de ocorrência, idade, sexo, cor, estado civil, escolaridade, assistência médica. Os autores concluíram que a causa básica de morte é o déficit no rastreamento da doença através de exames como a mamografia, que ainda é um fator preponderante no diagnóstico precoce, conseqüentemente uma forma de evitar que essa neoplasia se estenda na população feminina.

### 3.2.2 Fatores de risco

Estes estudos epidemiológicos aglomerados e anteriormente citados ajudaram no decorrer dos anos a propor fatores de risco suspeitos para o CM, que incluem exposições a substâncias cancerígenas, estilos de vida inadequados, envelhecimento, histórico familiar, entre outros (PDQ, 2017).

Dentro destes fatores, a idade e fatores endócrinos relacionam-se como risco ao CM em mulheres, ditos: menarca precoce, menopausa tardia, primeira gravidez após 30 anos, nuliparidade e terapia de reposição hormonal pós-menopausa (INCA, 2014).

Outros fatores de risco apontados pelos estudos epidemiológicos incluem a exposição à radiação ionizante em idade inferior a 40 anos, a ingestão regular de bebida alcoólica, o uso de tabaco e obesidade (LEE et al., 2012; LAKHTAKIA et al.; MCKENZIE et al.; WASS et al., 2013). Enquanto que, a prática de atividade física e o aleitamento materno exclusivo são considerados fatores de proteção (INCA; OSHIRO et al., 2014).

Os fatores genéticos correspondem de 5 a 10% dos casos, que incluem mutações do BRCA (BRCA1 e BRCA2), que são genes autossômicos dominantes e supressores de tumor presentes nos cromossomos 17 e 13, respectivamente (LYNCH et al., 2009; SHIOVITZ&KORDE, 2015).

Sabe-se que oncogenes e genes supressores de tumor estão relacionados a tumorigênese do CM esporádico (GUPTA et al., 2017). Enquanto que as mortes relacionadas ao câncer, normalmente são atribuídas a complicações da sua forma metastática (AL MOUSTAFA et al., 2011).

Na literatura, observou-se que os genes significativamente mutados (SMGs) foram elucidados no início da transformação maligna e que poucos deles conseguiam codificar para proteínas que interagissem com o BRCA1/2, enquanto

que, os outros atuavam através de diferentes vias em mutações de genes suspeitos de elevar o risco do desenvolvimento de CM (WATSON et al., 2013; ECONOMOPOULOU et al., 2015). Porém, os mecanismos subjacentes à progressão maligna no CM ainda necessitam de esclarecimentos.

Mesmo sendo manifestos os fatores de risco, a morbidade e a mortalidade causadas pelo CM permanecem elevadas. Assim, existem várias estratégias para superar o CM, incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e terapia direcionada (SANTOS et al., 2017; KUMAR et al., 2007; BASS et al., 2017).

Um fator bem discutível com relação aos tratamentos utilizados refere-se ao impacto negativo na sobrevivência das pacientes mais velhas interferindo na saúde física (infertilidade, menopausa precoce, diminuição da densidade óssea) e psicológica.

Desta forma um diagnóstico correto do câncer é essencial para o tratamento adequado e eficaz, pois todo tipo de câncer requer um regime de tratamento específico que engloba uma ou mais modalidades. Determinar o tratamento e os cuidados paliativos é um primeiro passo, tendo como objetivo principal geralmente curar o câncer ou prolongar consideravelmente a vida. Melhorar a qualidade de vida do paciente também é um objetivo importante. Isso pode ser alcançado com cuidados paliativos e apoio psicossocial (WHO, 2018).

### **3.2.3 Classificação da doença e aspectos gerais do diagnóstico por imagem**

O CM é uma doença heterogênea, com apresentação e acompanhamento clínico bastante complexo (SIEGEL et al., 2013). Delmonico et al. (2015) afirmam através das características morfológicas e unidades funcionais da mama que lesões são originadas principalmente nos ductos e lóbulos da mama.

O CM apresenta-se como um nódulo ou área de tecido mamário sendo espessado (MNT, 2013) dentro dos seus sinais e sintomas que são notados no início pelo autoexame da mama e mamografias anuais, podendo apresentar nódulos, sendo fixos e normalmente indolores, quando a pele do órgão apresenta coloração avermelhada, espessura de escamas semelhante a uma casca de laranja, podendo ocorrer retração do mamilo, além de líquido anormal (INCA, 2017; RIBEIRO, 2014). Conseqüentemente, após o desenvolvimento dessas lesões, podem ser

classificadas por benignas (não neoplásicas e neoplásicas) e malignas (SCHNITT; COLLINS, 2010).

### 3.2.3.1 Estadiamento

Uma forma de classificar a doença é através do estadiamento (Tabela 1) (estágio do câncer) clínico da doença pelo sistema de classificação de tumores malignos da União Internacional de Controle do Câncer, que consiste na avaliação do estágio do câncer a partir das características do próprio do tumor, linfonodos regionais comprometidos e presença ou não de metástases (UICC et al., 2019).

TNM é abreviatura de tumor (T), linfonodo (N) e metástase (M):

- **T:** Indica o tamanho do tumor primário e se disseminou para outras áreas. T no sistema acompanhado de um número 0 a 4 é usado para descrever o tumor primário, particularmente o seu tamanho.
- **N:** Descreve se existe disseminação da doença para os linfonodos regionais ou se há evidência de metástase em trânsito. N no sistema acompanhado de um número 0 a 3, que indica se a doença disseminou para os gânglios linfáticos.
- **M:** Indica se existe presença de metástase em outras partes do corpo. M no sistema indica se a doença se espalhou para partes do corpo.

**Tabela 1** Estadiamento do câncer de mama segundo o sistema TNM

Estágios do Câncer	T	N	M
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio IA	T1	N0	M0
Estágio IB	T0	NImi	M0
	T1	NImi	M0
Estágio IIA	T0,T1,T2	N0,N1	M0
	T2	N1	M0
Estágio IIB	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
Estágio IIIA	T1	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Estágio IIIB	T4	N0,N1,N2	M0
Estágio IIIC	Qualquer T	N3	M0
			M0
Estágio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Neste sistema, o carcinoma *in situ* é referido como 0 em conjunto com a classificação de estágio I, correspondendo a tumores iniciais. Nos estágios II e III

são notificados casos da doença localmente avançada, com disseminação locorreional extensa. E por fim, os tumores com metástases a distância são classificados como estágio IV (EDGE et al., 2010).

Os estágios de progressão desse tumor ainda não são bem compreendidos, visto que essa apresenta um alto nível de complexidade devido a mais de 18 subtipos de CM classificados molecularmente (KUMAR et al., 2007; BASS et al.2017; SANTOS et al., 2017).

### 3.2.3.2 Classificação Molecular

Outra classificação dos tumores de mama que auxiliam na definição da estratégia terapêutica a ser adotada é a molecular. Na década de 1990, os tipos principais foram classificados molecularmente de acordo com a positividade dos receptores e avaliados por microarranjos gênicos, sendo estes: luminal subtipo A e B, *basal-like* subtipos superexpressão de HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) e normal, *claudin-low* e mesenquimal (SORLIE et al., 2006; WOLF et al., 2007).

Ainda abrangendo uma extensão de subtipos histológicos (Tabela 2) podem ser rotuladas segundo o grau de diferenciação, proliferação e fenótipo celular (SCHNITT&COLLINS, 2010). Sendo esta a classificação adotada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2020).

**Tabela 2** Os principais subgrupos distinguidos pelos métodos histopatológicos e patológicos moleculares.

Histopatológica	Patologia molecular
HR-positivo e HER2-negativo, baixa proliferação.	Luminal A
HR-positivo (HER2 da mesma forma), alta proliferação.	Luminal B
HR negativo e HER2 positivo	Tipo HER2-dominante
HR negativo e HER2 negativo (triplo negativo)	Tipo basal

Os dois agrupamentos se sobrepõem em cerca de 80%, similar subgrupos estão nas mesmas linhas. HR: receptor hormonal (receptor de estrogênio e progesterona)

Esses subtipos diferem na sua apresentação clínica, revelando padrões de expressão de genes distintos, diferentes características genética e molecular

(CURTIS et al. 2012). E ainda, se correlacionam com as assinaturas de expressão de genes e prognóstico (DAI et al., 2015; PRAT et al., 2015).

Os tumores luminais do tipo A apresentam receptor de estrogênio (ER) positivo e/ou receptor de progesterona (RP), sendo negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2 (ROUZIER et al., 2005; SORLIE et al., 2001; SORLIE et al.; SOTIRIOU et al., 2003). Possuem padrões de expressão gênica das células epiteliais luminais mamárias, como a expressão das citoqueratinas tipo 8 e 18, um fenótipo de baixa proliferação celular e expressão elevada de genes relacionados ao ER (SOTIRIOU et al., 2003; SORLIE et al., 2006; WOLF et al., 2007).

Possuindo um baixo grau histológico, este subtipo notifica 60% dos casos dos cânceres de mama e em relação aos demais o melhor prognóstico. Os antiestrogênicos, tamoxifeno e inibidores de aromatase, são as terapias alvo-específicas utilizadas para o seu tratamento sistêmico (WEIGEL et al., 2010).

O subtipo luminal B expressa receptores hormonais positivos, mas nem sempre expressos em altos níveis (SORLIE et al., 2003). São caracterizados por um tipo histológico agressivo (SORLIE et al., 2006) e o fenótipo de maior índice de proliferação celular traz consigo o pior prognóstico em relação aos tumores luminais do tipo A (SORLIE et al., 2003).

Esse subtipo é associado ao risco elevado de recorrência e a uma menor sobrevida livre da neoplasia específica em qualquer uma das categorias de tratamento adjuvante sistêmico (CHEANG et al., 2009). O prognóstico do luminal B relata à maior possibilidade de resistência ao tamoxifeno, demonstrando se beneficiar mais do que o subtipo luminal A de quimioterapia associada a antiestrogênicos (KENNECKE et al., 2010).

O subtipo basal é também denominado triplo negativo, pois apresenta RE, RP e HER2 negativos (IRVIN&CAREY,2008). Apresentam comportamento agressivo, e alto grau histológico, elevado índice mitótico, por causa da presença de áreas de necrose central e pelo infiltrado linfocitário, ainda possuindo um pior prognóstico e alvo terapêutico não definido (SORLIE et al., 2001; CHEANG et al., 2008).

O seu padrão de prognóstico mais reservado também é adjunto a menor sobrevida livre da doença e a menor sobrevida global (CHEANG et al., 2008). Desta forma, pacientes com esse perfil não se beneficiam do uso do trastuzumabe, nem de terapias hormonais, como o tamoxifeno, e nem dos inibidores de aromatase (IRVIN, 2008) Porém, nem todos os tumores triplo-negativos se comparam aos

basaloides e assim são chamados de tumores triplo-negativos não basaloides (KENNECKE et al.; VODUC et al., 2010)

O subtipo superexpressão do HER2 expressa o fenótipo RE negativo e HER2 positivo (RIBEIRO-SILVA et al., 2005). Estes tumores conseguem dar respostas positivas a drogas que bloqueiam a atividade de HER2 como o anticorpo monoclonal Trastuzumabe (SORLIE et al., 2006).

Junto ao *status* de HER2 com os outros fatores prognósticos será baseada a decisão clínica sobre a prescrição de qualquer terapia adjuvante sistêmica (VODUC et al., 2010). Pacientes com diagnóstico primário da doença e com superexpressão de HER2 possuem um prognóstico ruim em relação aos pacientes que não apresentam essa amplificação gênica (WOLFF et al., 2007).

A partir da utilização de terapia alvo-específica (trastuzumabe), o prognóstico desses pacientes melhora acentuadamente (RAKHA et al., 2010). Tratamento combinados com o paclitaxel, por exemplo, são indicados para as pacientes que não receberam tratamento prévio para o tumor. O trastuzumabe adjuvante, por outro lado, atua na redução do risco de recorrência à metade e a mortalidade em um terço em pacientes com CM em estágio primário (WOLFF et al., 2007). O uso do lapatinibe, outro inibidor da tirosina quinase, bloqueia tanto o HER2 quanto o HER1, beneficiando todos os pacientes nas quais o uso do trastuzumabe foi ineficaz (GEYER et al., 2006).

O subtipo *claudin-low* demonstra uma baixa expressão de genes envolvidos com junções celulares ocludentes e glicoproteínas de adesão célula-célula, incluindo as claudinas 3, 4 e 7; as ocludinas e a E-caderina (HERSCHKOWITZ et al., 2007). Demonstra um padrão imunofenotípico triplo-negativo não basaloides e não possui ainda marcadores imunoistoquímicos protocolados para a sua caracterização e nem terapêutica específica (PRAT et al., 2010).

O cancer de mama é responsáveis por 7–14% dos casos de cânceres de mama invasivos, enriquecidos por genes associados à transição epitelial para mesênquima (EMT) e demonstram altos níveis de instabilidade genômica (HENNESSY et al., 2009; PRAT et al.; PRAT&PEROU, 2010; SABATIER et al., 2014). Clinicamente, eles têm sido associados com um mau prognóstico, com algumas evidências de que eles podem ser relativamente resistentes aos agentes quimioterápicos convencionais (PRAT et al.; PRAT&PEROU, 2010).



Independente do avanço de pesquisas referentes ao diagnóstico molecular, pelo mesmo apresentar testes validados para o rastreamento inicial, o rastreamento e detecção precoce do CM é feito por imagem (LIEDKE et al., 2014). Para este diagnóstico existem três exames propedêuticos de imagens a serem realizados: mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética (DELMONICO et al., 2015).

O diagnóstico por mamografia é realizado a partir de aparelhos de baixa intensidade de emissão de raios-x. Onde a mama é comprimida sob um receptor de imagem e uma base transparente de compressão do órgão. Os raios-x não absorvidos marcam o filme ou são revelados pelo detector digital produzindo uma fotografia similar a um negativo (HELVIE, 2010).

A ultrassonografia é uma ferramenta valiosa e complementar à mamografia na rotina, em especial para a detecção de carcinomas não palpáveis e ocultos clinicamente e por outro lado baseia-se nos transdutores de ondas com frequência média que varia de 5 para 15 MHz. Permitindo assim uma visualização em profundidade do tecido analisado e a resolução obtida garante a aplicação da técnica em mamas densas e em estágio de lactação. Contudo, o seu uso é limitado na clínica, além de ser operador-dependente (KHOURI, 2010).

A ressonância nuclear magnética é mais utilizada para o acompanhamento do estadiamento local e vigilância da lesão mamária. Baseando-se na secção do tecido analisado em quadros de imagens com a recriação do movimento dos prótons de acordo com o relaxamento do tecido (SALEM et al., 2013). É considerado um exame com necessidade de aprimoramentos técnicos para que seja mais amplamente utilizado (TEJERINA et al., 2012).

No cenário brasileiro, a idade de diagnóstico do CM tem diminuído, devido ao rastreamento da lesão pela mamografia e o desenvolvimento de programas assistenciais voltados à saúde da mulher (LIEDKE et al., 2014). Em pesquisas realizadas com pacientes diagnosticados com CM, constata-se o atraso em várias etapas do diagnóstico e tratamento, sendo o fator essencial para um bom prognóstico dessa patologia o diagnóstico adequado e o mais precoce possível, pois a identificação do câncer em seu estágio inicial possibilita uma maior chance de cura nos tratamentos realizados (GONZAGA et al., 2008).

### 3.2.3.3 Tratamento do CM e alvos farmacológicos utilizados

Em pacientes com CM, cerca de 70% dos tumores expressam o receptor de estrogênio (ER) e são tratados com terapia endócrina, que incluem inibidores da aromatase não esteroidais (anastrozol e letrozol), inibidores da aromatase esteróide (exemestano), moduladores séricos de ER (tamoxifeno ou toremifeno), downreguladores ER (fulvestrant), entre outros (ROBINSON et al., 2013).

Após um a cinco anos de tratamento quase todos pacientes com CM revela resistência aos medicamentos (ROBINSON et al., 2013), desenvolvendo formas tumorais mais agressivas, como recorrência metastática, que geralmente são resistentes ao tratamento (HU et al., 2018). Essa metástase seguida pela resistência as drogas utilizadas pelo paciente são acompanhadas por instabilidade genômica, alterações no subclone de genes tumorais e pressão seletiva microambiental (APARICIO&CALDAS, 2013). Essa constante transformação nas mutações genéticas origina a heterogeneidade do tumor, limitando assim a eficácia da terapia direcionada (ZHOU et al., 2019).

O estágio da doença determinará a estratégia do tratamento, incluindo cirurgia, radiação ou quimioterapia. Esses tratamentos têm como alvo as vias de sinalização responsáveis pela proliferação de células e sobrevivência, como a doxorrubicina ou cisplatina, sendo uma das principais drogas anticâncer citotóxicas utilizadas clinicamente que desencadeiam a apoptose em células cancerígenas (DOMVRI et al., 2013; HASSAN et al., 2015). A combinação de todas essas drogas no tratamento expande a amplitude terapêutica, mas pode instaurar a potencial ameaça de toxicidade pela própria medicação (LU et al., 2014). Diante disto, a alta incidência mundial dessa enfermidade eleva esses diversos esforços na realização do desenvolvimento e aperfeiçoamento de terapias antineoplásicas (INCA, 2007; HANAFI &MANSOUR, 2010; ARRUEBO et al., 2011; AZIZ, 2016).

A cirurgia é a forma de tratamento mais antiga e definitiva, que consiste na remoção do tumor, quando localizado e o mesmo depara-se em condições anatômicas adequadas. Por outro lado, em alguns tipos de câncer, as cirurgias não são suficientes, pois as células neoplásicas podem estar disseminadas ou irradiadas em outros tecidos (INCA, 2007).

### 3.2.3.4 Radioterapia

A radioterapia é indicada para tumores localizados, quando não podem ser totalmente removidos ou para os que reincidem após o processo cirúrgico. Esse tratamento versa a utilização de radiações ionizantes (Raios X ou Raios gama) que interagem com os tecidos, acelerando os elétrons e promovendo processos químicos como a ruptura da dupla hélice do DNA, resultando na morte celular (INCA, 2007; HANAFI; MANSOUR, 2010).

Esse resultado é intercedido através dos radicais livres gerados a partir da decomposição da água radiolítica celular. Esses radicais livres interagem com alvos críticos e membranas, provocando danos não reversíveis que principiam a morte celular sendo o mecanismo de ação desses compostos similares ao efeito do oxigênio em reações bioquímicas de moléculas danificadas impedindo a reparação de danos da radiação celular (RAVIRAJ et al., 2014).

Mas, os efeitos colaterais advindos da lesão dos tecidos normais adjacentes ao tumor manifestam-se como a grande desvantagem deste método (INCA, 2007). Tal desvantagem se baseia no fato de que a radiação ionizante não afeta todas as células-alvo, levando a efeitos colaterais graves no tecido circundante aliadas a possíveis células tumorais malignas humanas que contrapõe de forma negativa à radiação ionizante (JAGETIA et al., 2005).

Os tecidos normais podem ser preservados pelo uso de radiosensibilização, que objetivam conseguir um grau de dano tumoral otimizado, sensibilizando as células de tumor à radiação e minimizando o uso de doses amplas de radiação. Por outro lado, tais materiais são tóxicos, não seletivos e são específicos de tumores. Por causa disto, as drogas à base de compostos naturais ganharam a atenção para substituir os mesmos (JAGETIA et al., 2005; XU et al., 2016).

### 3.2.3.5 Quimioterapia

Adjuvante ou paliativo após cirurgia ou radioterapia, a quimioterapia é preconizada como tratamento principal em leucemias, linfomas e cânceres de testículo (INCA, 2019). O CM também pode ser tratado com quimioterapia combinada com cirurgia e/ou um agente de direcionamento do receptor de estrogênio ou HER2 (EBCTCG, 2012).

No entanto, diferente das modalidades de cirurgia e radioterapia, esta é uma forma de tratamento sistêmico baseada no uso de fármacos que atuam interferindo nos processos de crescimento e divisão celular de células cancerígenas (INCA, 2007). No entanto, os tratamentos de quimioterapia disponíveis oferecem pouco benefício, combinados com efeitos colaterais sérios e toxicidade limitante da dose (MONSUEZ et al., 2010).

A maioria desses fármacos não possui especificidade, não conseguem distinguir entre células normais e cancerígenas, logo também são capazes de destruir tecidos saudáveis, levando a efeitos colaterais como náuseas, vômitos e anemia (INCA, 2007; GHATE et al., 2013).

Outra desvantagem da quimioterapia em pacientes de CM está relacionada à infertilidade e menopausa precoce (PARTRIDGE et al., 2007; LETOURNEAU et al., 2011). Tais efeitos à saúde reprodutiva diminuem a qualidade de vida entre os sobreviventes (LETOURNEAU et al., 2011; HOWARD-ANDERSON et al., 2012; DESHPANDE et al., 2015). Os fatores prejudiciais mencionados refletem a necessidade de formas alternativas para o tratamento de CM.

Dentre as formas alternativas, encontra-se a poliquimioterapia que combina o uso de diferentes fármacos, apresentando uma eficácia mais significativa, devido às subpopulações de células presentes em um tumor diferirem em sua sensibilidade às drogas antineoplásicas, diminuindo o risco de resistência aos fármacos empregados (INCA, 2019).

A resistência ainda é um dos principais obstáculos para a eficácia do tratamento, pois causam várias alterações farmacocinéticas e moleculares, que tem a capacidade de invalidar o tratamento, devido à absorção e liberação ineficiente do fármaco, à variação genética determinada pelo transporte, à ativação e depuração do fármaco, às mutações, ampliações ou supressões nos alvos do fármaco (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Os principais fármacos anticâncer podem ser divididos nas seguintes categorias gerais de acordo com Rang et al., (2012):

- Fármacos citotóxicos:
  - ❖ Agentes alquilantes e substâncias relacionadas, que formam ligações covalentes com o DNA e, assim, impedem sua replicação;
  - ❖ Antimetabólitos, que bloqueiam ou subvertem uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA;

- ❖ Antibióticos citotóxicos, ou seja, substâncias de origem microbiana que evitam a divisão celular nos mamíferos;
- ❖ Derivados de plantas (alcaloides da vinca, taxanos, campotecinas): a maioria desses agentes afeta de forma específica a função microtubular e, portanto, a formação do fuso mitótico;
- Hormônios: Os mais importantes são os esteroides (glicocorticoides), bem como drogas que suprimem a síntese de estrógenos (inibidores da aromatase) ou a secreção de hormônios sexuais masculinos (análogos da gonadorelina) ou ainda antagonizam a ação hormonal (antagonistas do estrógeno e do andrógeno).
- Inibidores de proteína quinase: estes fármacos inibem as proteínas quinases (em geral, tirosina quinases, mas às vezes outras) envolvidas na transdução do sinal do receptor do fator de crescimento. São cada vez mais utilizados numa variedade de doenças malignas específicas (Krause e Van Etten, 2005).
- Anticorpos monoclonais: Atuam bloqueando um alvo específico das células cancerígenas ou no tecido adjacente ao tumor fornecem substâncias tóxicas diretamente nas células cancerosas, sua administração ocorre por via intravenosa.
- Diversos agentes: não se encaixam facilmente nas categorias anteriores.

A maioria dos fármacos anticâncer afeta apenas a divisão celular, mas não tem nenhum efeito inibidor específico na invasividade, na perda de diferenciação ou na tendência para criar metástases. Além disso, na medida em que seu alvo principal é a divisão celular, elas afetarão todos os tecidos normais em divisão rápida, e assim é provável que produzam, em maior ou menor grau, diversos efeitos tóxicos (RANG et al., 2012).

Os fármacos anticâncer podem provocar uma afinidade de efeitos podemos citar: a toxicidade hematológica, gastrointestinal, alterações hepáticas, toxicidade renal, complicações neurológicas, reprodutivas e cardiotoxicidade. Ainda temos as alterações bioquímicas, podem ocorrer alterações nos níveis séricos de bilirrubina, nos níveis de ureia, transaminases, creatinina e também eletrólitos (OLIVEIRA, 2016).

Os principais tratamentos com fármacos anticâncer estão listados na tabela 3

**Tabela 3.** Agentes antineoplásicos mais empregados na clínica e seus mecanismos

<b>Classe Farmacológica</b>	<b>Grupo</b>	<b>Agente Antineoplásico</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Agentes Alquilantes	Mostarda nitrogenada	Ciclofosfamida	Ligação cruzada de DNA e bloqueio da síntese e função do DNA
Antimetabólitos	Antagonista de folato, via da purina.	Fluoruracila, citarabina	Bloqueio da síntese de DNA e/ou RNA
Antibióticos Citotóxicos	Antraciclinas	Doxorrubicina, epirrubicina	Múltiplos efeitos na síntese de DNA/RNA e na ação da topoisomerase
Derivados de Plantas	Taxanos	Paclitaxel, docetaxel	Arrumação dos microtúbulos; impede a formação do fuso mitótico.
Hormônios/ antagonistas	Antagonistas	Tamoxifeno, toremifina	Atuam como antagonistas fisiológicos, antagonistas ou inibidores da síntese de hormônios para interromper o crescimento de tumores hormônio-dependentes.
Inibidores de Proteína quinase	Inibidores da tirosina Quinase	Dasatinibe, erlotinibe	Inibição das quinases envolvidas na transdução do sinal de receptores do fator de crescimento
Anticorpos monoclonais	Anti-EGF, EGF-2	Panitumumabe, trastazumabe	Bloqueia a proliferação celular

Diversos pesquisadores tentam decifrar as doenças neoplásicas, mesmo assim o percentual de sucesso para agente Antineoplásico é relativamente muito baixa. Um desafio importante é a concepção de novas substâncias químicas altamente seletivas para as células cancerosas de modo a minimizar os efeitos colaterais (DUTT; MADAN, 2013), assim como a utilização de novas terapias sistêmicas efetivas, que aumentem a resistência de células a apoptose induzida por agentes terapêuticos, tais como a imunoterapia e a eletroporação.

### 3.2.3.6 Imunoterapia

A imunoterapia direcionada tem sido objeto de estudos clínicos para CM, embora a seleção de candidatos ideais seja essencial (KATZ; ALSHAREDI, 2017). O recente sucesso dessa forma de tratamento contra o câncer utilizando o bloqueio do

ponto de checagem imune reformou os algoritmos de tratamento em várias doenças neoplásicas agressivas. Mas, a imunoterapia continua sendo um desafio (FRANKLIN et al.; JIA et al.; REMON et al., 2017).

A imunoterapia tem sido vista como alternativa aos pacientes do CM que não expressam o receptor de progesterona (Her-2/neu) sendo denominados triplo negativos, e recebem um prognóstico ruim, com altas taxas de recorrência sistêmica e refratariedade à terapia convencional. Assim, opções terapêuticas efetivas são extremamente necessárias para este tipo de câncer, que ocorre em aproximadamente 20% dos casos diagnosticados (PUSZTAI et al., 2016; JIA et al., 2017).

Porém, a quimioterapia convencional mantém-se a opção de tratamento principal para os pacientes com câncer de mama triplo negativo em estágio inicial e avançado, com antraciclinas e taxanos (BURSTEIN et al.; GRADISHAR et al., 2015). Para pacientes com CM na fase inicial, o tratamento consiste principalmente em cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Estas terapias são dadas a fim de atingir melhor controle clínico da doença e para melhorar a taxa de cura (HURVITZ&MEAD, 2016).

Durante anos, pensou-se que este tipo de câncer fosse resistente à imunoterapia, no entanto estudos recentes mostraram evidências de infiltração imune significativa de TILs (linfócitos infiltrantes de tumor) em um subconjunto de pacientes com câncer de mama triplo negativo (WIMBERLY et al., 2015; GARAUD et al., 2019).

Pesquisa realizada por Mina et al., (2019) com imunoterapia verificaram que o câncer de mama tri-negativo é um subtipo altamente heterogêneo, subdividido em seis subgrupos diferentes, com base em sua heterogeneidade molecular, que inclui expressão basal, mesenquimal, tronco mesenquimal, expressão de receptor de andrógeno luminal, imunomodulação e tipo instável. Foi demonstrado que os escores elevados de TIL correlacionam-se com o aumento da resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante. Isso prova que o sistema imunológico desempenhou um papel fundamental nesse subgrupo de pacientes.

Enquanto a quimioterapia geralmente enfraquece o sistema imunológico, causando um risco do aumentado de infecção, enquanto que os efeitos causados pela imunoterapia permanecem desconhecidos para a maioria dos oncologistas. Mesmo ela ativando o sistema imunológico, a imunoterapia acaba

causando uma variedade de eventos adversos (gripe, fadiga, dor no corpo, pneumonite, colite induzida por imunidade, hepatite induzida por imunidade e etc..) no sistema imune (TAWBI et al., 2018; HAREL et al., 2019).

No Brasil, existem tratamentos imunoterápicos, sendo nomeados por trastuzumabe e pertuzumabe, sendo estes anticorpos monoclonais contra a proteína HER2. O trastuzumabe é oferecido pela rede pública de saúde, desde o ano de 2012 para casos iniciais e desde 2018 para casos em que há metástases. O pertuzumabe teve recentemente aprovação do Ministério da Saúde para integrar a oferta do SUS, mas ainda não chegou aos pacientes (FEMAMA, 2018).

Existe também a necessidade do controle de tumores que se desenvolvem a partir de células dependentes dos hormônios sexuais, como é o caso do CM e do endométrio. Nestes casos, aplica-se a hormonoterapia consistindo na retirada de circulação dos hormônios ao qual o tumor é sensível ou na introdução de substâncias com efeito contrário a esses hormônios no organismo (INCA, 2019).

### **3.2.3.7 Eletroporação**

A eletroporação é um tratamento de câncer seguro e minimamente invasivo, com base em danos celulares induzidos por campo elétrico irreversível, que fornece o potencial de atingir preferencialmente células malignas, preservando estruturas críticas de suporte no microambiente do tumor, como matriz extracelular, nervos e vasos sanguíneos (Goswami et al., 2017).

Ringel-Scaia et al., (2019) ao pesquisarem eletroporação irreversível de alta frequência eliminou efetivamente o tumor primário e induziu uma mudança pró-inflamatória no microambiente do tumor. Demonstraram ainda que o tratamento local reduz significativamente as metástases 4T1. Nossos dados indicam que o nível de ablação tumoral se correlaciona com o aumento da ativação da imunidade celular.

Guenther et al., (2019) verificaram que a eficácia da eletroporação foi comparável à prostatectomia radical padrão em termos de taxas de recorrência em cinco anos e melhor preservação da função urogenital, comprovando a segurança do tratamento com câncer de próstata.

O mesmo foi verificado por Van den Bos et al., (2018) que ao avaliarem a segurança, qualidade de vida a curto prazo da eletroporação para o tratamento do câncer de próstata, verificaram que os resultados apóiam a segurança e a viabilidade



da eletroporação como tratamento primário para o câncer de próstata, com controle oncológico eficaz a curto prazo.

Wichtowski et al.,(2019) demonstram na sua pesquisa uma alta efetividade no tratamento de metástases cutâneas por câncer de mama. Esse método, embora utilizado para tratamento paliativo, traz uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes.

Devido às deficiências das terapias atuais, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos ou preventivos para o CM. Fitomedicamentos ou fitoterápicos com novos mecanismos moleculares fornecem uma área potencial para pesquisas “in vitro” e “in vivo” (SHANG et al., 2018).

### **3.3 Linhagens celulares para estudos *in vitro***

Os estudos *in vitro* com linhagens celulares em conjunto ao estudo dos potenciais biológicos de produtos naturais derivados de microrganismos podem representar uma ferramenta importante para melhor conhecimento e previsão de possíveis efeitos das substâncias em seres humanos e em melhorias nas formas de tratamento do CM (SALLES, 2012).

No decorrer dos anos, os produtos naturais têm se tornado, uma das estratégias mais bem-sucedidas no desenvolvimento de agentes antitumorais (CHANG et al., 2015). E com isso torna-se visível o uso de tais produtos em estudos anticancerígenos em inúmeros tipos de linhagens celulares.

Essas linhagens validam alvos hipotéticos através do fornecimento de informação biológica. A seleção durante a cultura tecidual, pode erradicar características do tumor do hospedeiro, que são importantes para a replicação e podem ativar vias de sinalização celular (LODHIA et al., 2015). Mas, não possuem boa fidelidade considerando os complexos genéticos e anormalidades epigenéticas existentes nos tumores humanos, como a influência do sistema imunitário e do estroma do microambiente tumoral humano. (LODHIA et al., 2015)

Desta forma, é possível utilizar a cultura destas células como ferramenta essencial em modelos experimentais. A partir disso, desenvolvem-se modelos experimentais que permitem o conhecimento de mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese e a assimilação de marcadores de diagnóstico e prognóstico, benéficas para a decisão clínica. (CRUZ et al., 2009;

GUZMAN;JORDAN, 2004; FRESHNEY, 2015). As linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A foram adotadas por este estudo e são apresentadas na Tabela 4

**Tabela 4.** Características das principais linhagens celulares relacionadas ao câncer de mama.

PRINCIPAIS LINHAGENS CELULARES DO CÂNCER DE MAMA		
SIGLA	CARACTERÍSTICAS	REF.
MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carcinoma ductal invasivo de mama.</li> <li>• As células se originam por efusão pleura.</li> <li>• Presença de receptores de estrogênio e progesterona.</li> <li>• Resposta proliferativa à estrogênio.</li> <li>• Fenótipo tipo epitélio luminal.</li> </ul>	<p>Lacroix &amp; Leclercq (2004) Comşa et al. (2015) Lee et al. (2015)</p>
MDA-MB-231	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativa para ER, PR e E-caderina.</li> <li>• Expressa p53 mutada.</li> <li>• O genoma se agrupa com o subtipo basal de câncer de mama.</li> <li>• Células não possuem o receptor do fator de crescimento HER2 (bom modelo de câncer de mama triplo negativo).</li> <li>• São invasivas <i>in vitro</i>.</li> <li>• Quando implantadas ortotopicamente produzem xenoenxertos que metastizam espontaneamente para os linfonodos.</li> </ul>	<p>Kang et al. (2003) Welsh (2013)</p>
MCF-10A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estas células apresentam numerosas características de epitélio mamário normal (linhagem não tumoral).</li> <li>• Ausência de tumorigenicidade em camundongos e a dependência de fatores de crescimento e hormonais para proliferação e sobrevivência.</li> </ul>	<p>Soule et al. (1990)</p>

As linhas de células cancerígenas são utilizadas como modelos *in vitro* de câncer, servindo como instrumentos poderosos no estudo do tratamento do

câncer. A principal vantagem é que as linguens podem em um crescer em meio padrão fornecendo um suprimento ilimitado de população de células homogêneas autorreplicastes e, ainda, preservando boa parte das propriedades genômicas dos tecidos originais dos quais foram derivadas (THOMPSON et al., 2008; HUSSEIN et al., 2019).

Pesquisas “in vitro” envolvendo metástase, angiogênese e resposta imune contra o câncer não mimetizam o que ocorre *in vivo*. Por esta razão, os modelos animais experimentais de câncer ainda estão desempenhando um papel vital na compreensão da tumorigênese e dos processos metastáticos e suas relações com o ambiente *in vivo*, e na avaliação de novas terapias (PANTALEÃO; LUCHS, 2010).

Um dos modelos experimentais mais estudados é o tumor de Ehrlich, por ser um dos primeiros tumores transplantáveis conhecidos. Trata-se de uma neoplasia originária de carcinoma mamário de camundongos fêmeas transplantado, inicialmente, na forma sólida e, a partir de 1930, para a forma ascítica. Sendo também utilizada na triagem de fármacos para o tratamento do CM assim como podem gerar bioprodutos a partir de microrganismos.

### **3.4 Modelo in vivo**

Através do avanço em técnicas de engenharia genética, as ferramentas genéticas e genômicas se tornam facilmente aplicáveis no desenvolvimento de animais *knockout* ou transgênicos a serem utilizados no desenvolvimento de diversas pesquisas. Algumas dessas construções se dão pelo enxerto de células humanas em um animal receptor que deverão desempenhar suas funções primárias, permitindo assim aos pesquisadores estudem respostas a patógenos como se estivessem acontecendo em um ambiente humano (ERNST, 2016).

Esses modelos de estudo animais são comumente divididos em categorias relacionadas ao tipo de investigação envolvida. Quando os animais são usados em pesquisas para estudar o sistemas biológico e funcional dos seres humanos, são divididos nas seguintes categorias: exploratórios, buscando compreender mecanismos biológicos fundamentais; explicativos, quando relacionados ao estudo dos problemas biológicos complexos; preditivos objetivando a descoberta e quantificação do impacto dos tratamentos que se encontram em fase de investigação (RAND, 2008).

Estes tumores transplantáveis trouxeram melhoria na pesquisa de novas técnicas e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas no tratamento de neoplasias transplantáveis, especialmente para tumores experimentais em animais, que são a base de recentes melhoras na terapia do câncer (OZASLAN et al., 2011).

A experimentação animal vem sendo bastante útil para desenvolver tratamentos de diversas patologias, inclusive o câncer através de modelos *in vivo*, fornecendo a pesquisa fenômenos fisiológicos, fisiopatológicos e farmacológicos em laboratório (LIMA et al., 2017).

Esses modelos podem ser divididos em induzidos/experimentais quando saudáveis e posteriormente modificados experimentalmente através de intervenções cirúrgicas, alterações genéticas ou injeções químicas, ou também podem ser espontâneos através de variantes genéticas que imitam a doença como ocorrência em seres humanos, entre outras classificações dentro dos modelos de investigação (RAND, 2008). Em CM, os modelos comumente utilizados são: espontâneos; espontâneos por mutações induzidas; induzidos por carcinogênese química, física ou biológica; xenoenxertos transplantáveis; isogênico transplantável (ALVARADO, et al. 2017).

Dos possíveis animais a serem utilizados, os camundongos representam o principal modelo experimental utilizado para simular a variedade de acontecimentos que surgem no desenvolvimento da doença. Sua apreciação na inclusão destes estudos advém do seu pequeno tamanho, facilitando o seu alojamento e manipulação; rápida reprodução e longa vida útil; sequenciamento completo do seu genoma disponível; manipulação genética com facilidade e o compartilhamento de muitas semelhanças fisiológicas aos seres humanos (MANNING et al., 2016).

A espécie mais utilizada para esse modelo experimental é o camundongo da classe *Mammalia*, gênero *Mus* e espécie *Mus musculus*, possuindo diversas linhagens sendo a *Swiss* a mais utilizada, uma linhagem heterogênea (*outbrad*), com fenótipo albino e caracterizada por baixa consanguinidade. Essa linhagem apresenta uma variada constituição genética com características resistentes, assim com a menor variação de comportamento em relação ao meio e boas taxas reprodutivas (LIMA et al., 2017).

Dos modelos experimentais conhecidos, o Tumor de Ehrlich permite a análise de desenvolvimento e tratamento de diversos tipos de câncer, avaliação dos mecanismos e da resposta imune do hospedeiro a substâncias com potenciais

antineoplásica, sendo importante no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (RODRIGUEZ, 2012). Por ser de fácil manejo, facilmente transplantável e permite o crescimento tumoral na forma sólida, subcutâneo, e ascítica na cavidade peritoneal dos animais (CHEN&WATKINS, 1970), essenciais na busca de alvos farmacológicos para terapias empregadas no tratamento do câncer de mama (Neto et al. 2016; Santos et al. (2016)

### **3.4.1 Tumor de Ehrlich**

Esse tumor é caracterizado como um adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária originário de camundongos fêmeas desenvolvido por Paul Ehrlich em 1896, indiferenciado, com rápido crescimento, comportamento agressivo, curto período de vida, isento de regressão espontânea e altamente transplantável. É um tumor espécie-específico que pode ser transplantado em quase todas as espécies de camundongos usados em pesquisas científicas. Sendo considerado como uma ferramenta valiosa para explorar a atividade antitumoral de diferentes produtos (NOGUEIRA, 2008; OLIVEIRA et al., 2010; RIBEIRO, 2012; FRAJACOMO et al., 2016; LIMA et al., 2017).

No aspecto histológico, o tumor de Ehrlich apresenta-se como uma massa tumoral de células intensamente pleomórficas e anaplásicas, com relação núcleo-citoplasma elevada, núcleo com cromatina frouxa e nucléolos múltiplos e proeminentes. O índice mitótico é alto, com várias figuras de mitose atípicas. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares. No tumor sólido, observam-se extensas áreas de necrose e hemorragia (MANGUEIRA, 2015). As células do tumor ascítico de Ehrlich apresentam-se isoladas, grandes, arredondadas, com citoplasma delicado escasso e microvacuolizado. Há uma inversão da relação núcleo/citoplasma, com núcleos volumosos. A cromatina é granular e irregularmente distribuída com nucléolos proeminentes (LIMA et al., 2017).

O tumor desenvolve-se na forma sólida (TES) quando inoculado por via subcutânea ou intramuscular dos camundongos e na forma ascítica (TEA) ao ser inoculado por via intraperitoneal (CALIXTO-CAMPOS et al. 2013; ALI et al., 2015). Quando inoculado via subcutânea, este pode proliferar em sua forma sólida, também conhecido como tumor sólido de Ehrlich. Uma vez que é descrito que as células de

Ehrlich em sua forma ascítica perdem os antígenos do complexo de histocompatibilidade, acredita-se que seja este o motivo da sua capacidade de proliferação em quase todos os murinos (JAGANATHAN et al., 2010; FRAJACOMO et al., 2016).

Quando o tumor de Ehrlich é inoculado na cavidade peritoneal, o mesmo produz ascite, sendo assim denominado Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) ou Carcinoma de Ehrlich ascítico (CEA). Esse tumor apresenta homogeneidade de distribuição celular possibilitando a contagem de células e assim uma precisão quantitativa nos transplantes (SAAD-HOSSNE et al., 2010; LIMA et al., 2017).

A ascite se instala, principalmente, devido ao aumento da permeabilidade microvascular no peritônio dos animais portadores do tumor. Esse fato pode ser decorrente de um fator vascular produzido pelas células tumorais. Atualmente, sabe-se que esse fator não apresenta efeito nos vasos sistêmicos. A proliferação tumoral ocorre em duas fases: na primeira há um crescimento exponencial das células, sucedida de um “plateau”, no qual o número de células é quase constante (SAAD-HOSSNE et al., 2003; SRIRAM et al., 2010; LIMA et al., 2017).

Entre a transição das fases observa-se mudanças tanto metabólicas quanto morfológicas nas células tumorais, tais como deterioração estrutural, diminuição da síntese de RNA e DNA, bem como do número de mitocôndrias e consequente declínio na concentração de ATP (OZASLAN et al., 2011; LIMA et al., 2017).

O líquido ascítico gera discreta resposta inflamatória na cavidade peritoneal. Apresentando coloração avermelhada devido à hemorragia. O óbito do animal ocorre em período variável, em média de 10 a 14 dias - dependendo da concentração inoculada - em decorrência do aumento da pressão abdominal e compressão dos órgãos adjacentes. O tempo de morte do animal pode variar devido a transplantes de forma repetida, onde há o aumento do grau de virulência e proliferação celular tumoral (OZASLAN et al., 2011; LIMA et al., 2017).

No estudo da forma sólida do tumor de Ehrlich observa-se que após a inoculação há a formação de edema e a migração de células pro-inflamatórias para o local da inoculação. Logo após a inoculação é possível observar a migração celular para os linfonodos regionais. Do ponto de vista morfológico, as células do tumor apresentam características com alto grau de atipias (anaplasia), com nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou

aberrantes e relação núcleo citoplasma maior que a de células normais (LIMA et al., 2017).

Após o terceiro dia de inoculação, a curva de crescimento do tumor já pode ser construída sem interferências. A inoculação realizada no dorso do camundongo desenvolve um volume bem delimitado e a consistência do tumor é fibrosa que cede à palpação. Observa-se a superfície íntegra sem qualquer sinal de inflamação ou ulceração (RIZZO, 2000; LIMA et al., 2017).

No coxim plantar a massa tumoral apresenta superfície lisa e formato irregular, sem qualquer evidências de ulcerações. Durante o exame físico, nota-se que a consistência é firme e fibrosa. O pico de crescimento do tumor ocorre após o sétimo dia de inoculação. Nota-se crescimento exponencial na região inoculada com tumor invadindo órgãos e sistemas. A análise do tumor na forma sólida é realizada através do exame anatomopatológico, sendo realizado através da excisão do tumor (RIZZO, 2000; LIMA et al., 2017).

O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares. Nessa forma o óbito dos animais é em torno de 20 a 30 dias, dependendo da concentração inoculada. Sendo assim, o tumor em sua forma sólida apresenta maior tempo de vida para o animal (LIMA et al., 2017).

E através de seus modelos experimentais, Ehrlich com Burnet e Thomas ganharam suporte científico, e contribuíram para um maior conhecimento sobre o papel do sistema imune na resposta tumoral (DUNN et al., 2004; DUNN et al., 2002; JAKOBISIAK et al., 2003). Porém, o seu modelo apresenta limitações diretamente ligadas com o que se aspira aferir, como é o caso de avaliação da resposta imune tumoral (CHEON&ORSULIC; DRANOFF, 2011).

Esse fator parte do conhecimento que o microambiente tumoral é imerso por citocinas, que afetam a proliferação e diferenciação das células do sistema imune. Elas são peptídeos endógenos de pequeno peso moleculares, solúveis, liberadas por linfócitos e células do sistema fagocitário essenciais na comunicação intercelular e em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos (DUBIN et al., 2012). Por essas substâncias serem capazes de modular inflamações e a imunidade pelo crescimento e diferenciação de leucócitos e não leucócitos, atuam diretamente na patogênese de inúmeras variedades de doenças inflamatórias e auto-imunes (SCHACHNA, 2004; DUBIN et al., 2012).

Essas células imunes que integram o microambiente tumoral sofrem um verdadeiro processo de cooptação pelas células tumorigênicas, contribuindo à angiogênese, limpeza tecidual e proliferação celular. Para isso são descritos três estágios (WHITESIDE, 2008).

Inicialmente, há o recrutamento das células imunes via produção de citocinas (proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e interleucina-8 (IL-8)), existe também a educação/cooptação via secreção de citocinas que regulam diferenciação de células imunes no sentido de promover o tumor como a IL-6, o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) e por fim, a resposta imune, em que células imunes diferenciadas geram citocinas, hormônios e fatores de crescimento, agentes promotores de proliferação tumoral e tolerância imune ao tumor (COUSSENS& WERB, 2002; CHEN et al., 2007; WHITESIDE, 2008).

A resposta imune diz respeito às diversas alterações sofridas pelas células durante o processo de transformação neoplásica, a exemplo da expressão de antígenos mutados, as tornando imunogênicas, ou seja, atraindo a resposta imune na tentativa de extinguir esse novo desenvolvimento. Sendo comprovada a atuação do sistema imunológico, principalmente, contra o surgimento das neoplasias atuando na regressão instintiva dos tumores (GIRALDO et al., 2015).

Ainda, no sistema imune, as células denominadas macrófagos, células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, ricos em lisossomas, que fagocitam elementos estranhos ao corpo, são encarregadas do processamento e conferência de antígeno às células T antígeno específicas, possuindo papel de destaque associada a resposta da atividade anti-inflamatória, tumoricida, microbicida, de reparo e renovação dos tecidos, além da imunidade inata, sendo intermediadoras entre a imunidade inata e adaptativa (KLIMP et al., 2002; DEN HAAN&KRAAL, 2012).

Assim como outros tumores experimentais, o tumor de Ehrlich produz alterações severas no sistema hematopoético de seu hospedeiro, sendo frequentemente associadas com imunodepressão, anemia, trombocitopenia e leucocitose granulócito-dependente (QUEIROZ et al., 2008).

Diante disto, Calgarotto (2012) afirma o envolvimento da produção de fatores solúveis produzidos pelas células tumorais ou pela interação tumor-hospedeiro nos mecanismos homeostáticos da medula óssea. Sendo ressaltada a maior



sensibilidade do compartimento granulocítico-macrofágico aos efeitos provocados pelo crescimento tumoral (QUEIROZ et al., 2008). Os estudos precursores relacionados decorrem de Keeb e Lala (1978) com a técnica de cultura de células precursoras mielóides em meio semi-sólido, onde demonstraram uma diminuição das células da medula óssea comprometidas com o desenvolvimento de colônias de granulócitos-macrófagos em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

A influência do crescimento tumoral na proliferação e diferenciação das células pluripotentes (CFU-S) e nas células progenitoras (CFU-C) foi inicialmente proposta por Pessina et al. (1982) que verificaram que o pré-tratamento *in vitro* de células de medula óssea normais com fluido ascítico de Ehrlich produz uma redução severa no número de colônias formadas a partir de células precursoras da medula óssea (CFU-C) e de células pluripotentes (CFU-S).

Relacionando-se ao envolvimento da imunidade celular, Marusic (1979) iniciou a proposta em estudo da resposta imune contra o Tumor Ascítico de Ehrlich utilizando camundongos deficientes em células T, comprovando que a imunidade desenvolvida frente a este tumor também depende das células T. Outros estudos reafirmam que a supressão da resposta imunológica do tipo celular mediada por macrófagos, linfócitos T (SEGURA et al., 2000) e células NK (SHEEJA&KUTTAN 2007) é uma consequência inevitável da progressão tumoral.

Vários mecanismos são apresentados como responsáveis pela supressão imunológica induzida pelo tumor, como a regulação negativa de fatores humorais (VALADARES et al., 2004), a produção de citocinas imunossupressoras (TAKATA et al., 2005), indução de macrófagos (ELGERT et al., 1998) e células T supressoras (UTSUMI et al., 1990).

Durante o desenvolvimento do tumor pode ocorrer alteração do fenótipo Th1 para o Th2 com conseqüente inibição da liberação de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (TAKATA et al. 2005), redução da capacidade citotóxica de células NK (VALADARES et al., 2003), aumento nos níveis de IL-10 (VALADARES et al., 2004) e de PGE2 (VALADARES et al., 2006), acompanhado de reduzido influxo de células inflamatórias na cavidade peritoneal (VALADARES et al., 2004).

A intensidade da reação inflamatória provocada pelas células tumorais é de fundamental importância na evolução do crescimento tumoral. Resultados positivos vêm sendo obtidos em laboratório com o uso deste modelo experimental, sendo principalmente, aqueles que aumentam a taxa ou a duração da sobrevivência e reduzem

o crescimento tumoral na cavidade abdominal o que induz sua utilização em estudos da atividade imunomoduladora de diferentes compostos (CALGAROTTO, 2012).

O modelo experimental do Tumor de Ehrlich tem sido amplamente empregado como ferramenta em estudos que buscam a elucidação de mecanismos de ação antitumoral de novas substâncias (Guilarducci et al. 2016). Apesar da descoberta de muitos componentes antitumorais, ainda é necessário aumentar a gama de compostos disponíveis, encontrar moléculas mais eficazes e menos tóxicas e entender alvos profundamente únicos ou múltiplos, para combater o câncer com mais precisão.

### **3.5 Bioprodutos isolados de fungos como agentes antitumorais no tratamento do câncer de mama**

Sabe-se que os medicamentos envolvidos no tratamento do câncer se distendem da classe de antibióticos a inúmeras drogas anticancerígenas, que são derivadas de fungos que residem em plantas medicinalmente importantes e assim adquirem suas habilidades medicinais (VENUGOPALAN & SRIVASTAVA, 2015).

No decorrer dos anos, é crescente o interesse científico e comercial na descoberta de novos agentes anticancerígenos a partir de compostos naturais (FERREIRA et al., 2011; ANTONI et al., 2016). Esses compostos adicionaram uma contribuição significativa nos modelos de tratamento quimioterápicos do câncer. Assim, instigou-se a busca por parte de pesquisadores do mundo inteiro pelo potencial anticancerígeno de substâncias que melhorassem a ação de compostos existentes como antitumorais ou mesmo a descoberta de novas substâncias (LIAO et al., 2012). Na Tabela 5 são apresentados estudos que relatam potenciais anticancerígenos de substâncias que foram isoladas de fungos endofíticos frente a linhagens celulares do CM.

Dentre os compostos com atividade antitumoral estão os metabólitos secundários produzidos por fungos como polifenóis, flavonoides, quinonas, esteroides, entre outras (MESQUITA et al., 2011). Os fungos são fundamentais na bioprospecção de substâncias, sendo dos 23 mil compostos ativos identificados, 42% advém de origem fúngica, ressaltando tal importância (DEMAIN, 2014).

**Tabela 5.** Compostos antitumorais frente a linhagens de câncer de mama isolados a partir de fungos endófitos extraídos de plantas.

PLANTA	FUNGO	ISOLADOS	LINHAGEM	REF.
<i>Morinda officinalis</i>	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	koninginóis AC ácido 11-hidroxi-15- drimeneóico koninginol D	MCF-7	Chen et al. (2019)
<i>Tabebuia rosea</i>	<i>Aspergillus</i> TRL1	Pulchranina A	MCF-7	Moussa et al. (2018)
<i>Rosellinia sanctae-cruciana</i>	<i>Albizia lebbbeck</i>	Jammosporin A	MDA-MB-231	Sharna et al. (2018)
<i>Anvillea garcinii</i>	<i>Fusarium chlamydosporium</i>	Fusarithioamide	MCF-7	Ibrahim et al. (2018)
<i>Launaea arborescens</i>	<i>Dothiora sp.</i>	Hipoleninas AC	MCF-7	Perez-Bonilla et al. (2017)
<i>Hyptis suaveolens</i>	<i>Aspergillus terreus-F7</i>	Terreína Butirolactona Butirolactona V	MDA-MB-231/ MCF-7	Silva et al. (2017)
<i>Acanthus ilicifolius</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Cloropreussomerinas AB	MCF-7	Chen et al. (2016)
<i>Olea europea</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Meleagrina c-Met	MDA-MB-231/468	Mady et al. (2016)
<i>Pogostemon cablin</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i> A606	isococlioquinonas DE coclioquinonas GH	MCF-7	Wang et al. (2016)
<i>Caesalpinia echinata</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Beauvericina	MCF-7	Campos et al. (2015)
<i>Bursera simaruba</i>	<i>Acremonium camptosporum</i>	Acremoxanthone E	MCF-7	Meléndez-González et al. (2015)
<i>Paris axialis</i>	<i>Phomopsis amygdale</i>	4,5-dihydroxy-3- (2- hydroxyethyl) - 1- methoxy-8- methoxycarbonylxanthone	MCF7	Yuan et al. (2015)
<i>Olyralati folia</i>	<i>Libertella blepharis</i>	3-epi-Waol A	MCF-7	Adames et al. (2015)
<i>Thymelaea lythroides</i>	<i>Chaetomium aureum</i>	Chaetorcinol	MDA-MB-231	Kabbaj et al. (2015)
<i>Paris polyphylla</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	Isocumarina	MCF-7	Zhou et al. (2015)

<i>Duclauxamide</i> A1	<i>Penicillium</i> <i>manginii</i> YIM	Duclauxamide A1	MCF-7	Cao et al. (2015)
<i>Fallopia</i> <i>japonica</i>	<i>Cercospora</i> sp.	Cercosporone F	MCF-7	Feng et al. (2014)
<i>Paris</i> <i>polyphylla</i>	<i>Aspergillus</i> <i>vesicolor</i>	Aspergilline A Aspergilline B Aspergilline C	MCF7	Zhou et al. (2014)
<i>Myoporum</i> <i>bontioides</i> A. Gray	<i>Trichoderma</i> sp.	Diclorodiaportinol A	MCF-7	Li et al. (2014)
<i>Eupatorium</i> <i>adenophorum</i>	<i>Phoma</i> <i>multirostrata</i>	Multirostratin A 20-oxo-deoxaphomin	MCF-7	Chen et al. (2015)
<i>Ajuga</i> <i>decumbens</i>	<i>Myrothecium</i> <i>roridum</i>	Myrotheciumone A	MCF-7	Lin et al. (2014)
<i>Aegiceras</i> <i>corniculatum</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Pestalol B	MCF-7/ BT474	Sun et al. (2014)
<i>Kandelia</i> <i>candel</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	Phomopsidone A	MDA-MB- 435	Zhang et al. (2014)
<i>Kandelia</i> <i>candel</i>	<i>Cladosporium</i> sp	Cladosporone A	MCF-7	Ai et al. (2014)
<i>Astragalus</i> <i>lentiginosus</i> .	<i>Emericella</i> sp.	Ferroemestrina emericeleenes	MDA-MB- 231	Xu et al. (2013)
<i>Cinnamomum</i> sp.	<i>Annulohyphoxylon</i> <i>squamulosum</i>	Annulosquamulin	MCF-7	Cheng et al. (2012)

As pesquisas relacionadas a essa temática baseiam-se nos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de extrema importância para biotecnologia, assim como para a medicina pela produção dos seus agentes anticancerígenos. Porém, novos agentes em potencial estão em estudos com base na atividade seletiva destes contra alvos moleculares relacionados ao câncer (KUSARI et al., 2012). E através da biotecnologia é possível ser avaliada a utilização destes em benefício de melhorias significativas aos tratamentos atuais para o câncer (CALDERANI et al., 2018). O estudo dos produtos obtidos através desses microrganismos e por seus metabólitos que demonstram potenciais anticancerígenos torna-se alvo, de diversos estudos para explorar essas atividades dos mesmos frente a linhagens celulares de câncer (CALDERANI et al., 2018).

Dentre as diversas classes dos compostos produzidos por esses fungos com potenciais de atividade antitumoral encontram-se os polifenóis, flavonoides,

quinonas, esteróides, xantonas, isocumarinas, compostos fenólicos, alcaloides e terpenos (RAMOS, 2008; SANTOS&VARAVALLO, 2011). Além de glicosídeos simples para alcalóides complexos, ácidos fenólicos e outros (KHARWAR et al., 2011; XIAO et al., 2013). Todas estas classes de substâncias podem ser derivadas de vias biossintéticas ou degradativas (SHAW et al., 2015).

Entre as principais classes estão as antraciclina, sendo inclusive utilizadas no tratamento quimioterápico como doxorrubicina, o antibiótico antracíclico com atividade antitumoral, sendo eficaz para os estágios iniciais do CM e para metástase, mas seu uso é restrito pelo seu efeito cardiotoxico (LAO et al., 2013; CARVALHO et al., 2014).

Ainda, é importante destacar os flavonoides e o paclitaxel (Taxol®), composto mais utilizado na produção de medicamentos anticancerígenos, ressaltando a potencialidade biotecnológica e importância dos microrganismos endofíticos e seus metabólitos para a produção de fármacos (MESQUITA; NAZARI et al., 2011).

O paclitaxel é aprovado pela Food and Drug Administration, Organização dos Estados Unidos, para tratar diversos tipos de câncer, dentre eles o de mama (HEINIG et al., 2013). Originalmente, esse composto foi obtido da planta *Taxus brevifolia* a partir do primeiro fungo identificado como produtor desse composto o *Taxomyces andreanae* (STIERLE et al., 1993). A partir desta descoberta inúmeros estudos relacionados aos fungos endofíticos no tratamento do câncer revelaram que esse composto poderia ser produzido por outras espécies de fungos endofíticos (WEAVER, 2013).

O estudo “Anti-proliferative effect of fungal taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* against human pathogenic bacteria and human colon cancer cell line HCT 15” comprova o fato do taxol ser obtido de outros fungos endofíticos, ao conseguirem isolar o composto do fungo endofítico *Cladosporium oxysporum* isolado da planta *Moringa oleífera* e observar a atividade anticancerígena da substância frente a diversas linhagens cancerígenas (RAJ et al., 2015).

O isolamento do antitumoral também foi possível no estudo “Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodyplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*” desenvolvido pelos autores Pandi et al. (2011), onde o taxol foi obtido a partir do *Lasiodyplodia theobromae* advindo da planta *Morinda citrifolia*.

Outros estudos como o de Zaiyou et al. (2017) também isolaram o paclitaxel de uma cepa de *Phoma medicaginis* isolada de *Taxus wallichiana* no estudo “An endophytic fungus efficiently producing paclitaxel isolated from *Taxus wallichiana* var. *mairei*”.

### 3.5.1 Gênero *Penicillium*

Os metabólitos bioativos que são produzidos por fungos geralmente pertencem à classe dos ascomicetos, fungos filamentosos e endofíticos. O número total de substâncias bioativas conhecidas produzidas por fungos é de aproximadamente 8600 (GOMES, 2011).

O gênero *Penicillium* agrega fungos filamentosos que sintetizam elevada quantidade de metabólitos secundários bioativos conhecidos (CAFÊU et al., 2005; FRISVAD et al., 2004) com suas aplicações incluindo as drogas anticarcinogênicas e agentes imunossupressores (BAKER et al., 2006; SAMSON et al., 2014). Estes são também empregados comercialmente como agentes para a produção de enzimas (ARCHER et al., 2008; SUN et al., 2011).

O gênero possui 225 espécies com 347 sinonímias, além dos teleomorfos, *Eupenicillium* (45 espécies) e *Talaromyces* (24 espécies) (WANG et al.; SILVA et al., 2004). Essas espécies possuem elevada diversidade, sendo tanto morfológica quanto ao nível de metabólitos secundários (KIM et al., 2012). Estas podem ser encontradas em alimentos (SAMSON, 2010), em ambientes internos (NIELSEN, 2003), marinhos associados ao manguezal (SHABAB et al., 2011), marinhos (BHATNAGAR&KIM, 2010; MENG et al., 2011) e associados a plantas como fungos endofíticos (OLIVEIRA et al., 2011).

Desde a descoberta da penicilina, elas foram inseridas em pesquisas sobre bioprospecção de metabólitos no decorrer dos anos, demonstrando o interesse como fontes de moléculas bioativas a serem aplicadas (PETIT et al., 2009; OSMANOVA et al., 2010).

Tais fungos filamentosos apresentam várias características que despertaram o interesse para o uso biotecnológico desse grupo de espécies como o crescimento em substratos simples e de baixo custo (LOPES et al., 2013). Desta forma, é importante enfatizar a necessidade de estudos anticancerígenos com estes fungos.

Visto que, o câncer é uma das principais doenças mortais em todo o mundo (CHANDRA, 2012).

### 3.5.2 *Penicillium purpurogenum*

A espécie *Penicillium purpurogenum* pertence ao Filo *Ascomycota*, Classe *Ascomycetes*, Ordem *Eurotiales*, Família *Trichomaceae* e Gênero *Penicillium*. O *P. purpurogenum*, é um fungo saprófita que cresce em uma gama de fontes naturais de carbono, segregando um grande número de diferentes enzimas no meio (CHÁVEZ et al. 2006). Mas o habitat deste fungo é primariamente o solo, porém são encontrados em diversos ambientes úmidos (PITT, 1985; PITT, 2009).

Esse fungo filamentososo tem a capacidade de sintetizar uma variedade de substâncias com potencial biotecnológico e bioativas, além de enzimas como a  $\beta$ -glucosidase (DHAKE&PATIL, 2005), xilanases (SHALOM et al., 2008), celulases (TAUKTORNISIELO, 2004),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (FRITZ et al., 2008),  $\alpha$ -1,3-glucanase (SHALOM et al., 2008) e substâncias colorantes (MÉNDEZ et al., 2011).

O método comumente usado para identificação de espécies de *Penicillium* é a visualização das características morfológicas das colônias (textura, cor e diâmetro da colônia), e estruturas de reprodução (tipos e tamanhos de conídios e conidioforo), além das técnicas de biologia molecular (OKUSHIMA et al., 2004).

As características das colônias do *P. purpurogenum* incluem sua presença em meio de cultura Ágar Czapeck com diâmetro de 15 a 30 mm, sendo planas ou radial, densas, aveludadas, com micélio amarelo brilhante ou vermelho devido às hifas incrustadas, e reverso da colônia vermelho escuro a roxo, aproximando-se do preto (PITT, 1985; PITT, 2009).

Em Agar Extrato de Malte (MEA) esse diâmetro varia de 22 a 35 mm de diâmetro, tendo colônias planas, densas, aveludadas com micélio de branco a amarelo brilhante e reverso usualmente claro, sendo marrom ou vermelho opaco no centro (PITT, 1985; PITT, 2009).

Os seus conidióforos apresentam-se a partir da superfície ou do micélio aéreo, com estirpes de 70 a 300  $\mu$ m de comprimento, parede lisa, penicílio terminal biverticilado conídio elipsoidal, tornando-se eventualmente subesferoidal quando maduro, 3,0 a 3,5  $\mu$ m de comprimento, com paredes lisas, finamente áspera ou verrugosa (PITT, 1985; PITT, 2009).

A sua característica mais distintiva é a difusão intensa e rápida de pigmentação vermelha em meio CYA, tanto a 25 quanto a 37 °C. Em casos de ausência de pigmentação, a característica inclui: conídio verde escuro no CYA e em MEA, crescimento moderado a 37 °C, penicílio estreito e parede pesada, variando de elipsoidal a subesferoidal do conídio. As paredes conidiais variam de bastante lisa a áspera (PITT, 1985; PITT, 2009).

Nesta pesquisa verificamos características das colônias do *P. purpurogenum* no meio de cultura Ágar Batata com diâmetro de 15 a 30 mm, sendo planas ou radial, densas, aveludadas, com micélio purpura brilhante ou vermelho devido às hifas incrustadas, e reverso da colônia escuro a roxo.

Alem de suas características morfológicas diversas pesquisa demonstram sua capacidade de produzir metabólitos secundários, pois os fungos são uma fonte rica de compostos úteis devido às suas propriedades químicas e tóxicas.

### **3.5.3 Atividades biológicas em cepas selvagens de *P. purpurogenum***

Os fungos sintetizam moléculas com diversas estruturas químicas e uma ampla gama de atividades biológica como pode ser verificada na tabela 6.

Sun et al.,(2016) isolaram cinco novos compostos, e quatro metabólitos conhecidos da cepas *P. purpurogenum* MHZ 111 e verificaram que As estruturas dos novos compostos foram: Purpurogenolida B, Purpurogenolide C, Purpurogenolide D e berkeleyacetal C mostraram inibição da produção de óxido nítrico em células microgliais BV-2 ativadas por lipopolissacarídeo.

Pesquisa realizada Etoh et al., (2013) demonstra que Berkeleyacetal inibe a produção de NO induzida por LPS e PGN e a expressão da iNOS, diminuindo o nível de translocação de NF-κB em nuclear através da inibição da atividade de quinase de IRAK-4 em células inflamatórias. E como os novos meroterpenoides encontrados possuem estruturas semelhantes ao berkeleyacetal C, podendo desencadear vias anti-inflamatórias semelhantes ao berkeleyacetal C nas células microgliais BV-2.

Em busca de novas moléculas Sun et al.,(2017) isolaram da cepas *P. purpurogenum* MHZ 111 uma nova di-hidroisocumarina e uma nova cumarina e oito metabólitos conhecidos, sendo que as cepas conhecidas, aspergilumarina A, 6-metoximelina e pestalasin A foram identificadas pela primeira vez no gênero *Penicillium*, enquanto os compostos 3-hidroximetil-6,8-dimetoxicumarina,



vermistatina e 3'-O-metildehidroisopenicilídeo foram relatados pela primeira vez em uma cepa de *P. purpurogenum*. Dos compostos isolados apenas a nova cumarina e a vermistatina mostraram atividade inibitória contra a produção de óxido nítrico.

**Tabela 6.** Principais metabólitos bioativos isolados dos extratos de *P. purpurogenum*

<b>Principais metabólitos bioativos isolados dos extratos de <i>P. purpurogenum</i></b>	<b>REF.</b>
(3R, 4S) -isostrepenol III	Shaaban (2018)
Pigmento	Jin et al.,(2018)
Dihidroisocumarina	Sun et al. (2017)
Ácido (S)-tenélico B dimetil acetal, (3R, 3'R/S)- isotalarona e (3R ,5R) -cis-5-metil-3-(2-oxobutil) -di-hidrofuran-2-ona	Shaaban et al. (2016)
Purpurogenolide A-E	
Berkeleyacetal C, 22,23-epoxyberkeleydione, chrodrimanin B, chrodrimanin E	Sun et al.,(2016)
Berkeleyacetal C	Li et al., (2017)
Purpurquinone B	Wang et al. (2017)

Li et al., (2017) ao descobrirem que o Berkeleyacetal C, isolado da cepa *P. purpurogenum* MHZ 111 possui atividade favorável na inibição da produção de óxido de nítrico (NO) de macrófagos estimulados pelo lipopolissacarídeo (LPS) resolveram verificar a atividade anti-inflamatória e os mecanismos de Berkeleyacetal C em macrófagos e neutrófilos. Os resultados mostraram uma inibição significativamente da expressão do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da produção de NO pelos macrófagos.

Assim como expressão e secreção dos principais fatores pró-inflamatórios e quimiocinas, incluindo fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), proteína inflamatória de macrófago-1 $\alpha$  (P1 $\alpha$ ) -1 $\alpha$ ), e a proteína quimiotática-1 dos monócitos (MCP-1) também foram intensamente

suprimidas. Berkeleyacetal C exerce fortes efeitos anti-inflamatórios inibindo as vias de sinalização de NF- $\kappa$ B, ERK1 / 2 e IRF3 e, portanto, possui grande potencial a ser desenvolvido como agente terapêutico para distúrbios inflamatórios

Enquanto que de Souza et al., (2013) pesquisaram a presença de fungos em própolis e uma das cepas identificadas foi o *P. purpurogenum* que foi cultivado em meio líquido para obter um extrato bruto que foi avaliada quanto à sua atividade antibiótica contra bactérias patogênicas, leveduras e *Cladosporium cladosporioides* e *A. flavus*. Demonstrando ser muito ativo contra o fungo fitopatogênico *Cladosporium cladosporioides*.

Jin et al.,(2018) pesquisaram a atividade antioxidante e antimicrobiana da cepa de *Penicillium purpurogenum* Li-3 e verificaram o pigmento secretado pelo fungo mostrou-se citotóxicidade fraca contra os embriões de peixe-zebra e apresentaram melhor capacidade de eliminação de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e atividade antibacteriana.

Nas pesquisas realizadas por Shaaban et al. (2016) que encontram três novos compostos bioativos e Shaaban (2018) pesquisando por novos compostos do fungo terrestre *P. purpurogenum* MM, identificaram o composto (3R, 4S) - isostreptenol III e verificaram que as atividades antimicrobiana do extrato bruto e do novo composto foram comprovadas usando um conjunto de microrganismos e uma fraca citotoxicidade pelo ensaio de camarão com salmoura.

Wang et al., (2017) ao estudarem purpurquinona B derivado do fungo *P. purpurogenum* JS03-21 comprovaram in vitro que ele foi capaz de suprimir a replicação do vírus H1N1 possuindo atividade anti-influenza A, foi ainda verificado a administração oral de purpurquinona B e houve a diminuição dos títulos virais pulmonares e melhorou a taxa de sobrevivência em camundongos infectados com H1N1, diminuindo significativamente as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6, RANTES e KC em pulmões infectados por H1N1 e células A549, atenuando as respostas inflamatórias.

Os pesquisadores citados acima observaram que a cepa *P. purpurogenum* é uma fonte prolífica de metabólitos com atividades biológicas significativas. Muitos quimioterápicos importantes anticancerígenos são metabólitos microbianos ou derivados semi-sintéticos. Investigar os metabólitos de fungos pode aumentar a chance de encontrar novos compostos.

### 3.5.4 Atividades anticâncer em cepas de *P. purpurogenum*

Pesquisa realizada na página eletrônica da US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed) utilizando as palavras *Penicillium purpurogenum*, marinho e câncer assim como suas combinações, verificamos que no período de dez anos foram encontrados apenas doze publicações.

Todos os trabalhos (Tabela 7) encontrados foram realizados com a cepa *P. purpurogenum* G59 de origem marinha, Fang et al.,(2012) relata que esta cepa não foi capaz de produzir metabólitos antitumorais com atividade no ensaio brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) usando células K562 (Leucemia crônica), com isso Chai et al.,(2012) desenvolveu uma nova abordagem ativando aglomerados genéticos silenciosos para a produção de metabólitos secundários adormecidos, introduzindo a resistência à gentamicina a cepa fúngica G59, demonstrando que suas vias biossintéticas fúngicas são silenciosas em condições de cultura padrão.

Chai et al.,(2012) ao obtiveram cento e oitenta e um mutantes em apenas nove apresentaram atividades contra a linhagem K562 e o que apresentou melhor resultado foi realizado o isolamento de quatro compostos e ambas atividade.

Fang et al.,(2012) desenvolveram uma estratégia prática para acessarem metabólitos silenciosos em fungos, usando a cepa G59 e um procedimento modificado de mutagênese de sulfato de dietila (SD). Para examinar o efeito da mutação induzida por SD na produção secundária de metabólitos, investigação química do mutante BD-1-6. Fracionando o extrato da cultura BD-1-6 identificaram três metabólitos antitumorais que não havia sido descrito pela cepa-mãe G59.

FANG et al., (2014) testaram as atividades antitumorais dos extratos acetato de etila da cepa G59 e de 42 culturas mutantes. Os extratos de 31 mutantes inibiram as células K562 e o extrato G59 não inibiu as células K562, ficou evidente que os mutantes adquiriram a capacidade metabólica de produzir metabólitos antitumorais através da mutagênese do SD.

Para identificar a composição química ativada pela mutagênese do SD, os extratos da cepa G59 e os 31 mutantes foram submetidos a análise química produzindo perfis diferentes. Estes resultados indicaram que algumas das vias biossintéticas originalmente silenciosas na cepa G59 foram ativadas para produzir metabólitos secundários bioativos nas cepas mutantes. A cepa mutante BD-1-3 por

apresentar melhor atividade antitumoral teve sua composição química purificada produzindo cinco metabólitos puros, em que as estruturas de quatro novos compostos foram elucidadas por métodos espectroscópicos e o composto cinco já havia sido identificado com base em seus dados físico-químicos e espectroscópicos (FANG et al., 2014).

**Tabela 7.** Compostos químicos produzidos por *Penicillium purpurogenum* após mutagenses com antibióticos.

<b>Mutantes</b>	<b>Antibióticos</b>	<b>Compostos novos</b>	<b>Linhagens</b>	<b>Referência</b>
5-1-4	Gentamicina	---	K562	Chai et al.,(2012)
BD-1-6	Sulfato de dietila	Purpurogemutantina e Purpurogemutantidina	K562, HL-60, HeLa, BGC-823 e MCF-7	Fang et al.,(2012)
BD-1-3	Sulfato de dietila	Penicimutanolona, Penicimutanina (A e B) e Penicimutatina	K562	FANG et al., (2014)
AD-2-1	Sulfato de dietila	Penicimutalidas (A a G)	K562, HL-60, HeLa, BGC-823 e MCF-7	Wu et al., (2014)
AD-1-2	Sulfato de dietila	Antineociclocitrinóis (A e B) e 23-O- metilantinoociclocitrinol	K562, HL-60, HeLa, e BGC-823	XIA et al.,(2014)
AD-1-2	Sulfato de dietila	Epiremispiorina B, Epiremispiorina B1 e Isoconiochaetona C	K562, HL-60, HeLa e BGC-823	XIA et al., (2015)
4-30	Neomicina	Curvularina, Citrinina, Penicitrinona A, Eritro-23-O- metilneociclocitrinol e 22E-7 $\alpha$ -metoxi-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxyergosta- 8, 22-dien-3 $\beta$ -ol,	K562, HL-60, HeLa e BGC-823	Wu et al., (2015)
3-f-31	Neomicina	Penicimutide	K562, HL-60, HeLa, MCF-7 BGC-823	Wang et al.,(2016)
3-f-31	Neomicina	Penicimutanolonas A e B, éter metil Penicimutanolona A e Penicimutide,	Varias*	Wang et al., (2018)
BD-3n-1	Sulfato de dietila	Purpurofuranona e Purpuropiranona	K562, HL-60, HeLa and BGC-823	Wu et al., (2019)
AD-1-1	Sulfato de dietila	ácido purpurogênico	K562, HL-60, HeLa e BGC-823	XIA et al.,(2019)
3-f-31	Neomicina	Penicimutanina C	K562, HL-60, HeLa, BGC-823 e MCF-7	Wang et al., (2020)

\*(A549, HeLa, MCF-7, HCT-116, HepG2, NCI-H1975, HL-60, K562, LS180, SW480, HT29, PC-3, BXPC-3, and PANC-1)

Wu et al., (2014) pesquisaram o mutante AD-2-1 antitumoral derivado da cepa G59, rastrearam metabólitos produzidos e identificaram sete novos compostos, dois lipopeptídeos conhecidos, cinco policetídeos conhecidos, no ensaio MTT os quatorze compostos inibiram varias linhagens de câncer e o extrato G59 não inibiram as células.

XIA et al.,(2014) isolaram três novos compostos e onze já conhecidos do mutante AD-1-2 obtidos pela cepa G59 de origem marinha que não produziram esses metabolitos demonstrando que essa ativação de metabolitos silenciosas na cepa G59 ocorreu pela mutagênese do SU. Continuando a pesquisa XIA et al.,(2015) identificaram seis compostos (três novos), que não foram observados no extrato G59, o efeito inibitório dos compostos foram testados pelo ensaio MTT e inibiram o crescimento das quatro linhagens de câncer testadas.

Enquanto que Wu et al., (2015) testaram a resistência à neomicina na cepa G59, Após o tratamento um total de 56 mutantes foi obtido. Em contraste com a cepa G59, os extratos 28 mutantes inibiram as células K562, indicando que os 28 mutantes adquiriram a capacidade de produzir metabólitos bioativos. Foram realizados ainda isolamento e a caracterização do mutante 4-30, por apresentar melhor efeito inibitório contra as linhagens de câncer, sendo identificados cinco metabólitos secundários bioativos não encontrados na cepa G59, demonstrando que a introdução da resistência à neomicina ativou a produção silenciosa de metabólitos secundários.

A mutagênese por neomicina foi testada também por Wang et al.,(2016) que identificaram um novo dipeptídeo e quatro dipeptídeo conhecidos, foi verificado ainda que três dos compostos, foram produzidos apenas na cepa mutante, mas outros foram produzidos nas cepas mutante e parental, indicando que a introdução de resistência à neomicina ativou as vias que eram silenciosas na cepa G59.

WANG et al., (2018) isolaram quatro novos metabolitos antitumorais de uma cepa mutante resistente à neomicina verificou ainda que o os compostos penicimutanolonas A e B podem induzir apoptose de células cancerígenas. Além disso, foi observada atividade antitumoral *in vivo* para o Penicimutanolonas A em camundongos portadores de tumor HCT116 de sarcoma murino.

Wu et al., (2019) testaram o mutante BD-3n-1 derivado da mutagênese de SU da G59 e identificaram dois novos policetídeos, foram isolados juntamente com dois policetídeos conhecidos, foi verificado por ensaio MTT que nenhumdos compostos

mostraram efeitos inibitórios notáveis nas quatro linhas celulares de câncer testadas. Xia et al.,(2019) verificaram a presença de um novo policetídeo isolados de um mutante derivado da cepas G59, conseguiu inibir as linhagens de câncer testadas.

Wang et al., (2020) isolaram um novo composto alcaloidal, da cepa mutante resistente à neomicina derivada da cepa G59, junto com quatro compostos conhecidos. Todos os compostos estudados inibiram a proliferação das cinco linhagens de câncer.

Diante das pesquisas acima verificamos que a cepa de *P.purpurogenum* de ambiente marinho vem sendo estudada na busca de metabolitos secundários ativos contra o câncer e a classe de meroterpenóides foi identificada em cepas mutantes, apresentando propriedades antitumorais.

### **3.5.5 Meroterpenóides e o *P. purpurogenum***

Os Meroterpenóides são produtos naturais híbridos parcialmente derivados de vias terpenóides, como o prefixo "mero" significa "parte, parcial e fragmento". Esse termo foi descrito pela primeira vez por Cornforth, em 1968, para descrever produtos naturais de origem biossintética mista, parcialmente derivados de terpenóides (GERIS; SIMPSON, 2009; MATSUDA; ABE, 2016)

Essa definição descreve compostos derivados de animais, plantas, bactérias, fungos e organismos marinhos que podem ser agrupados nessa classe de produtos naturais, que variam de moléculas amplamente distribuídas a metabólitos secundários específicos da espécie.

Exibem ainda uma enorme variedade estrutural, com estruturas que variam de compostos simples, compreendendo uma unidade prenil ligada a um derivado fenólico, aos mais complexos de cadeias de carbono altamente funcionalizadas (GERIS; SIMPSON, 2009).

Possuindo importantes atividades biológicas, que serão abordas logo a seguir, porém realizamos uma busca por meroterpenóides bioativos de *P.purpurogenum*, realizada na pagina eletrônica da US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed) utilizando as palavras *Penicillium purpurogenum* e meroterpenóides..

Entre os produtores de meroterpenóides, os fungos sintetizam moléculas com diversas estruturas químicas como é o caso dos dhilirolidos A a D foram isolados de

culturas de laboratório do *Penicillium purpurogenum* (de Silva et al., 2011). Em quanto que Fang et al., (2012) descobriram dois novos meroterpenóides a purpurogemutantina e purpurogemuntantina e a conhecida macroforina A foram isolados a partir de um mutante bioativo BD-1-6 obtido pela mutagênese de antibiótico, ainda foi comprovada “in vitro” atividade sua anticâncer.

Já Centko et al.,(2014) identificaram em *P. purpurogenum*, obtido da podridão de frutos da árvore *Averrhoa bilimbi*, dez novos meroterpenóides, dhilirolidos E a N, que representam os quatro esqueletos de carbono dhilirano, isodililano, 14,15-dinordililano e 23,24-dinorisodililano meroterpenóides sem precedentes e rearranjados. Sun et al., (2016) descobriram cinco novos meroterpenóides, purpurogenólidos A a E foram isolados das culturas de fermentação do substrato sólido do fungo *Penicillium purpurogenum* MHZ 111. As estruturas dos novos meroterpenóides foram elucidadas pela análise de dados espectroscópicos e espectrométricos (RMN 1D e 2D, IR e HRESIMS).. Os compostos B a D mostraram inibição da produção de óxido nítrico em células microgliais BV-2 ativadas por lipopolissacarídeos.

Li et al.,(2017) investigaram Berkeleyacetal C composto isolado *P. purpurogenum* MHZ 111 e descobriram que ele exerce fortes efeitos anti-inflamatórios inibindo as vias de sinalização NF $\kappa$ B, ERK1 / 2 e IRF3 e, portanto, mostra grande potencial a ser desenvolvido como agente terapêutico para distúrbios inflamatórios.

Wu et al., (2019) testaram o mutante BD-3n-1 e identificaram quatro meroterpenóides, purpurofuranone e purpuropyranone quem foram encontrados pela primeira vez e os conhecidos cillifuranone e taiwapyrone. Os novos compostos foram elucidados por métodos espectroscópicos, especialmente com base na difração de raios X e os dados calculados das rotações ópticas. No ensaio MTT preliminar nenhum dos meroterpenóides demonstraram efeitos inibitórios notáveis sobre as quatro linhas celulares de câncer.

Xia et al.,(2019) verificaram a presença de três meroterpenóides um novo ainda não descrito na literatura o ácido purpurogênico e dois já conhecidos, (-) - mitorubrin e (-) – mitorubrinol. A estrutura planar do novo composto foi elucidado por métodos espectroscópicos e a configuração absoluta foi atribuída com base nos dados de  $[\alpha]_D$  e CD. Em nosso ensaio preliminar de MTT apenas ela conseguiu inibir as células de câncer testadas.

Outros meroterpenóides recém-descobertos por Xia et al., (2020), isolados do fungo endofítico *P. purpurogenum* IMM foram os Purpurolicos D a F, três novos bergamotanos polioxigenados com sistema de anéis tetracíclicos 6/4/5/5. Os compostos D a F mostraram atividade inibidora significativa contra a lipase pancreática (PL). O resultado destaca que a presença do radical decanóico 3-hidroxilado no C-14 é importante para aumentar a potência de inibição contra PL.



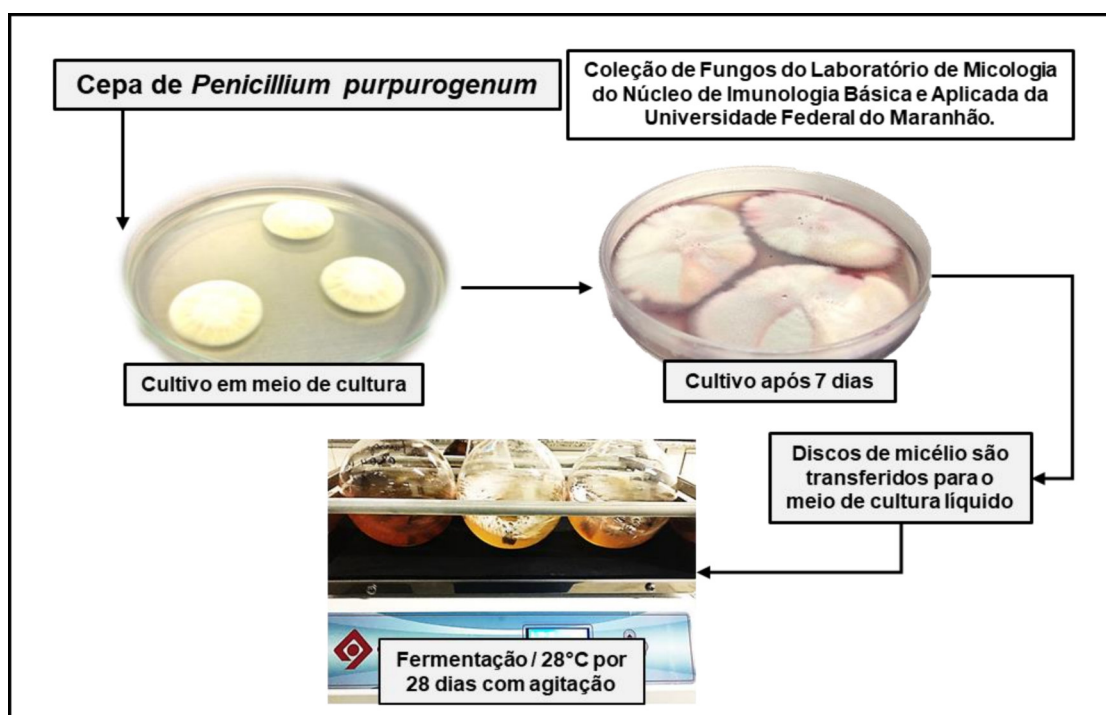
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do Fungo

A cepa do fungo *P. purpurogenum*, proveniente da coleção de fungos do Laboratório de Micologia localizado no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão foi cedida pela Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra. Sendo mantida em meio ágar batata a 28°C, com repiques quinzenais ficando armazenada na coleção de fungos da Universidade Federal do Maranhão para sua utilização sempre que necessário.

### 4.2 Cultivo de fungo *P. purpurogenum*

A linhagem do fungo foi primeiramente inoculada em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) e incubado a 28°C por 7 dias até completo crescimento. Após este período, círculos superficiais de ágar contendo o micélio foram transferidos das colônias, com o auxílio de uma seringa plástica, para um balão de fundo redondo contendo 250 mL do meio de cultura original líquido do fungo (sem ágar), onde foram deixados para fermentação por 28 dias a 28°C com agitação. O esquema experimental é apresentado na Figura 4.

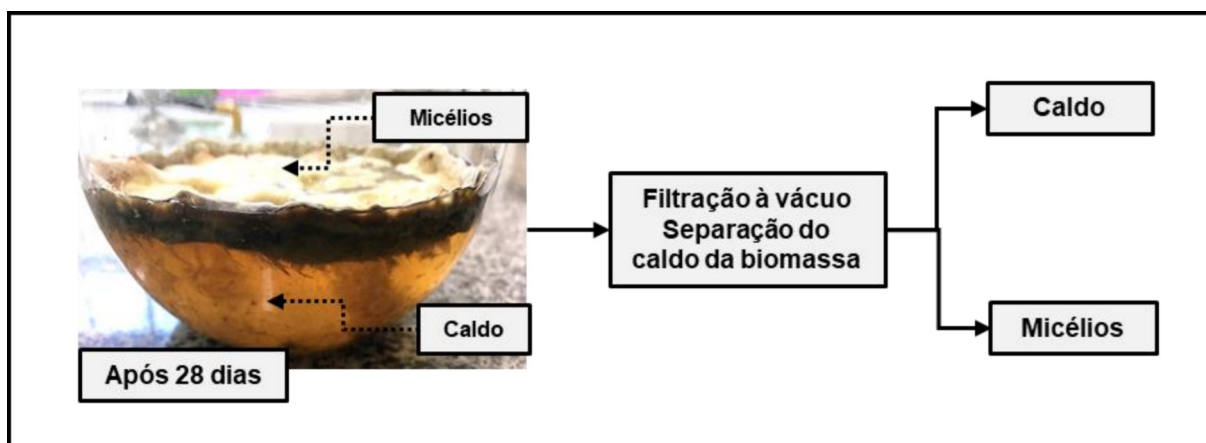


Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 4.** Esquema experimental do cultivo do fungo *Penicillium purpurogenum*.

### 4.3 Obtenção do Extrato de fungo

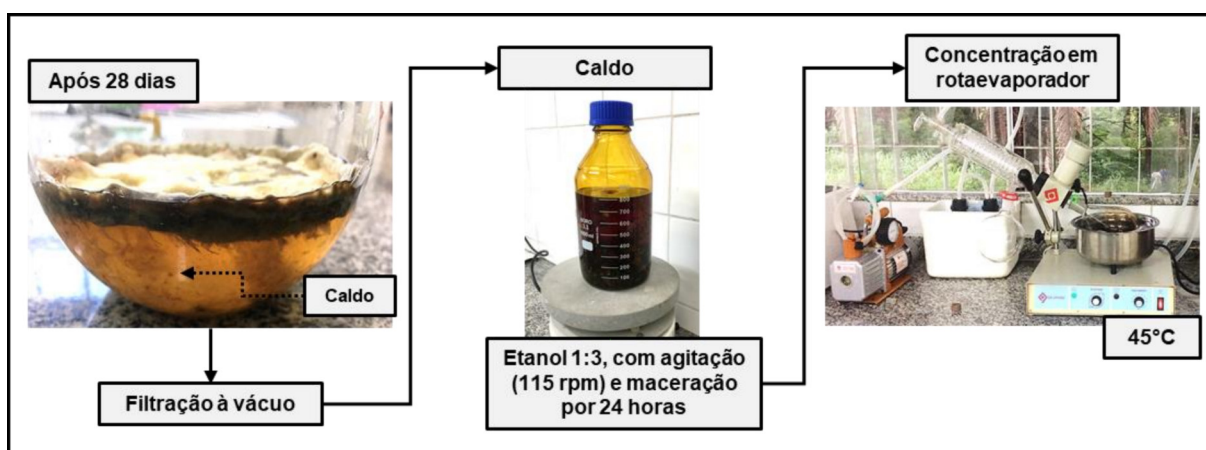
Após a fermentação, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração a vácuo, utilizando-se um funil de Buchner acoplado a um kitassato, conforme a Figura 5.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 5.** Esquema experimental apresentando o processo de fermentação após 28 dias.

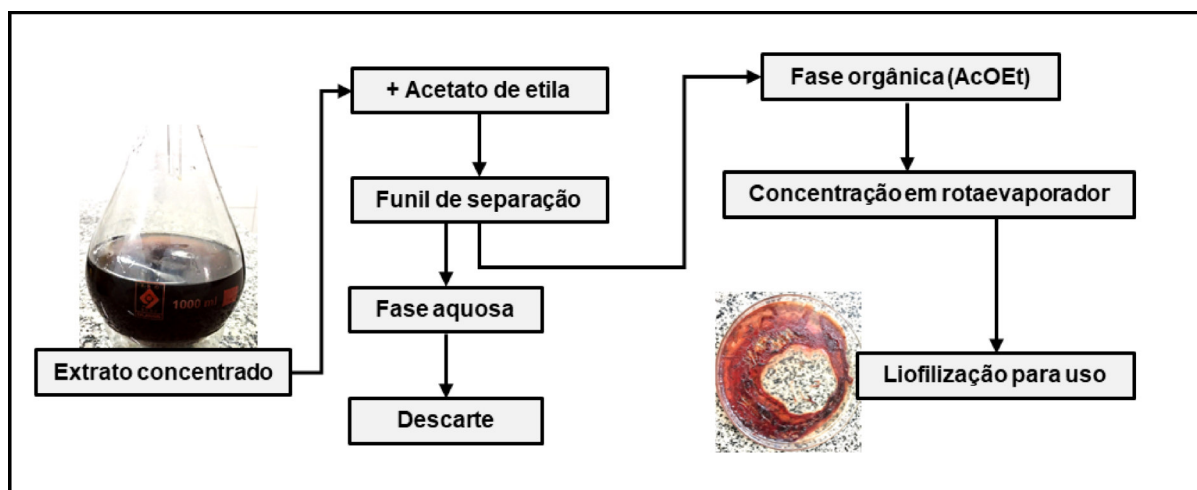
O caldo obtido neste procedimento foi adicionado a Etanol PA na proporção 1:3 e permaneceu sob agitação constante a 115 rpm por um período de 24 horas, sendo filtrado e concentrado em evaporador rotatório a 45°C, conforme a Figura 6.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 6.** Esquema experimental apresentando o tratamento recebido pelo caldo do processo de fermentação.

Com o objetivo de obter um extrato de média/alta polaridade dos metabólitos produzidos pelo fungo, o extrato concentrado obtido foi adicionado de acetato de etila e particionado, após 24 horas, em funil de separação de líquidos, resultando na obtenção de uma fase orgânica (AcOEt) e uma fase aquosa. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica, após concentração em evaporador rotatório, foi liofilizada, originando o extrato de AcOEt (FR1), conforme a Figura 7.

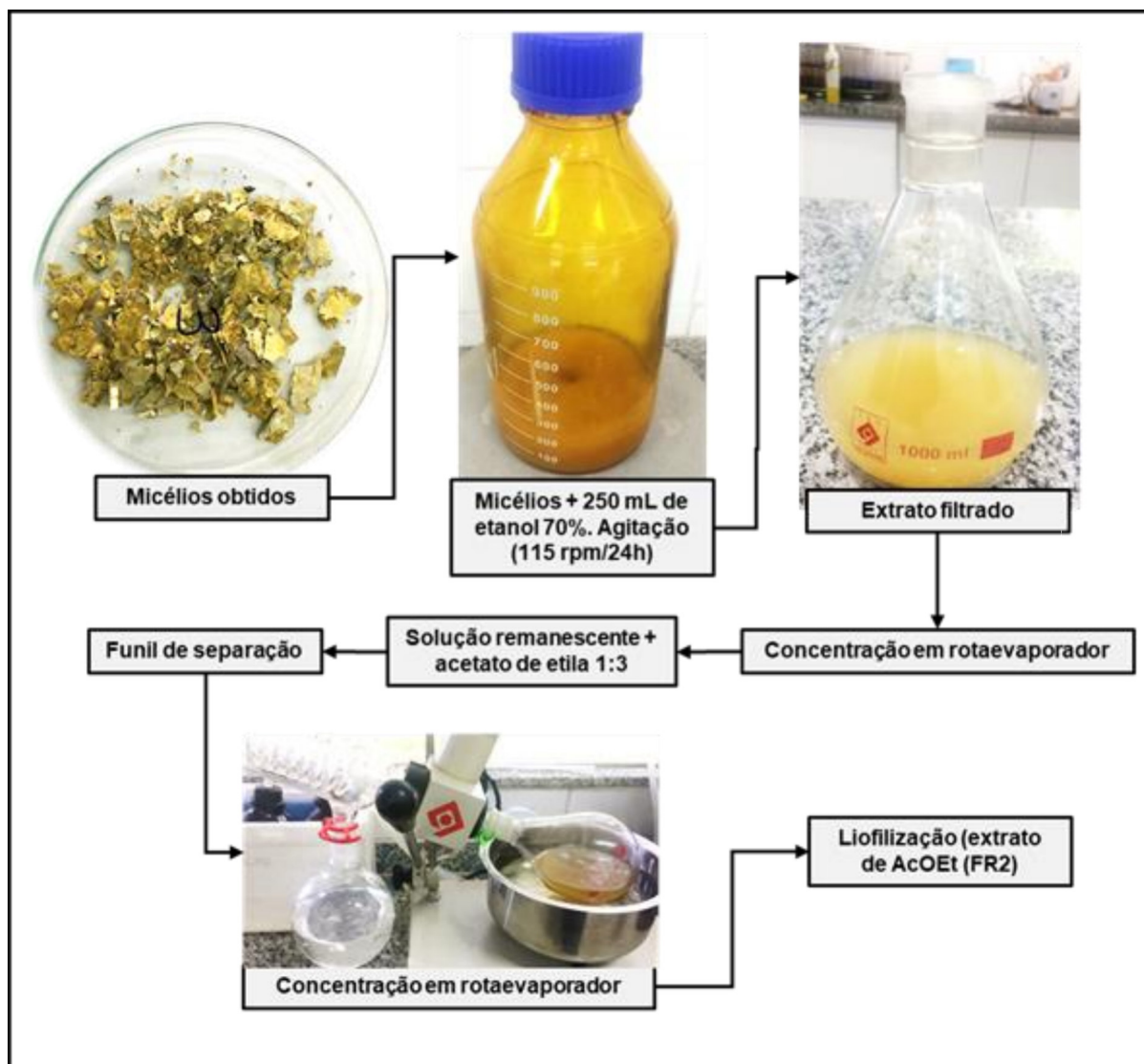


Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 7.** Esquema experimental apresentando o processo de tratamento do extrato concentrado após o processo de concentração do caldo de fermentação.

O micélio (biomassa do fungo), após total remoção do meio de cultura original líquido por filtração a vácuo, foi acondicionado em frasco reagente âmbar contendo 250 mL etanol 70% e mantido sob agitação constante a 115 rpm por 24 horas. O extrato obtido foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida até remoção total do etanol. À parte aquosa remanescente, foi adicionado acetato de etila na proporção 1:3, que após separação em funil de separação e eliminação do solvente em evaporador rotatório e liofilização, levou a obtenção do extrato de AcOEt (FR2). O esquema experimental descrito é apresentado na Figura 8.

O extrato extra e intracelular gerou uma patente de processo (PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *Penicillium purpurogenum*) que trata da obtenção de extrato de fungo que apresentam atividade quimioterapêutica contra o câncer de mama ou anti-inflamatórios (ANEXO A).



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 8.** Esquema experimental apresentando o processo de tratamento dos micélios do fungo após o processo de concentração do caldo de fermentação.

#### 4.4 Avaliação da composição química dos extratos FR1 e FR2 por infusão direta (ESI/MS)

Os extratos em acetato de etila do caldo (FR1) e da biomassa micelial (FR2) foram analisados por espectrometria de massas por infusão direta (ESI/MS) para avaliação de sua composição química. Os extratos foram pesados (3mg) e solubilizados em metanol com 0,1% de ácido fórmico em banho ultrassônico por 20 minutos. Após filtração, as amostras foram submetidas a inserção direta no espectrômetro de massas. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI/MS foram obtidos no modo positivo com o equipamento Bruker Daltonics Amazon SL íon trap. As condições gerais do

equipamento durante as análises foram: voltagem do capilar 4kV, temperatura da fonte 100°C, temperatura de dessolvatação 100°C, voltagem do cone 20-40 V. As amostras diluídas foram injetadas por uma bomba de injeção automática com fluxo contínuo de 10mL/min.

## **4.5 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro***

### **4.5.1 Cultura Celular**

Foram utilizadas as linhagens celulares MCF7 (ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>), MDA-MB-231 (ATCC<sup>®</sup> HTB-26), ambas derivadas de um adenocarcinoma mamário humano. As células foram cultivadas em garrafas estéreis contendo meio Dulbecco's modificado (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementados com 10% de soro fetal bovino com L-glutamina a 2mM, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina. Em seguida foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para os experimentos, as células em monocamada foram tripsinizadas com uma solução de tripsina 0,25% (p/v) – EDTA 0,03% (p/v). A linhagem de célula mamária humana normal MCF 10A (ATCC<sup>®</sup> CRL-10317<sup>™</sup>) foi cultivada em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina 2mM, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 100 ng/mL de toxina colérica, 10µg/mL de insulina, 20ng/mL de hEGF, 500ng/mL de hidrocortisona.

### **4.5.2 Citotoxicidade dos extratos FR1 e FR2 de *Penicillium purpurogenum***

As células MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A após o crescimento e de sua adesão na garrafa, foram lavada três vezes com PBS e as células aderentes foram removidas com tripsina por 5 minutos a 37°C estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após os cinco minutos a garrafa foi observada no microscópio invertido para verificar se as células foram removidas e logo após dentro da cabine colocada em falcon contendo meio de cultura suplementado, centrifugadas a 4°C por cinco minutos em 1500 rotações por minutos (rpm). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet formado ressuspendido em um volume de no máximo 3mL de DMEM. Uma alíquota de 1:100 foi utilizada para a contagem das células viáveis com azul de Trypan em câmara de Neubauer. A suspensão de células foi preparada em placa de 96 poços sendo depositado um volume de 100 µL de meio contendo 50.000 células/poço e

nas extremidades foi colocado água estéril. Poços apenas com meio foram utilizados como branco. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> para adesão. Os extratos liofilizados foram dissolvidos em DMSO (1%), filtrados em filtros de seringa com poros de 0,2 µm e armazenados a -20°C.

Ao mesmo tempo a doxorrubicina (DOX) e paclitaxel (PAC) foram diluídos em meio DMEM sem soro e foram filtrados em filtros de seringa com poros de 0,2 µm e usados imediatamente. As células foram tratadas (extratos e drogas de referência) em varias concentrações, mantendo-se poços controle negativo onde as células foram cultivadas na ausência dos extratos e das drogas e permaneceram na incubadora até o final do período de exposição das células ao tratamento (24, 48 e 72 horas).

Após o período de tratamento, adicionou-se 10 µL de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]), 5 mg/mL, e as placas foram incubadas por um período de 3 h em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após esta etapa, o sobrenadante é descartado e em seguida foi adicionado 50 µL de DMSO por poço para eluição dos cristais de formazan em agitação por 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada utilizando o espectrofotômetro Biochrom LIBRA S80PC (Biochrom, UK) com comprimento de onda de 570 nm. Os testes foram realizados em sextuplicata e em seguida normalizados conforme a equação abaixo:

$$\%Viabilidade\ celular = \left( \frac{\text{Absorbância das amostras} - \text{Absorbância do controle negativo}}{\text{Absorbância do controle negativo-branco}} \right) * 100$$

#### 4.5.3 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) indica a seletividade do extrato entre células neoplásicas e não neoplásicas, é determinado pela relação dos valores obtidos de IC<sub>50</sub> destas linhagens. A relação é obtida através da seguinte fórmula:

$$IS = \frac{\text{IC}_{50}\ \text{célula não neoplásica}}{\text{IC}_{50}\ \text{célula neoplásica}}$$

O IS indica o potencial deste extrato para testes pré-clínicos *in vivo* e clínicos. É considerado significativo valor de IS maior ou igual a 2,0 demonstrando que a substância é mais ativa em células neoplásicas (BADISA et al., 2011).

#### **4.6 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo***

##### **4.6.1 Local de experimentação**

A pesquisa *in vivo* foi realizada no laboratório de Imunologia Aplicado ao Cancer-LIAC da UFMA sob orientação da professora Dra. Ana Paula Azevedo utilizando o modelo de tumor de Ehrlich, gentilmente cedido pela Dra. Flavia Nascimento Professora do Laboratório de Imunofisiologia-LIF da UFMA.

##### **4.6.2 Animais e aspectos éticos**

Os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Maranhão (CEUA - UFMA) e aprovado sob registro com o nº 23115.11239/2017-70 (ANEXO B).

Foram usados nos ensaios camundongos Swiss fêmeas com peso entre 25-30g com 30 dias de idade, cedidas pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão, vinculada ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) e mantidos no biotério setorial do prédio da Pós-Graduação do CCBS. Os animais foram adaptados ao biotério experimental por 7 dias, mantidos em ambiente com temperatura e umidade monitorada e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, com água e ração *ad libitum*.

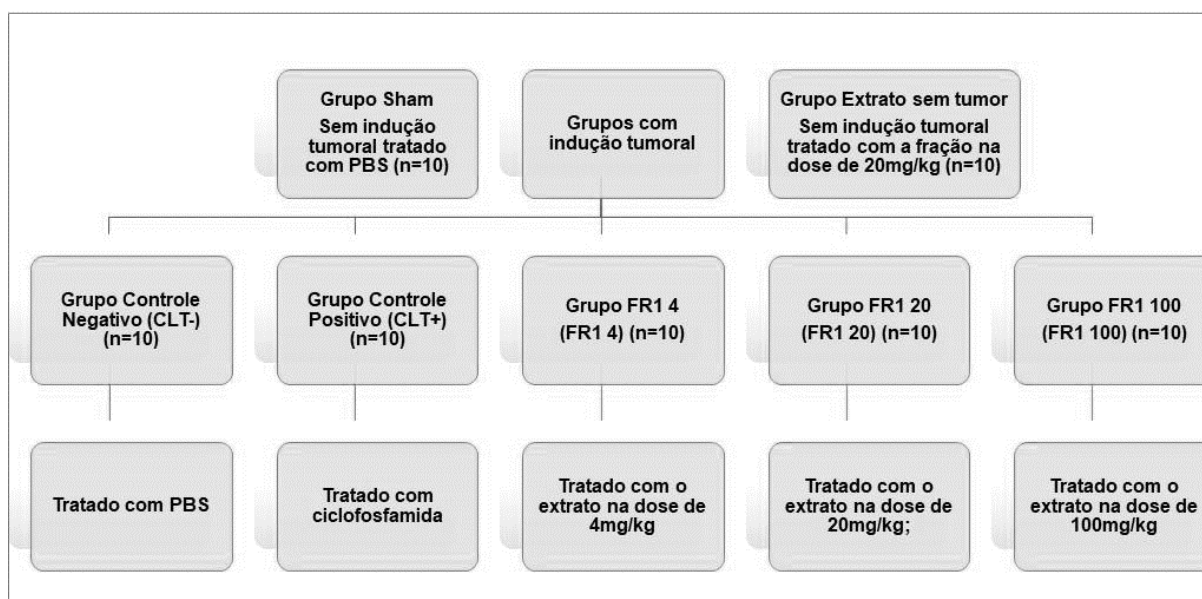
##### **4.6.3 Inoculação do tumor e tratamento dos animais**

No dia da inoculação, a ascite foi coletada dos animais usados para a manutenção do tumor e centrifugada por 10 minutos a 172g a temperatura de 18°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensos em Solução Tamponada de Fosfato (PBS). A lavagem foi repedida mais duas vezes ou até a obtenção de um sobrenadante límpido.

Para ajuste da concentração de células, as células tumorais foram ressuspensas em 10mL de PBS e retirada uma alíquota 10µl que foi adicionada 10µl do corante azul de Tripán 0,4%. As células foram contadas em câmara de

Neubauer, com auxílio de microscópio óptico, considerando as células viáveis as que não se coram em azul e as inviáveis as células coradas em azul. Para o experimento será considerado para inoculação a viabilidade mínima de 90%.

Os animais foram separados aleatoriamente em 7 grupos (n=10/grupo) conforme a Figura 9.



**Figura 9.** Divisão dos grupos experimentais

A indução do tumor foi realizada após o um inoculo de 200µL de uma suspensão celular na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL foi administrada no coxim plantar do membro posterior esquerdo para obtenção do tumor na forma sólida (FORTES, et al 2009).

Após 24 horas da inoculação, os animais do grupo controle negativo (CTL-) foram tratados intraperitoneal com 100µL de solução PBS; os animais do grupo controle positivo (CTL+) com 100µL de ciclofosfamida na dose de 25 mg/Kg; e os animais dos grupos tratados com os extratos (FR1 4, FR1 20 e FR1 100) receberam 100 µL da fração das suas respectivas doses de 4, 20 e 100mg/Kg de peso dos animais.

O tratamento foi realizado uma vez por dia, totalizando 15 dias de tratamento. No décimo sexto dia foram eutanasiados 5 animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, usando o método de sobredose de anestésico e, posteriormente, as patas foram removidas e pesadas.



#### 4.6.4 Índice da qualidade de sobrevivida

Para análise da sobrevivida os animais foram separados aleatoriamente nos grupos descritos acima (n=5/grupo) foram observados durante 30 dias após o inóculo do tumor seguindo um protocolo de qualidade da sobrevivida (ANEXO C). Os animais não inoculados com o tumor de Ehrlich obdeceram ao mesmo critério terapêutico.

#### 4.6.5 Avaliação do desenvolvimento tumoral

A avaliação do desenvolvimento tumoral foi determinada com base no percentual de inibição do crescimento tumoral através de mensurações diárias da pata com o uso de paquímetro digital foi avaliado a cada dois dias os parâmetros altura, comprimento e largura, onde foi calculado o volume de cada pata multiplicando os parâmetros medidos.

Para determinação da variação do volume da pata, foram determinados pela diferença dos valores da pata inoculada com tumor e os valores referentes à pata sem tumor, conforme a Equação 3 abaixo: (POSADA et al., 2004).

$$\Delta V = V_t - V_b \quad (3)$$

Onde:  $\Delta V$  = variação do volume da pata;  $V_t$  = volume da pata com tumor;  $V_b$  = volume sem tumor.

#### 4.6.6 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Após o tratamento, os animais foram anestesiados e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca através de seringa acrescida com anticoagulante do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Para a anestesia foi administrado por via intraperitoneal uma sobredose de anestésico (solução 2:1, 120 mg/kg de ketamina e 150 mg/kg Xilasina).

O sangue foi aspirado lentamente com o embolo até completar próximo a 1 mL. Posteriormente a seringa foi retirada, descartada a agulha no recipiente apropriado. O sangue foi usado para parâmetros bioquímicos e hematológicos. O sangue total foi utilizado também para confecção de lamina de esfregaço sanguíneo as lamina foram coradas com panotipo rápido seguindo as

especificações do fabricante e posteriormente feita a contagem relativa de leucócitos num total de 100 células. (MACIEL et al 2014)

O sangue foi centrifugado onde foi obtido soro que foi usado para a realização da dosagem bioquímica de transaminase glutâmico-oxálica (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP). Os testes foram realizados através de análises colorimétricas utilizando kits da Labtest, seguindo as orientações do fabricante e a obtenção dos dados foi feita em leitor visível (Lab. SyntemfMultiSkan EX).

#### **4.6.7 Avaliação da celularidade nos órgãos linfoides**

Para obtenção e quantificação das células do linfonodo (poplíteo no caso do tumor sólido), baço e medula óssea, os órgãos foram retirados, triturados e macerados em 1mL PBS já para obtenção das células da medula óssea, o fêmur foi retirado e perfundido com 1 mL de PBS para contar as células foram retiradas, 90 µL das suspensões celulares do linfonodo, baço e medula óssea foram adicionados a 10 µL de cristal violeta. As células foram contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum (FIALHO, 2011).

#### **4.7 Quantificação de citocinas**

A quantificação das citocinas interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-17A (IL-17A) e interleucina-10 (IL-10) foi realizada por citometria de fluxo com o equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), utilizando o kit de citocinas BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

#### **4.8 Avaliação histopatológica.**

As amostras de rim, fígado e dos tumores induzidos foram fixadas em formaldeído a 10% tamponado a pH=7.0 e incluídas em blocos de parafina. Foram obtidos cortes histológicos com 5 µm de espessura, que foram corados com hematoxilina e eosina e analisados através de microscópio óptico.

Os parâmetros considerados investigados no fígado foram à presença de degenerescência vacuolar hepatocitária (definida como leve se estivesse restrita à

zona centrolobular ou fosse multifocal, ou como moderada se for panlobular ou exibir padrão difuso em todo o órgão), de hepatite (definida como leve se for os espaços portais ou centrolobulares e como moderada/severa se houver formação de pontes leucocitárias entre espaços porta e veias centrolobulares ou áreas de fibrose), de áreas de necrose, definida como necrose de liquefação ou de coagulação, de cariomegália, definida como a presença de hepatócitos exibindo núcleos com o dobro do diâmetro normal e exibindo padrão de cromatina pálida e rarefeita e de figuras de mitose, utilizadas como um sinal de regeneração celular e contadas por campo de grande ampliação.

No rim foi avaliada a presença de degenerescência tubular, definida como a tumefação das células dos túbulos contornados proximais ou distais, ou a necrose de células tubulares isoladas ou a perda de vesículas celulares para o lúmen tubular (*blebbing*).

Nos tumores induzidos, foi avaliado o tipo de infiltrado inflamatório (tipos celulares presentes), bem como a sua distribuição (intra ou peritumoral, focal, multifocal, multifocal a coalescente ou difuso), presença de necrose, figuras de mitose (padrão 0 – não observadas, padrão 1 – uma figura ocasional, padrão 2 – uma figura por campo, padrão 3 – até duas figuras por campo), pleomorfismo nuclear (padrão 1 – baixo, padrão 2 – moderado, padrão 3 – elevado com presença de células gigantes multinucleadas) e padrão de crescimento (padrão 0 – tumores bem delimitados com crescimento compressivo, padrão 1 – invasão mínima, padrão 2 – invasão moderada, padrão 3 – invasão extensa). As laminais histológicas foram fotografadas com equipamento e as imagens obtidas foram preparadas para publicação com recurso ao software (BANCROFT&COOK, 1994).

#### **4.9 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias (S.E.M.). Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos a partir de curva de regressão não linear do log das concentrações dos extratos ou drogas de referência pela resposta normalizada de viabilidade celular. Para avaliação da curva de sobrevivência foi utilizada a curva de Kaplan-Meier e a análise estatística foi realizada pelo teste de Log-Rank. A diferença entre os demais resultados detectados durante os experimentos foi submetida à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Newman-Keuls e

teste t de Student com auxílio do software Graph Pad Prism, versão 7.0. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ( $p < 0,05$ ) (SOKAL&ROHLF,1996).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização química do extrato de *P. purpurogenum*

As análises espectrais de massa obtidos por infusão direta em modo positivo (ESI-MS/MS), apresentados na Tabela 8 e Figura 10, foram úteis para determinar o perfil químico dos extratos de *P. purpurogenum* (FR1 e FR2) e mostraram a presença de cinco compostos principais (1-5). Eles foram tentativamente identificados como meroterpenóides, compostos comumente produzidos por fungos (GERIS; SIMPSON, 2009) comparando os dados espectrais de massa com os descritos na literatura.

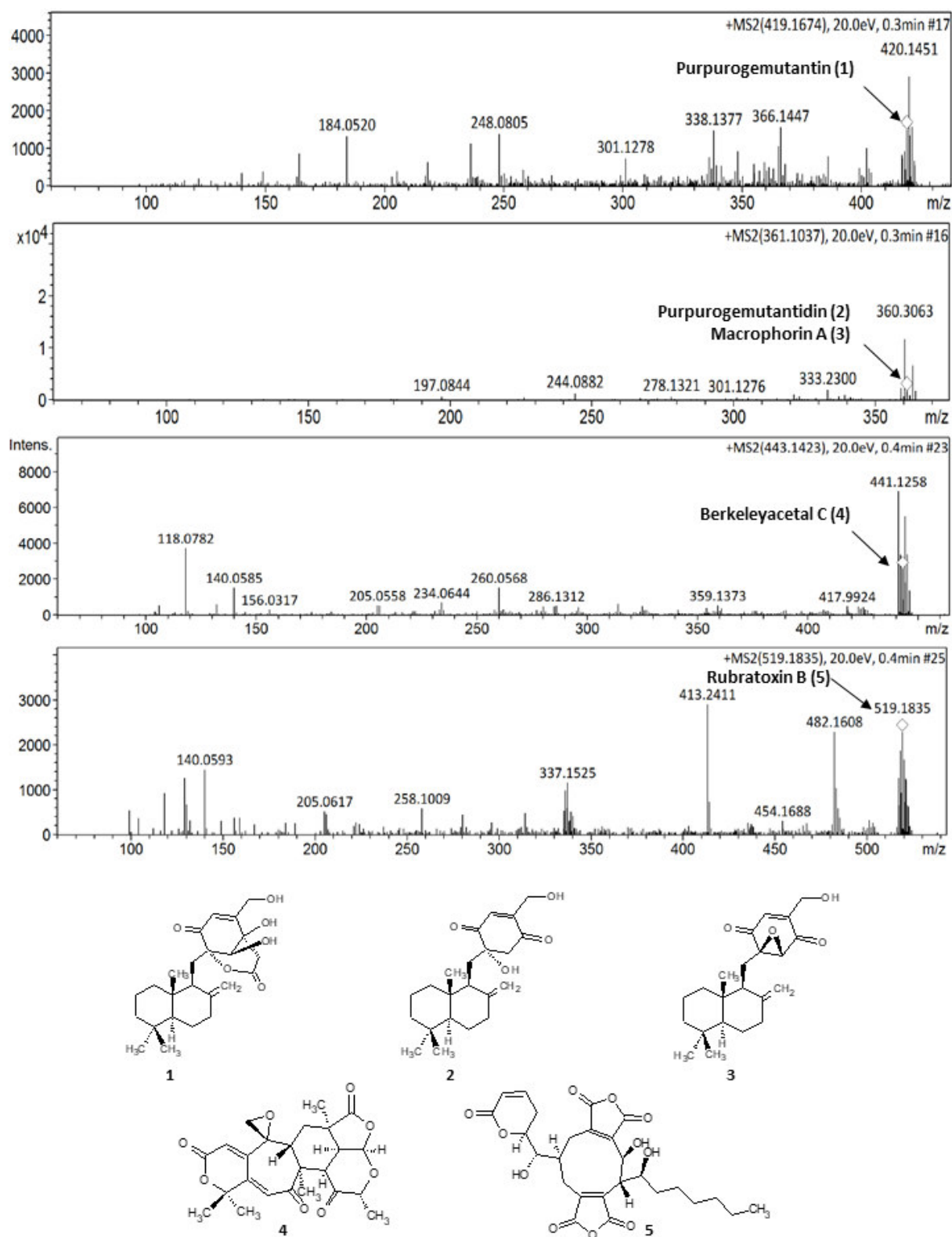
O composto 1 (purpurogemutantina) mostrou íons pseudo-moleculares experimentais ( $M + [H]^+$ ) a  $m/z$  419,1674, compatíveis com a fórmula molecular  $C_{24}H_{35}O_6$ . Os compostos 2 (purpurogemutantina) e/ou 3 (macroforina A) mostraram o mesmo íon pseudo-molecular ( $M + [H]^+$ ) a  $m/z$  361.1037 correspondente à fórmula molecular  $C_{22}H_{33}O_4$ . Esses compostos foram descritos anteriormente em extratos de *P. purpurogenum* por Fang et al (2012).

O Composto 4 (Berkeleyacetal C, fórmula molecular  $C_{24}H_{26}O_8$ ), outro meroterpenóide descrito anteriormente no mutante *P. purpurogenum* por Li et al (2017) apresentou íon pseudo-molecular ( $M + [H]^+$ ) em  $m/z$  443,1696 enquanto o composto 5 (A rubratoxina B) mostrou íon pseudo-molecular ( $M + [H]^+$ ) em  $m/z$  519.1758 correspondente à fórmula molecular  $C_{22}H_{33}O_4$ . A rubratoxina B é um meroterpenóide conhecido com atividade anticâncer isolada por *P. purpurogenum* (NATORI et al., 2020).

Outro íon de destaque, presente em ambas os extratos, é o de  $m/z$  743,5167 [ $2M+Na$ ], que de acordo com dados de literatura pode corresponder a um dímero de purpurogemutantidin adicionado de um átomo de sódio, artefato comum nas análises de massas.

**Tabela 8.** Íons moleculares das substâncias encontradas nos extratos FR1 e FR2 de *P. purpurogenum*.

FR1		FR2	
Íon molecular	Identificação provável	Íon molecular	Identificação provável
<b>361,1037</b>	Macrophorin A ou purpurogemutantidin	<b>361,3114</b>	Macrophorin A ou purpurogemutantidin
<b>419,1674</b>	Purpurogemutantidin	<b>419,1213</b>	Purpurogemutantidin
<b>443,1696</b>	Berkeleyacetal C	<b>443,1423</b>	Berkeleyacetal C
<b>480,1929</b>	Sem identificação	---	---
<b>519,1758</b>	Rubratoxin B	<b>519,1835</b>	Rubratoxin B
<b>579,2181</b>	Sem identificação	---	---
<b>743,5167</b>	Dímero de Purpurogemutantidin + Na <sup>+</sup>	<b>743,6071</b>	Dímero de Purpurogemutantidin + Na <sup>+</sup>



Fonte: Elaborado pelo autor.

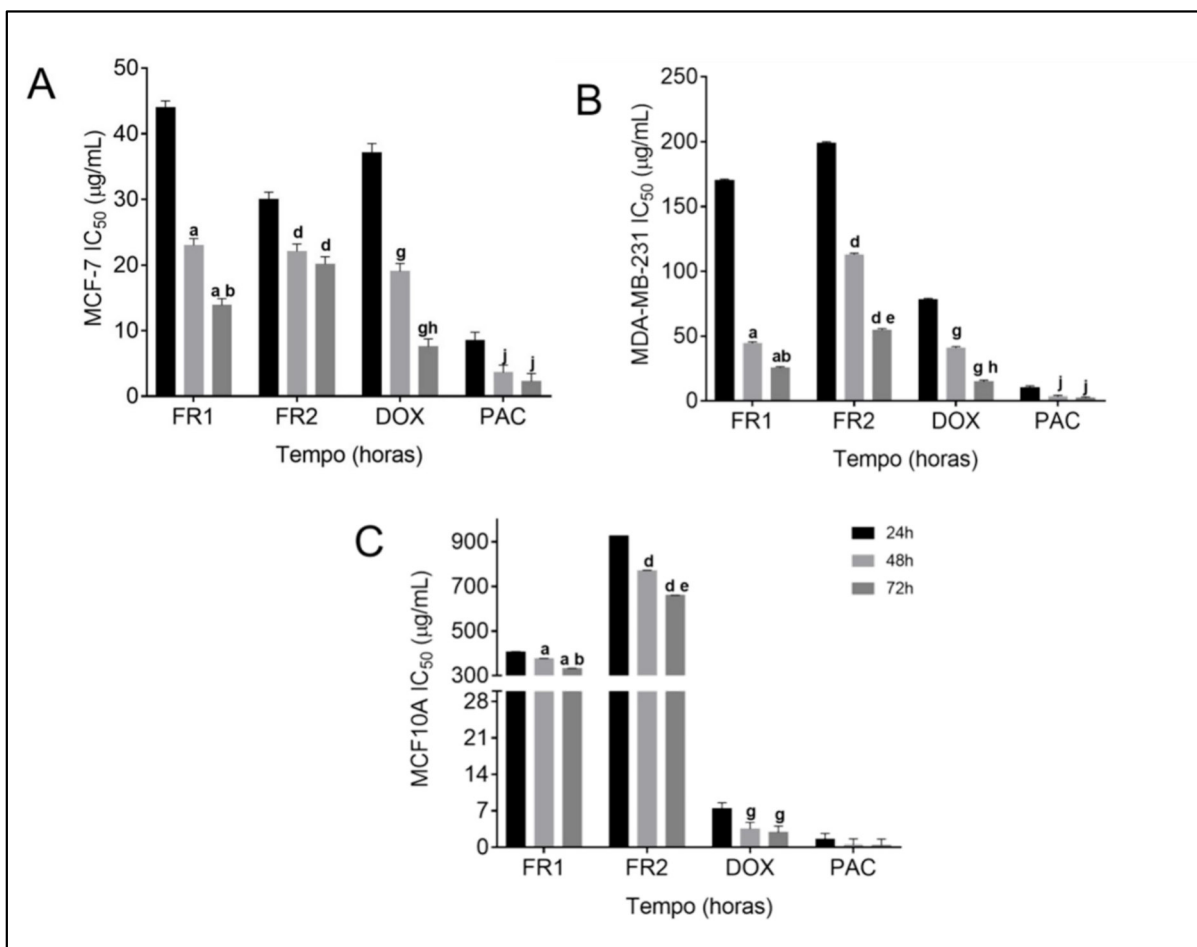
**Figura 10.** Espectros de massas obtidos para as substâncias presentes nos extratos de acetato de etila (FR1 e FR2) de *P. purpurogenum*.

## **5.2 Citotoxicidade dos extratos FR1 e FR2 frente a linhagens celulares MCF-7, MDA-MB231 e MCF10A**

No presente trabalho, nas linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A tratando com os extratos FR1, FR2 e quimioterápicos padrões doxorrubicina (DOX) e paclitaxel (PAC). Os resultados demonstraram que houve uma redução da viabilidade celular de uma forma dependente da concentração como foi apresentado no ANEXO D. Entretanto, foi verificado que na cinética, dependendo do tratamento, alguns se mostraram tempo dependente, outros não. Para o extrato FR1 e a doxorrubicina a MCF-7 apresentou um comportamento tempo dependente, no entanto, não foi observado para o extrato FR2 e paclitaxel, sendo que apenas o tempo de 24 horas mostrou uma redução significativa da viabilidade quando comparado com 48 e 72 horas.

Para a linhagem MDA-MB-231, quando tratado com FR1, FR2 e DOX, foi observado o comportamento tempo dependente, entretanto para o PAC esse efeito não foi apresentado. Na linhagem MCF-10A, o tratamento com FR1 e FR2 apresentou um comportamento dependente, o mesmo não foi observado para os quimioterápicos DOX e PAC, sendo os compostos mais citotóxicos na linhagem MCF-10A (Figura 11 e ANEXO E). Na verificação da IS foi observado que o extrato mostrou uma melhor seletividade que as drogas padrões (Tabela 9).





**Figura 11.** Efeito citotóxico dos extratos de *P. purpurogenum* em linhagens de células de mama, nos tempos 24, 48 e 72h dos extratos (FR1 e FR2) e os controles positivos doxorrubicina (DOX) e paclitaxel (PAC). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  D.P dos IC<sub>50</sub> (n=6 testes) e as análises foram feitas pelo Teste Anova one-way e pós-teste de Tukey (sendo significativo o valor  $p < 0,0001$ ). **(A)** A linhagem celular de MCF-7, o símbolo a comparado com tratamento com o FR1 em 24h, b comparado com tratamento com o FR1 em 48h, d comparado com tratamento com o FR2 em 24h, g comparado com tratamento com a DOX em 24h, h comparado com tratamento com a DOX em 48h e j comparado com tratamento com o PAC em 24h. **(B)** A linhagem celular de MDA-MB-231, o símbolo a comparado com tratamento com o FR1 em 24h, b comparado com tratamento com o FR1 em 48h, d comparado com tratamento com o FR2 em 24h, e comparado com tratamento com o FR2 em 48h, g comparado com tratamento com o a DOX em 24h, h comparado com tratamento com a DOX em 48h e j comparado com tratamento com o PAC em 24h. **(C)** A linhagem celular de MCF-10A, o símbolo a comparado com tratamento com o FR1 em 24h, b comparado com tratamento com o FR1 em 48h, d comparado com tratamento com o FR2 em 24h, e comparado com tratamento com o FR2 em 48h, g comparado com tratamento com a DOX em 24h.

**Tabela 9** - Índice de seletividade dos extratos de *P. purpurogenum* e de drogas de referência em relação a concentração inibitória para células normais de mama MCF 10A e células de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231

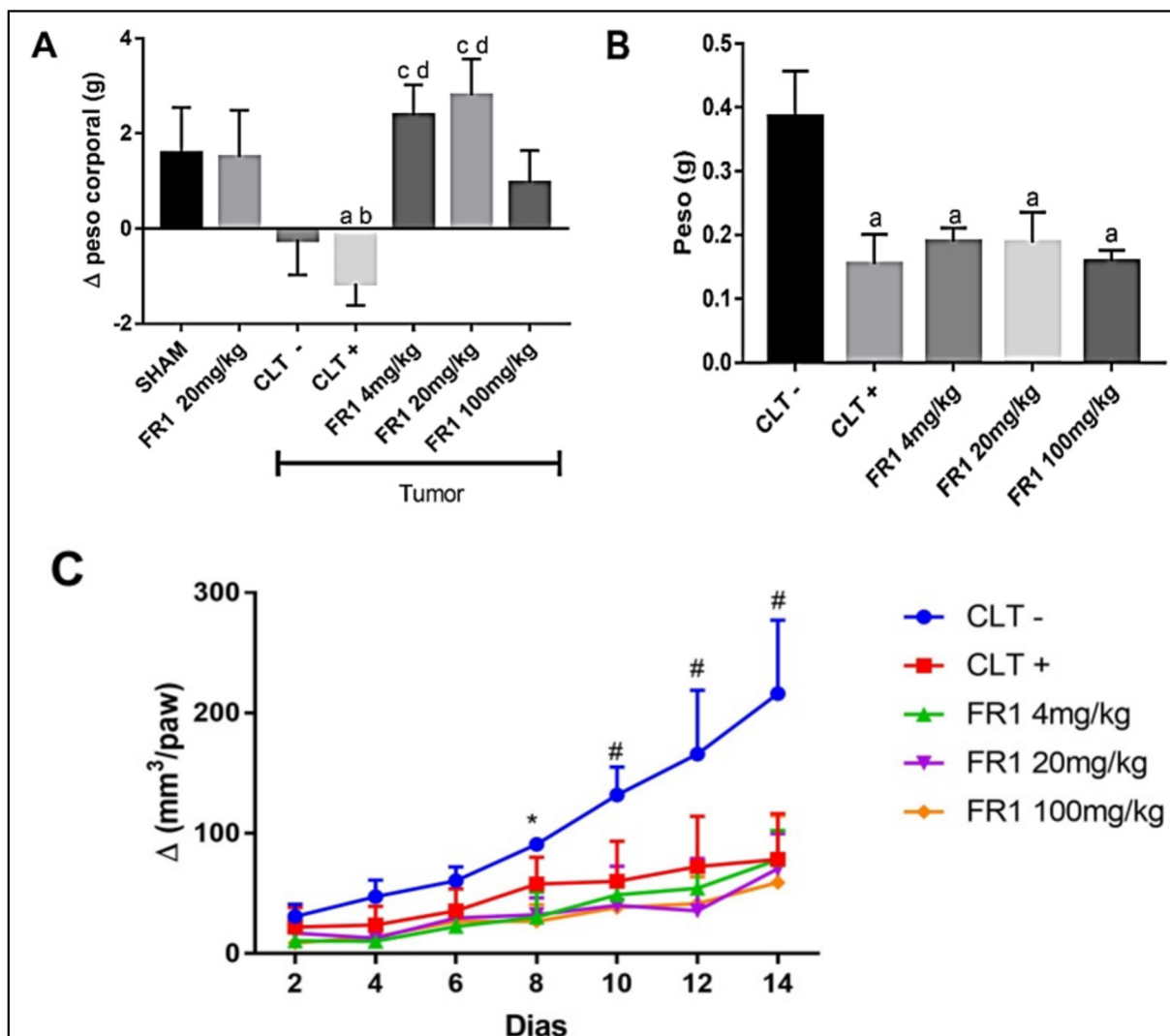
	IS <sub>MCF 10A/MCF7</sub>			IS <sub>MCF 10A/MDA-MB-2317</sub>		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<b>FR1</b>	9,26	16,38	23,97	2,39	8,45	13,04
<b>FR2</b>	30,89	34,93	32,76	4,65	6,83	12,05
<b>Doxorrubicina</b>	0,20	0,18	0,38	0,09	0,08	0,19
<b>Paclitaxel</b>	0,18	0,13	0,18	0,14	0,14	0,19

### 5.3 Avaliação do Efeito do extrato FR1 no desenvolvimento do Tumor sólido de Ehrlich

O extrato FR1 obtido de *P. purpurogenum* foi utilizado no tratamento do tumor sólido por via intraperitoneal. Durante o tratamento foi observado que apenas o grupo que recebeu ciclofosfamida apresentou redução significativa do peso dos animais, quando comparado com o animal Sham, entretanto, essa diferença não foi verificada nos animais que foram inoculados com o tumor e tratados com o extrato (Figura 12A).

Quando foi avaliado o peso da pata dos animais inoculadas com tumor foi observado que o grupo que recebeu ciclofosfamida apresentou redução do tamanho da pata quando comparado com o controle negativo e as doses do extrato demonstraram atividade similar, da menor a maior dose (Figura 12B).

O volume da pata ao longo do tratamento nos mostra que o grupo controle negativo apresenta uma curva ascendente e os grupos tratados com ciclofosfamida e as frações mantém valores próximos ao inicial. O extrato obtido do *P. purpurogenum* apresentou uma redução significativa a partir do oitavo dias de tratamento quando comparado com o controle negativo. O controle positivo reduziu significativamente o volume do tumor a partir do decimo dia (Figura 12C).



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 12.** Efeito do extrato *P. purpureogenum* no desenvolvimento do tumor de Ehrlich. No dia 0, foi feito inóculo do tumor de Ehrlich na pata, seguido do tratamento intraperitoneal com solução de tampão fosfato (CTL-), Ciclofosfamida 25mg/kg (CTL+) e extratos na concentração de 4 mg/kg (FR1 4mg/kg), 20 mg/kg (FR1 20mg/kg) e 100 mg/kg (FR1 100mg/kg), os grupos sem indução tumoral receberam solução de tampão fosfato (Sham) e extrato na concentração de 20 mg/kg (FR1 20mg/kg) nos em intervalos de 24h, sendo os animais eutanasiados no decimo quinto dia. **(A)** O peso corporal dos animais no final do tratamento. O símbolo a  $p < 0,005$  comparando com Sham, b  $p < 0,005$  quando comparado com FR1 20mg/kg sem indução tumoral, c  $p < 0,001$ ,  $p < 0,0001$  comparando com controle negativo e d  $p < 0,0001$  comparado com controle positivo. **(B)** O peso médio (g) do tumor foi determinado nos grupos após o tratamento. O símbolo a  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,05$  quando comparado com o controle negativo. **(C)** Cinética do volume médio da pata inoculada com tumor ao longo do tratamento de 15 dias. O símbolo \* demonstra que no oitavo dia os grupos tratados com extrato apresentaram menor volume tumoral que o controle negativo, # representa os dias em que tanto o grupo tratado com o estrato com com o controle positivo foi diferente do controle negativo. Valores foram expresso como média  $\pm$  erro padrão das médias (S.E.M. e S.D.) e analisado pela análise de variância (AN one-way or two-way ANOVA).

#### 5.4 Análise histopatológica do tumor de Ehrlich em animais tratados diariamente com o extrato FR1 de *P. purpurogenum*

Na avaliação histopatológica das patas inoculadas com tumor de Ehrlich verificou-se a presença de massas tumorais em todos os grupos com exceção do Sham e do extrato FR1 20 sem indução tumoral (Tabela 10). Em todos os grupos com indução, as massas tumorais exibiram elevada celularidade e diferentes padrões de crescimento, sendo observadas algumas diferenças na morfologia das células neoplásicas, com núcleo redondo a ovoide, central, de pleomorfismo moderado a muito elevado, com formas nucleares bizarras, presença de um ou mais nucléolos e padrões de cromatina heterogêneos. O citoplasma apresenta-se eosinofílico, abundante, de limites pouco definidos. Identificam-se células gigantes multinucleadas ocasionais (associadas com pleomorfismo de padrão 3) e até 2 figuras de mitose por campo de grande ampliação. O grupo tratado com o extrato na dose de 100mg/kg apresenta menor invasão tumoral dos tecidos adjacentes, em comparação com os restantes grupos.

Tabela 10 - Média dos escores relacionados aos parâmetros histopatológicos do tumor de Ehrlich obtido dos grupos tratados com PBS, Ciclofosfamida e extrato FR1.

	<b>Pleomorfismo</b>	<b>Necrose</b>	<b>Figuras de Mitose</b>	<b>Inflamação</b>	<b>Invasão</b>
<b>CLT-</b>	2,4±0,511	2,4±0,843	1±1,155	2,8±0,421	2±0,666
<b>CLT+</b>	0,2*±0,421	0,2*±0,421	0*±0,000	1*±1,333	0,6*±0,843
<b>FR1 4</b>	2,2±1,122	1,2±1,033	1±1,155	1,4±1,075	1±0,667
<b>FR1 20</b>	2±1,155	0,6*±1,265	0,2±0,421	0,8*±0,788	1±0,667
<b>FR1 100</b>	0,8*±1,033	0,2*±0,421	0*±0,000	0,6*±0,843	0,4*±0,843

Escores: 0 (ausente), 1 (fraco), 2 (moderado), 3 (intenso)

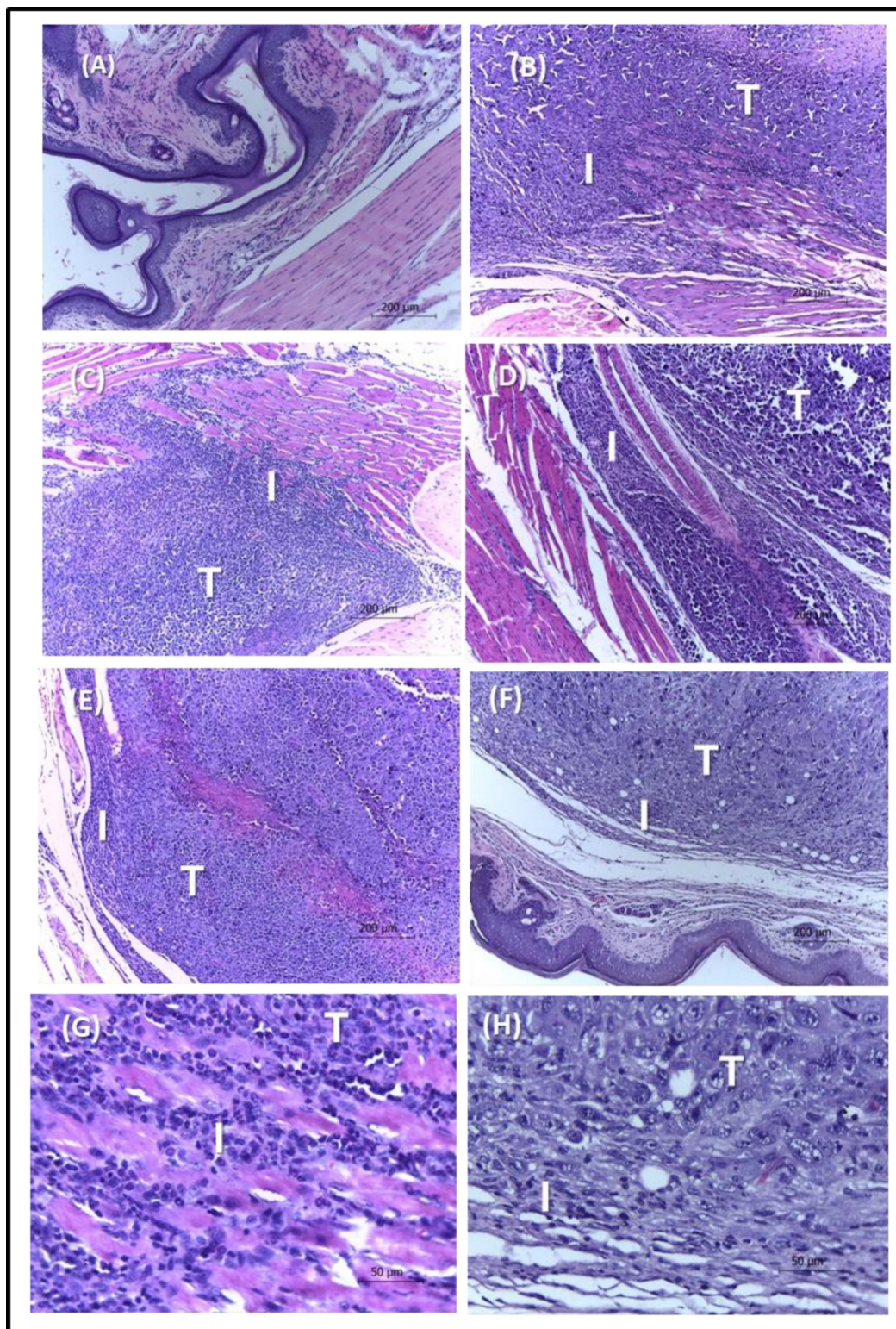
\* p<0,05 em relação ao controle negativo. N=5/grupo.

Em relação ao processo inflamatório, todos os grupos com indução tumoral apresentaram infiltrado inflamatório peritumoral, multifocal a coalescente de tipo linfo-histiocitário e intensidade variável. Os grupos tratados com o extrato nas doses de 20 e 100mg/kg apresentam infiltrados inflamatórios menos intensos (Figura 13).

Em todos os grupos com indução tumoral foram observadas áreas de necrose onde massas tumorais exibem necrose de liquefacção multifocal, com acumulação de detritos celulares eosinofílicos e amorfos, associados a infiltrado neutrofílico. Os

grupos tratados com maior concentração do extrato tendem a exibir menores áreas de necrose.

Na avaliação histopatológica do rim nenhum grupo exibiu alterações dignas de registro renal. Enquanto que no fígado dos animais do grupo de controle negativo, não apresentaram alterações histológicas. Todos os grupos restantes exibiram incidência variável de hepatite leve, multifocal, periportal ou centrolobular, crônica, caracterizada pela acumulação de linfócitos, macrófagos e raros neutrófilos, nos espaços-porta e junto das veias centrolobulares. Presente também hiperplasia dos ductos biliares, com até 3 secções ductais observáveis em cada espaço-porta. Identifica-se ainda um aumento do número de células de Küpfer e a presença de degenerescência microvacuolar hepatocelular centrolobular a panlobular (sugestiva de esteatose).

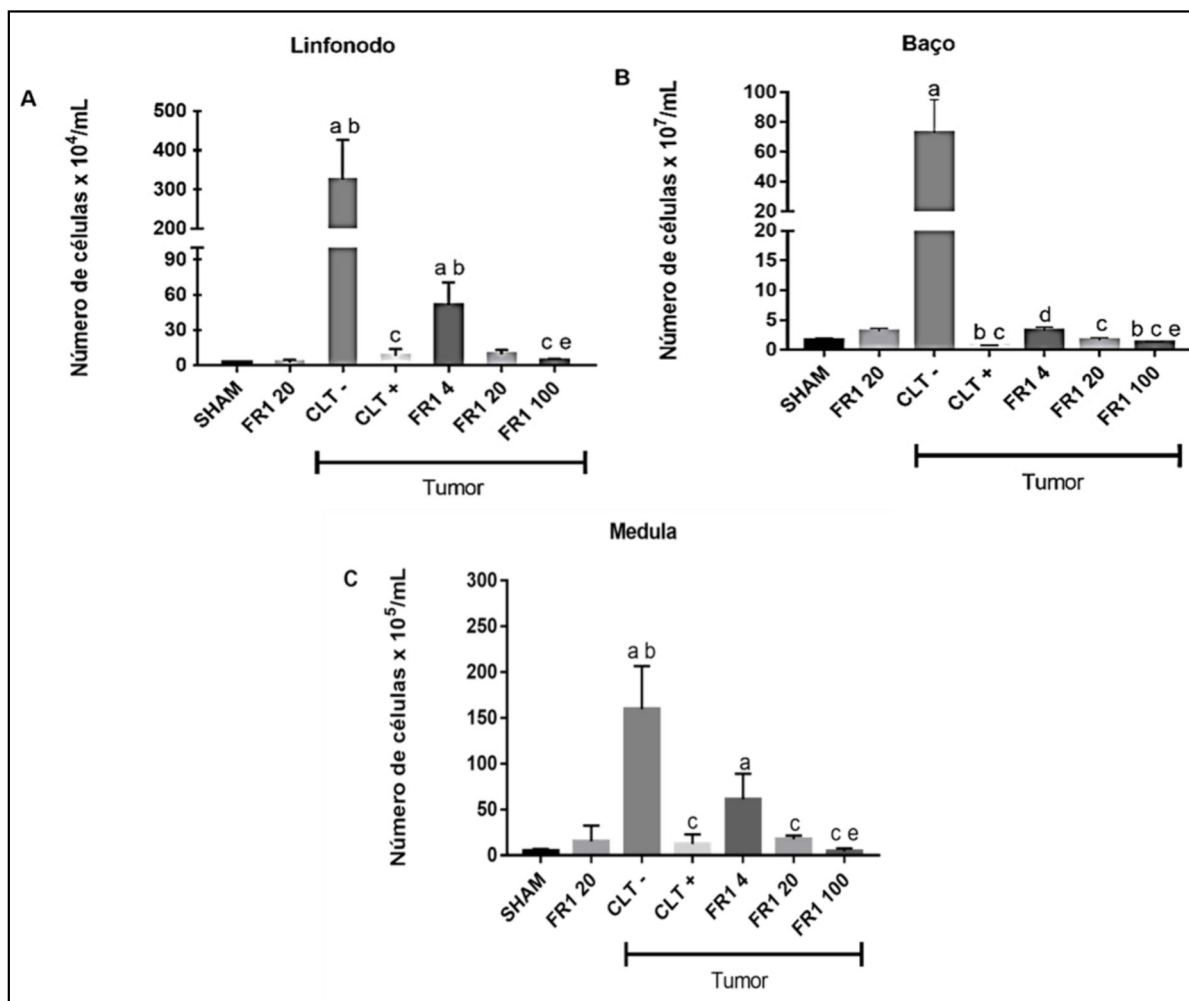


**Figura 13.** Infiltração leucocitária em tumores de Ehrlich com e sem tratamentos. Infiltrados leucocitários em tumores de Ehrlich. Camundongos Swiss foram inoculados na pata com  $2 \times 10^6$  células de tumor de Ehrlich e foram tratados diariamente com extrato FR1 pela via intraperitoneal. Ao final dos quinze dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e as patas amputadas, pesadas e fixadas. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina. Nas fotos é possível ver as células tumorais e o infiltrado inflamatório presentes nas patas dos grupo Sham (A), CLT- (B), CLT+ (C), os animais tratados com o extrato nas dose 4mg/kg (D), 20mg/kg (E), 100mg/kg (F) com ampliação 100 vezes e o grupo Sham (G) e tratado com extrato na dose 100mg/kg (H) com ampliação 400vezes. Em que T são células tumorais e I infiltrado inflamatório.

### **5.5 Avaliação da Celularidade dos Órgãos Linfoides**

Durante o tratamento foi observado que, os animais inoculados com tumor, apenas o grupo Controle negativo e o grupo tratado com o extrato FR1 4 apresentaram um aumento da celularidade do linfonodo poplíteo quando comparado com o animal Sham. Entretanto, essa diferença não foi observada nos animais que foram inoculados com o tumor e tratados com a ciclofosfamida e as frações FR1 20 e 100 (Figura 14A).

Quando foi avaliado o número de células do baço foi observado que o grupo controle negativo apresentou aumento da celularidade quando comparado com o animal Sham, entretanto essa diferença não foi observada nos animais que foram inoculados com o tumor e tratados com ciclofosfamida ou com o extrato (Figura 14B). Já na contagem de células da medula, apenas os grupos controle negativo que não recebeu tratamento e extrato FR1 4 apresentaram um aumento significativo da celularidade da medula quando comparado com o animal Sham, entretanto, essa diferença não foi verificada nos animais que foram inoculados com o tumor e tratados com a ciclofosfamida ou com os extratos FR1 20 e 100 (Figura 14C). Podemos observar ainda que os extratos em estudo são dose dependente. Quanto ao percentual de leucócito circulante não houve diferença significativa entre as populações.



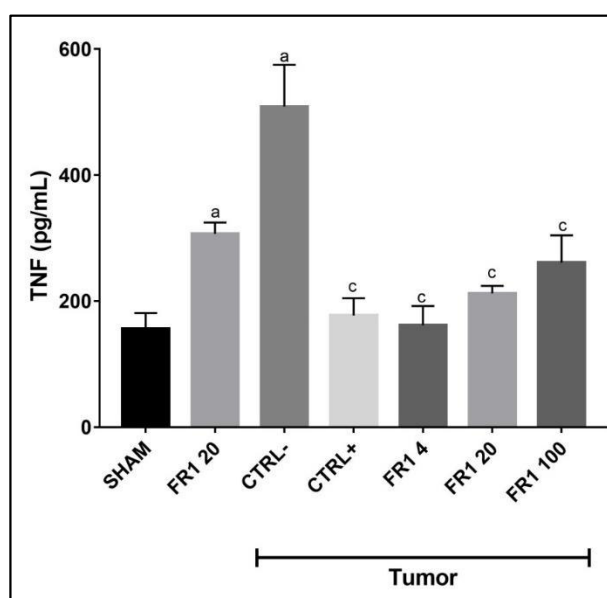
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 14** - Efeito do tratamento com a extrato de *P. purpurogenum* sobre os órgãos linfoides. Os grupo foram divididos em sem tumor tratados com solução salina (Sham) e com o extrato na dose de 20mg/kg (FR1 20), dos grupos com tumor sólido de Ehrlich tratados intraperitoneal com extratos nas doses respectivamente 4 (FR1 4), 20 (FR1 20) e 100mg/kg (FR1 100), controle positivo e negativo administrado ciclofosfamida (CLT+) e e com solução salina (CTL-) respectivamente. **(A)** A contagem total de células do linfonodos. O símbolo a  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,05$  comparando com Sham, b  $p < 0,0001$  quando comparado com FR1 20mg/kg sem indução tumoral, c  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$  quando comparado ao controle negativo, e  $p < 0,005$  quando comparado a FR1 4. **(B)** Foram verificados a celularidade dos esplenócitos. O símbolo a  $p < 0,005$  comparando com Sham, b  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,05$  quando comparado com FR1 20mg/kg sem indução tumoral, c  $p < 0,0005$ ,  $p < 0,005$ ,  $p < 0,0001$  quando comparado ao controle negativo, d  $p < 0,0001$  quando comprado ao controle positivo. **(C)** Os valores da celularidade da medula óssea. Em que o símbolo a  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,005$  comparando com o Sham, b  $p < 0,0005$  comparado com FR1 20mg/kg sem indução tumoral, c  $p < 0,005$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,0001$  quando comparado ao controle negativo, e  $p < 0,0005$  quando comparado a FR1 4. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão e as análises foram feitas pelo Teste Anova one-way e pós-teste de Tukey.



## 5.6 Efeito dos Extratos sobre as concentrações de citocinas no soro dos animais portadores de tumor sólido de Ehrlich

A quantificação de citocinas demonstrou que o tratamento foi capaz de alterar apenas os níveis de TNF (ANEXO F). Após o tratamento com o extrato de *P. purpurogenum* foi realizada a análise das citocinas nos soros dos animais, verificamos um aumento na concentração de TNF- $\alpha$  no soro dos animais que foram tratados com o extrato ou que foram inoculados com o tumor (controle negativo). Comparando os grupos inoculados com o tumor foi observado que assim como a ciclofosfamida, o extrato de 4 e 20mg/kg apresentaram uma diminuição em relação ao animal com tumor sem tratamento (Figura 15).



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 15.** Efeito do Extrato sobre as concentrações de citocinas no soro dos animais portadores de tumor sólido de Ehrlich. Camundongos Swiss tratados intraperitonealmente com solução de tampão fosfato (CTRL-), Ciclofosfamida (CTRL+) e extrato FR1 nas doses 4, 20 e 100mg/kg, sendo os animais eutanasiados no dia 16. No 16º dia foi obtido soro dos animais para a determinação da liberação de citocina TNF- $\alpha$ . O símbolo a representa o valor de  $p < 0,05$  comparado com o animal Sham, c representa o valor de  $p = 0,002$ ,  $p = 0,031$  e  $p = 0,0215$  (para o grupo CLT + e FR1 4, 20 e 100) comparado com o controle negativo (CTRL-). As análises foram feitas pelo Teste Anova *one-way* e pós-teste de Tukey.

### 5.7 Avaliação dos Parâmetros bioquímicos e hematológicos

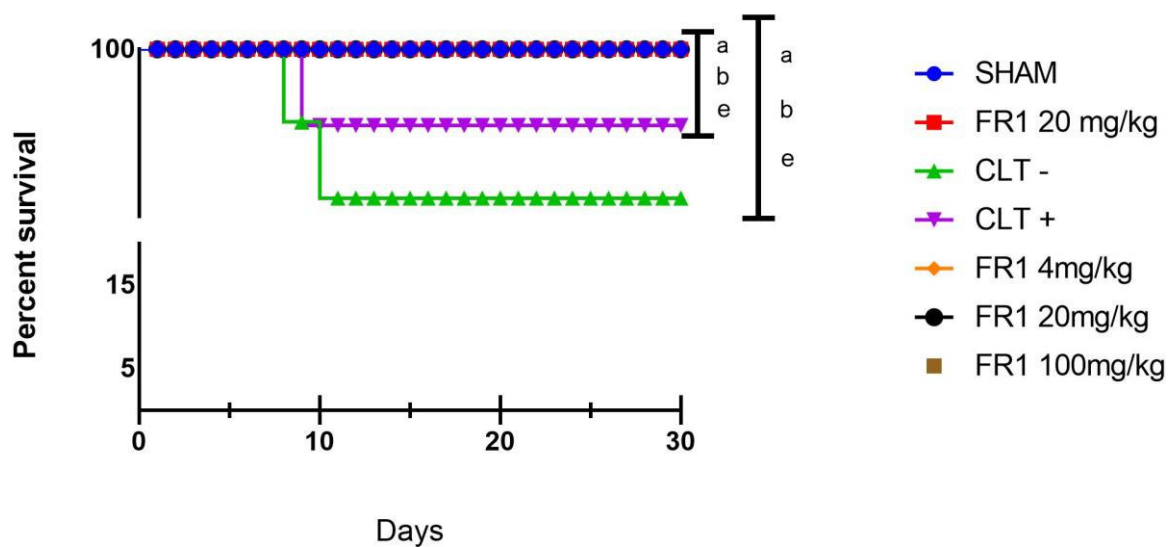
A avaliação de parâmetros bioquímicos não houve diferença significativa nas concentrações séricas das enzimas AST e ALT em nenhum dos grupos analisados. Assim como não foi observado diferença no peso do rim e fígado nos grupos analisados (Tabela 11). Os dados representam a média  $\pm$  D.P. de 5 animais por grupo, comparado os grupos entre si por ANOVA seguido de Tukey.

**Tabela 11.** Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos de Swiss (sem indução tumoral tratamento intraperitoneal com solução de tampão fosfato CTL-), FR1 20 (sem indução tumoral com tratamento do extrato na dose de 20mg/kg), e os com indução tumoral o controle positivo (tratado com a Ciclofosfamida) e as doses do extrato FR1 4, 20 e 100 (tratados com as doses 4, 20 e 100mg/kg respectivamente).

	SHAM	FR1 20mg/kg	CLT -	CLT +	FR1 4mg/kg	FR1 20mg/kg	FR1 100mg/kg
<b>ALT (U/L)</b>	125,2 $\pm$ 103,5	122,5 $\pm$ 101,5	207,9 $\pm$ 181,8	112,5 $\pm$ 79,92	50,12 $\pm$ 33,38	68,3 $\pm$ 57,5	48,88 $\pm$ 21,68
<b>AST (U/L)</b>	267,7 $\pm$ 200,5	295,3 $\pm$ 236,1	438,3 $\pm$ 328,5	293 $\pm$ 131,8	178,6 $\pm$ 95,15	185,1 $\pm$ 111,2	179,1 $\pm$ 61,28
<b>RIM (g)</b>	0,1805 $\pm$ 0,0213	0,1835 $\pm$ 0,0198	0,1763 $\pm$ 0,0216	0,184 $\pm$ 0,0402	0,1776 $\pm$ 0,0345	0,1949 $\pm$ 0,0269	0,1855 $\pm$ 0,0288
<b>FIGADO (g)</b>	1,184 $\pm$ 0,2736	1,326 $\pm$ 0,2384	1,266 $\pm$ 0,1554	1,451 $\pm$ 0,0626	1,347 $\pm$ 0,2421	1,346 $\pm$ 0,3063	1,302 $\pm$ 0,1439

### 5.8 Avaliação do extrato FR1 sobre a sobrevivência de animais portadores de carcinoma sólido de Ehrlich

A análise da sobrevivência dos animais foi realizada pelo teste de Kaplan-Meier, demonstrada na Figura 16. O grupo controle negativo (CLT-) e o quimioterápico (CLT+) aparecem estatisticamente diferentes ( $p=0,009$ ), comprovando a efetividade do teste. Quando comparamos os grupos, o controle negativo (CLT-) apresentou um percentual de sobrevivência 79,12% e o controle positivo (CLT+) de 85,72% e enquanto que o grupo tratado com as frações apresentou diferença significativa ( $p<0,0001$ ) frente ao CLT- em todas as doses analisadas com um percentual de sobrevivência de 100%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 16.** Após o tratamento os animais, permaneceram em observação por trinta dias. Os dados representam uma média  $\pm$  SEM (n=5 animais/grupo). A diferença foi analisada estatisticamente pelo teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis e Dunn. Em que o símbolo **a**  $p < 0,05$ ,  $p < 0,0005$  quando comparado com o Sham, **b**  $p < 0,05$ ,  $p < 0,0005$  comparando com FR1 20 sem indução tumoral, **e**  $p < 0,05$ ,  $p < 0,0005$  quando comparado aos extratos.

## 6 DISCUSSÃO

Estudos com espécies de *Penicillium sp.* mostram que metabólitos secundários isolados de fungo tem um potencial em que já foram relatadas atividades biológicas (HAN et al. 2009; DESHMUHK et al. 2009), Entretanto, cepas mutadas são as que apresentam metabólitos com maior relevância, essas mutações geralmente são induzidas no laboratório a partir de uso na cultura de antibióticos e antifúngicos (FANG et al., 2012; HE et al., 2016; TANG et al. 2017). Assim, resolvemos verificar se esse mesmo gênero isolado de ambientes naturais, mas com estresse de poluentes, poderiam também induzir metabólitos de interesse biológico ou com atividade biológica. A partir desta hipótese o presente trabalho verificou se o extrato de fungo marinho isolado de local poluído poderia induzir metabólitos com atividade antitumoral, focando no câncer de mama por ser o principal câncer incidente na população feminina.

Diante do exposto acima, a nossa cepa é a primeira a ser descrita, nessa espécie isolada em ambiente marinho maranhense, sem ter sido induzida a mutação e que apresenta potencial com propriedades terapêuticas sobre uma doença que tem um grande impacto social como o CM.

Na análise dos metabólitos secundários presentes no extrato do *P. purpurogenum* obtida no litoral maranhense, observou-se a presença de compostos como: *Macrophorin A*, *Purpurogemutantidin*, *Purpurogemutantin*, *Berkeleyacetal C*, *Rubratoxin B*. A molécula *Macrophorin A* já foi descrita por Tang et al. (2017) em cepas mutantes do gênero *Penicillium* com atividades biológicas como antimicrobiana, nematocida, antimicótico, imunossupressoras. Ratificando essas informações Fang et al., (2012) e He et al., (2016) mostraram que a presença *Macrophorin A* foi capaz de inibir significativamente o crescimento das células de linhagens tumorais de K562 (leucemia crônica humana) e HL-60 (leucemia aguda humana) pelo método MTT.

Além da *Macrophorin A*, outra molécula que foi encontrada no nosso extrato e que também já foi descrita com atividade antitumoral é o *Purpurogemutantidin* e *Purpurogemutantin* que são meroterpenóides, descrito por Fang et al., (2012), sendo observada sua presença em uma cepa de *Penicillium* mutante inibindo as linhagens K562, HL-60 e HeLa (câncer cervical), o adenocarcinoma gástrico BGC-823 e o câncer da mama MCF-7 no ensaio MTT. He et al. (2016) verificaram também a

presença de Purpurogemutantín no fungo *Gliomastix* sp. exibiu citotoxicidade *in vitro* para as linhagens celulares K562, MCF-7, HeLa, DU145, U937, H1975, SGC-7901, A549, MOLT-4 e HL60.

A substância Berkeleyacetal C detectada no extrato obtido neste estudo foi descrito pela primeira vez por Stierle et al., (2007) e isolado do fungo *Penicillium rubrum* Stoll, onde foi testado contra linhagem de câncer de pulmão e inibiu o crescimento da célula NCI H450. Enquanto que, Etoh et al. (2013) ao encontrarem Berkeleyacetal C no fungo *Penicillium* relatam que ele apresentou atividade anti-inflamatória. Li et al. (2017) ao estudarem o extrato obtido do *Penicillium purpurogenum* também verificaram a presença de Berkeleyacetal C com atividade anti-inflamatória.

Foi verificada ainda a presença de Rubratoxin B que é um metabólito encontrado em fungos como *Penicillium rubrum* e *Penicillium purpurogenum*. Natori et al., (1970) relata que Rubratoxin B é uma micotoxina que oferecem nenhum risco à saúde na forma natural, mas ela pura é uma bisanhydride lactone com propriedades hepatotóxicas. Pesquisas *in vitro* com a micotoxina isolada relatam que ela dificulta a proliferação celular (NAGASHIMA; GOTO, 2000; SHARMA; NAGASHIMA, 2005). Nagashima et al., (2015) verificou que Rubratoxin B induz a secreção de várias citocinas pró-inflamatórias.

Os metabólitos citados acima foram encontrados no extrato FR1 (metabólitos secretados pelo fungo) e FR2 (metabólitos intracelulares). Esses dados sugerem que a presença desses metabólitos secundários já descritos em outros fungos mutantes, mas ainda não descrito na nossa espécie de *P. purpurogenum*, que não sofreu nenhuma mutação em laboratório, embora tenha sido proveniente de ambiente marinho poluído, corroboram para geração de protótipos de moléculas com atividade antitumoral.

Considerando que a literatura já descreve um potencial para algumas das moléculas encontradas no nosso extrato de fungo, nos questionamos se estes seriam capazes de atuar diretamente nas células tumorais, então foi realizado o ensaio *in vitro* para avaliar se está atividade esta realmente presente, devido ao fato da alta incidência de CM na população feminina.

O presente trabalho avaliou a citotoxicidade dos extratos FR1, FR2 e dos quimioterápicos doxorubicina e paclitaxel nas linhagens tumorais humanas MCF-7, MDA-MB-231 e linhagem de mama normal MCF-10A. Diversas pesquisas em busca

de alternativas para um tratamento menos invasivo e menos prejudicial ao paciente são realizadas, com isso novas terapias baseadas em metabólicos secundários de origem fúngica tem sido pesquisadas, visando uma melhor qualidade de vida e almejando a descoberta de novos agentes quimioterápicos que possam auxiliar na sobrevivência de paciente com câncer.

Nossos resultados mostraram o efeito citotóxico dos extratos de fungo e dos quimioterápicos padrões contra as linhagens de tumores mama. Verificou-se ainda que a linhagem celular MDA-MB-231 apresentou maior resistência, ou seja, maior IC50 entre as linhagens tumorais testadas. Os quimioterápicos testados foram mais citotóxicos que os extratos em estudos e apresentaram comportamento parecido sendo, menos citotóxico para linhagem MDA-MB-231.

Sugerimos que provavelmente pode estar relacionado ao fato de ser uma linhagem de câncer de mama triplo-negativo, caracteriza-se por maior agressividade, possui frequência de recidiva local e metástase de órgãos. Eles são mais comuns em mulheres mais jovens e estão associados com a ocorrência de formas hereditárias de câncer mama causada por mutações patogênicas no gene BRCA1 e, em casos raros, também BRCA2 (MAROTTI et al., 2017).

Basile et al. (2015) verificaram que o potencial citotóxico do extrato de acetona de *Xanthoria parietina* mostrou atividade antiproliferativa e dose dependente contra células MCF-7, com o maior efeito obtido nas concentrações de 1,5 a 3 mg/mL. Em trabalho realizado por Felczykowska et al. (2017) com extratos de acetato de etila dos fungos *Xanthoria parietina*, *Caloplaca pusilla* apresentaram potencial para diminuir a viabilidade celular dependente da dose com IC50 menor que 8 µg/mL em linhagem MCF-7. Enquanto, Ying et al. (2018) ao estudarem o extrato metanólico de fungo *Neosartorya fischeri* não apresentou efeito citotóxico sobre a linhagem celular MDA-MB-231.

Cong-kui et al. (2008) ao pesquisarem a cepa do fungo *P. purpurogenum* G59 originalmente derivada de origem marinha, contra a linhagem K562 não verificaram um efeito citotóxico ou qualquer efeito inibitório a uma concentração de 1000 µg/mL. Enquanto, Chai et al., 2012 ao pesquisarem a mesma cepa demonstraram o efeito citotóxico em concentração de 100µg/mL a um percentual de inibição de 5,8%. Pesquisas realizadas com mutantes do extrato do *P. purpurogenum* G59 resistentes a antibióticos apresentaram citotoxicidade frente a linhagem K562 (CHAI et al., 2011;

CHAI et al., 2012; WU et al., 2014; XIA et al., 2014; FANG et al., 2012; FANG et al., 2014).

Pesquisa realizada por Ramos et al. (2016) e Castro-Carvalho et al. (2017) em extratos de acetatos de etila de fungos de origem marinha contra células MCF-7 quando comparados com a doxorrubicina verificaram que o quimioterápico apresentou IC50 menor que os extratos em estudo concordando com os achados na nossa pesquisa. O mesmo comportamento foi verificado para o paclitaxel em Badr El-Din et al. (2018) apresentando um IC50 menor quando comparado com o extrato de fungo em linhagens de células de mama.

O paclitaxel e a doxorrubicina são quimioterápicos comuns no tratamento de câncer de mama. Eles induzem um efeito apoptótico no câncer em altas concentrações, como resultado, o seu tratamento está associado a efeitos secundários graves, incluindo gastrintestinal, pulmonar, e toxicidades neuromusculares, dentre outros. Portanto, nossa pesquisa sugere o uso de drogas padrões combinados aos extratos de fungos que poderão apresentar a capacidade de reduzir a toxicidade durante quimioterapia, necessitando de concentrações mais baixas das drogas, mantendo seu potencial contra células neoplásicas.

Realizou-se ao mesmo tempo análise em célula normal, para verificar a seletividade do extrato se eles exibissem resultados similares ao das células tumorais não haveria janela terapêutica. Diante desse questionamento avaliou-se o extrato de *P. purpurogenum* em célula MCF-10A poderia apresentar o mesmo efeito verificado nas linhagens tumorais. Conforme os dados encontrados, nenhum dos extratos utilizados nesta pesquisa apresentaram efeito citotóxico menor que as células tumorais analisadas, sugerindo que os extratos de fungos podem apresentar propriedades que reconheçam e causem danos apenas em linhagens celulares tumorais. Enquanto que as drogas testadas apresentaram IC50 menor do que o verificado para células tumorais não apresentando nenhuma seletividade.

Considerando os resultados analisados acima e comparando os extratos FR1 e FR2, em que FR1 mostrou IC50 em concentrações mais baixas que FR2 para as duas células tumorais estudadas, possuindo uma melhor atividade terapêutica antitumoral e quando analisamos os dados químicos encontramos duas moléculas com íons de m/z 480,1929 e m/z 579,2181 que se encontram presentes apenas em FR1. Dessa forma, podemos sugerir que estas moléculas podem ter ação direta no efeito biológico, assim como, servir de protótipos para novas drogas.

Como também podemos sugerir que FR2 por se tratar de um extrato de origem intracelular, ou seja, dentro da célula deve ter inúmeras moléculas que podem exercer um papel de diluição, com isso a ação de FR2 tem um menor efeito quando comparado com o extrato FR1 que secreta os metabólitos e podemos obter de maneira mais concentrada.

A partir dos resultados *in vitro* foi observada a atividade antitumoral e com baixa citotoxicidade na célula normal. Após este resultado, executamos um teste *in vivo* para verificar se no sistema biológico integro a atividade observada *in vitro* também seria verificada *in vivo* e optamos por testar o extrato FR1. Pois este é rico em metabólitos secretados e que podemos usar a mesma matriz para fazer várias extrações, sem comprometer a viabilidade do fungo para obter um metabólito secundário.

Com base nos resultados *in vitro* escolh-se o extrato FR1, desenvolveu-se um novo experimento para avaliar o efeito antitumoral em um modelo mais complexo, o modelo animal. Ruggeri et al., (2014) descreveram a importância de avaliar a atividade de fármacos em modelos animais, pois estes reproduzem os mecanismos biológicos relacionados a absorção, biodisponibilidade, efetividade e toxicidade.

Os modelos animais que reproduzem neoplasias, nos demonstram uma resposta clínica que é um pré-requisito importante para utilização de terapias antineoplásicas de moléculas e produtos biológicos que se mostraram promissores em modelos *in vitro* (CEKANOVA; RATHORE, 2014). O modelo pré-clínico é indispensável no processo de descoberta e desenvolvimento de drogas para novos medicamentos contra neoplasias. Pequenas moléculas e produtos biológicos surgem como sistemas de teste que devem ser utilizados em estágios específicos do processo de descoberta de drogas, de maneira pragmática e hierárquica, de crescente complexidade, relevância fisiológica e previsibilidade clínica da resposta humana. (RUGGERI et al.,2014).

Nossos resultados *in vivo* foram realizados mediante o tratamento com o extrato em três concentrações para melhor avaliar a atividade terapêutica, os animais utilizados no estudo foram inoculados com tumor de Ehrlich na pata, para o desenvolvimento da forma sólida, e durante a evolução da doença foi avaliado aspectos de comportamento, consumo de ração e peso corporal. Os resultados mostraram que o tratamento com extrato de *P. purpurogenum* foi capaz de manter o



peso corporal dos animais com tumor. Por outro lado, os animais não tratados ou tratados com a droga quimioterápica padrão apresentaram perda de peso.

A manutenção peso corporal é importante porque, não só caracteriza o melhor aproveitamento metabólico a partir da alimentação (THOM et al., 2017), como também pode representar uma melhor resposta do hospedeiro ao desenvolvimento do tumor (MURPHY et al., 2011). Na evolução do tumor, alterações metabólicas fazem com que a célula cancerosa tenha maior gasto energético, consumindo mais nutrientes que induzem a perda de massa muscular e de tecido adiposo (LORDICK; HACKER, 2016).

Mesmo eficiente no tratamento do câncer, alguns quimioterápicos podem intensificar a perda de peso ou perda de massa muscular, reduzindo a qualidade de vida dos pacientes oncológicos (LORDICK; HACKER, 2016; LAU; IYENGAR, 2016; HESS et al 2017). O fato do extrato não reduzir o peso dos animais, nós observamos como um dado positivo, pois sugere que mesmo com o tumor ele pode ter algum efeito positivo na manutenção da massa corporal.

A partir desses resultados investigamos o efeito do extrato no contexto do desenvolvimento tumoral. O tratamento com o extrato de *P. purpurogenum* mostrou uma redução na cinética do desenvolvimento do tumor, de forma mais precoce e se equiparando ao controle tratado com ciclofosfamida ao final do protocolo experimental.

Assim, os resultados sugerem uma atividade antitumoral do extrato, entretanto, o tumor de Ehrlich é um tumor inflamatório e na forma sólida se caracteriza como uma massa de células polimórficas apresentam características com alto grau de atipias (anaplasia), com nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo citoplasma maior que a de células normais (SILVA et al., 2017), que apresenta edema e infiltrado inflamatório essencial para o crescimento do tumor, uma vez que constitui a fonte nutricional direta para as células tumorais (SANTOS et al., 2016).

Quando se avalia o desenvolvimento do tumor por meio da medida e do peso da pata, vale destacar que o processo inflamatório pode influenciar as análises (DE CAMARGO et al., 2017). Nossos resultados ainda concordam com o trabalho realizado com extrato de *Piper umbellatum* L. que demonstra atividade antitumoral contra tumor sólido de Ehrlich, como evidências de redução do peso e volume do tumor (IWAMOTO et al., 2015). O mesmo foi verificado Aldubayan et al., (2019) ao

pesquisarem a atividade antineoplásica de Avenanthramides um alcalóide de origem vegetal contra o crescimento de tumor sólido de Ehrlich.

Diante do exposto, os resultados sugerem uma atividade antitumoral, porém ao analisarmos o desenvolvimento da pata nós devemos considerar não apenas o crescimento das células tumorais, mas de todo o microambiente tumoral que incluem formação de edema e infiltrado de outras células como células imunes, estromais e fibroblastos.

Nossos dados mostram essa redução, porém para verificarmos se realmente o crescimento foi menor porque houve uma redução da atividade tumoral direta ou se teve um efeito imunomodulador nós fizemos a análise histopatológica.

Na análise histopatológica verificou-se que o tratamento do tecido tumoral foi consistente em determinar um efeito direto citotóxico ou citostático sobre as células neoplásicas, pois foram observadas alterações em figuras de mitose e na área do tumor. Entretanto, foi observado uma redução do infiltrado inflamatório.

Existe uma discussão sobre o papel dicotômico da inflamação no desenvolvimento tumoral (DIAKOS et al., 2014). A inflamação consiste de um mecanismo imunológico que envolve componentes celulares e moleculares que tem como objetivo eliminar o agente agressor e reparar o tecido (RAPOSO et al., 2015).

Entretanto, a inflamação pode ser considerada um fator que favorece o crescimento do tumor quando, apresenta uma cronicidade (MARELLI et al., 2017), os tumores desencadeiam uma resposta inflamatória intrínseca e um microambiente pró-tumorigênico, apoiado na infiltração de macrófagos e orquestrado por mediadores químicos, como a interleucina (IL) -8 e a IL-10 (RAPOSO et al., 2015). No modelo do tumor de Ehrlich, o processo inflamatório inicial é essencial para a formação de um microambiente rico em citocinas e fatores de crescimento que auxiliam no processo de carcinogênese (IWAMOTO et al., 2015).

Os dados obtidos no nosso estudo mostraram que o extrato de *P. purpureogenum* mesmo apresenta dados evidentes de uma ação direta reduzindo o tumor, assim como um importante mecanismo de controle da inflamação com efeito no crescimento do tumor.

Sugerimos que componentes do extrato, como Berkeleyacetal C que foi pesquisado por Li et al., (2017) e exerceu fortes efeitos anti-inflamatórios inibindo as vias de sinalização de NF- $\kappa$ B, ERK1 / 2 e IRF3, apresenta um grande potencial para ser desenvolvido como agente terapêutico para distúrbios inflamatórios. Outro

meroterpenóide que pode estar influenciando na resposta inflamatória é o Rubratoxin B. Nagashima (2015) observou que ele induz a secreção de várias citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , CXCL8 (também conhecida como IL-8), CCL2 (também conhecida como proteína quimiotática de monócitos [MCP-1]), CSF1 (também conhecido como fator estimulante de colônias de macrófagos [M-CSF]) e entre outras que poderiam atuar na sinalização das células imunes, modulando o tipo de inflamação e células infiltradas no tumor, gerando uma resposta mais eficiente.

O tumor de Ehrlich apresenta na sua fase inicial de desenvolvimento uma inflamação que constitui o microambiente e o desenvolvimento tumoral (SANTOS et al., 2016). Assim, acreditamos que o efeito de redução do tamanho da pata em um tempo mais precoce que o quimioterápico, corrobora para uma atividade antiinflamatória do extrato.

O microambiente tumoral contém células imunes inatas (incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células supressoras mielóides derivadas, células dendríticas e células *natural killer*) e células imunes adaptativas (linfócitos T e B), além das células cancerígenas e do estroma circundante (composto por fibroblastos, células endoteliais, perícitos e células musculares lisas) (DE VISSER et al., 2006).

Nossos resultados sugerem que a redução no crescimento do tumor de Ehrlich, quando correlacionamos com os dados histológicos, apesar deles ter mostrado uma menor redução na pata e menos peso do tumor ao final do tratamento, sugerem que esse efeito foi primeiramente mediado por redução dos infiltrados inflamatórios. No entanto, não descartamos um efeito direto do extrato nas células tumorais, havendo necessidade de estudos que complementem os achados histológicos.

A inflamação que controla o tumor se inicia com a ativação de células imune e essas células imunes principalmente mediadas por macrófagos do tipo M1, linfócitos do tipo Th1 tendo produção de citocinas como interferon, TNF que induz uma resposta imunogênica proporcionando um melhor controle ou eliminação do tumor (RAPOSO et al., 2015). Quando temos um processo inflamatório com a participação de células como macrófagos do tipo M2, linfócitos do tipo Th2 presenças de citocinas IL1, IL6 isso faz com que eu tenha um perfil inflamatório de natureza mais crônica que acaba favorecendo o desenvolvimento do tumor, porque ele induz a

ativação e formação de fatores de crescimento, fazendo com que o tumor se estabeleça e se desenvolva mais rápido (GRIVENNIKOV et al., 2010).

As células comunicam-se umas por contato direto ou produção de citocinas e quimiocinas que atuam de maneira autócrina e parácrina controlando e modelando o crescimento do tumor. A expressão dos mediadores e moduladores imunológicos, bem como, o estado de abundância e ativação de diferentes tipos de células no microambiente tumoral que determinam em qual direção o equilíbrio é inclinado e se a inflamação promove crescimento tumoral ou imunidade antitumoral (SMYTH et al., 2006; LIN; KARIN, 2007).

Esses dados sugerem que provavelmente o extrato tem um potente efeito imunomodulador e melhora a efetividade das células imunes no ambiente tumoral. Para avaliar então se realmente teríamos um efeito imunomodulatório foi realizada a análise dos órgãos linfóides primários e secundários, e os nossos resultados mostraram que o extrato consegue modular a celularidade no sentido de que ele modula a proliferação ou a quantidade dessas células nos órgãos linfóides. No linfonodo poplíteo drenante o extrato acaba provocando uma significativa redução do número de células quando comparado aos grupos controle negativo sendo uma redução dependente da dose.

Muitas neoplasias se disseminam primeiro pelo sistema linfático, e a presença de células tumorais no linfonodo drenante é um importante indicador prognóstico em muitos tipos comuns de câncer, incluindo câncer de mama (VALLENTIN et al., 2015). Os linfonodos drenantes, são primeiros nodos a receber linfa de um tumor primário e o local preferencial de metástases tumorais iniciais, são intensamente expostos aos produtos bioativos de células tumorais e outras células associadas. Isso os torna ideais para estudos dos fatores que determinam a susceptibilidade seletiva dos tecidos às metástases (COCHRAN et al., 2006).

Quando comparamos a celularidade do linfonodo entre o animal Sham e os tratados com o extrato foi verificado um aumento da celularidade pode esta relacionado a ativação das células imunes, pelo linfonodo drenante estar próximo ao tumor, como também não descartamos a possibilidade de metástase, ou seja, contamos células de tumor que já drenou pro linfonodo, no momento em que verificamos a redução da celularidade isso mostra que provavelmente o extrato esta controlando a alteração que o tumor causou e se for metástase isso já é um resultado positivo.

A elevação observada no controle negativo pode estar acontecendo por duas situações, devido ao efeito inflamatório, por que o tumor de Ehrlich é um tumor inflamatório e por ser um linfonodo drenante ele está recebendo sinais inflamatórios que pode estar induzido uma proliferação dos linfócitos no linfonodo e isso aumenta a celularidade, como também pode estar acontecendo infiltração do tumor nesse órgão já que é o linfonodo, mas próximo ao tumor. O tratamento com extrato acaba reduzindo a celularidade e aparentemente provoca um efeito positivo, pois acaba revertendo o efeito causado pelo tumor.

Quando observamos o baço e mesmo esse órgão não sendo sistêmico, não estando tão próximo ao tumor e por ser um tumor inflamatório geralmente observa-se esplenomegalia, fica evidente o aumento da celularidade. A esplenomegalia pode ocorrer como uma resposta fisiológica ao estresse ou como um processo crônico que muitas vezes é prejudicial ao bem-estar do indivíduo (MCKENZIE et al., 2018). Porém, os animais tratados com extrato, verifica-se uma redução do número de células quando comparado aos grupos controle negativo, mostrando um efeito positivo, pois, ele inibe o efeito causado pelo tumor.

Podemos sugerir que o extrato tenha alguma propriedade que module a resposta inflamatória, pois, após uma lesão tecidual, leucócitos esplênicos entram na circulação migrando para locais inflamatórios, onde se diferenciam em macrófagos, participando de respostas pró e anti-inflamatória (HIROYOS HI et al., 2012; ROBBINS et al., 2012).

No órgão linfóide primário nós observamos que o animal controle negativo o tumor induz o aumento da celularidade da medula óssea e que o animal tratado com o extrato reverte essa situação.

Todas as células imunitárias são originárias do progenitor da medula óssea, especificamente das células estaminais hematopoiéticas. Além disso, além das células T, que se desenvolvem no timo, todas as outras células imunes permanecem na medula óssea durante todo o processo de diferenciação progressiva e especificação de linhagem (NIKOLICH-ŽUGICH et al., 2017).

Quanto a celularidade na medula óssea, observamos que o extrato quando comparado com o quimioterápico ele aumenta a celularidade, ele reduz o tumor. Quando um tratamento combate o tumor e não afeta a medula óssea por que continua tendo produção de células normais não só do sistema imune, mas do hematológico como um todo, logo ele se apresenta bastante promissor para o

desenvolvimento de produto que possam funcionar como adjuvantes no tratamento do câncer.

Os dados mostraram que houve uma redução da celularidade nos órgãos, entretanto, os dados imunológicos apresentaram maior infiltrado, logo, nos sugerimos que o extrato deve modular uma resposta imune favorecendo a migração da célula para o sítio tumoral e provavelmente trazendo células mais ativadas, ou seja, mais efectoras causando uma redução do tumor.

Para avaliar então se realmente teríamos um efeito imunomodulatório foi também realizado a análise de citocinas no soro dos animais. O desequilíbrio no perfil de citocinas é um fator importante que auxilia o desenvolvimento de células neoplásicas, sendo bem, evidenciado durante o desenvolvimento do tumor de Ehrlich (RAMOS et al. 2010).

O tumor de Ehrlich por ser um tumor inflamatório acaba induzindo o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Nesse sentido, buscamos investigar o efeito dos extratos de *P. purpurogenum* sobre as concentrações de citocinas no soro dos animais inoculados ou não com o tumor de Ehrlich. Nossos resultados indicam que o extrato promoveu o aumento de TNF- $\alpha$  no animal sem indução tumoral e uma diminuição de TNF- $\alpha$  nos grupos com indução tumoral quando comparados com o controle negativo.

O extrato de *P. purpurogenum* sozinho induz a produção de TNF- $\alpha$  que isso em determinadas condições pode ser bom, porque ele pode estar estimulando a resposta imune, induzindo a produção de citocinas que podem causar apoptose, entretanto, quando realizamos o tratamento na presença do tumor, observamos que o extrato diminui a produção de TNF- $\alpha$  comparado ao animal controle negativo.

Este dado pode nos sugerir que no modelo de tumor de Ehrlich a presença do TNF- $\alpha$  é importante, por isso, o animal não tratado tem altas concentrações de TNF- $\alpha$ . Entretanto, no tratamento com o extrato diminui o TNF- $\alpha$  para um modelo tumor inflamatório tem um efeito positivo que pode explicar o menor crescimento da pata nesse animal porque provavelmente nesse contexto o extrato teve uma ação anti-inflamatória.

Harun et al. (2015) ao estudarem o papel protetor de extratos de fungos contra eventos inflamatórios induzidos por LPS *in vitro*, verificaram que todos extratos inibiram a expressão de TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória que contribui para uma inflamação descontrolada. Nossos resultados ainda concordam com os

dados descritos por Calixto-Campos et al. (2015) e Aldubayan et al. (2019) ao estudarem o modelo *in vivo* do tumor sólido de Ehrlich em camundongos, verificaram que os níveis de TNF- $\alpha$  aumentaram nos animais com indução tumoral, porém, sem tratamento em comparação com animal sham, enquanto que, o animal tratado com a droga de origem natural inibiu a expressão de TNF- $\alpha$  quando comparado com o controle negativo.

Apesar do extrato sozinho ter mostrado um perfil pró-inflamatório aumentando o TNF- $\alpha$ , na condição do tumor inflamatório teve um comportamento anti-inflamatório mostrando que pode ter um efeito modulatório. Nessa perspectiva, os dados sugerem que o extrato tem uma atividade antitumoral e que parece modular o sistema imune, causando um efeito sinérgico, atuando diretamente no tumor e melhorando a imunidade do paciente.

Considerando que é um extrato fúngico, nos resolvemos verificar se não existia nenhuma toxicidade aguda por isso nos avaliamos alguns parâmetros bioquímicos principalmente em relação a função hepática.

Realizamos testes preliminares avaliando a histologia do rim, fígado e enzimas AST e ALT que usamos como marcadores de toxicidade. Considerando que trabalhamos com três doses de tratamento e que optamos por usar a dose de 20mg/kg para avaliar a toxicidade e verificamos que nessa dose o animal não apresentou alterações de parâmetros que mostrassem uma toxicidade aguda.

Os dados obtidos ainda mostraram que os extratos usados nos animais com indução tumoral mesmo na maior concentração (100mg/kg) não apresentaram alterações no histopatológico, bem como, nos marcadores séricos. Esses resultados corroboram para mostrar que o extrato não apresenta toxicidade.

A concentração média (20mg/kg) foi utilizada, para verificarmos se na menor dose com efeito biológico significativo teria algum efeito de toxicidade. Essa concentração não apresentou toxicidade, contudo, isso não exclui a possibilidade que concentrações maiores do extrato possam apresentar.

Do ponto de vista geral, verificamos que o extrato tanto “*in vitro*” em linhagens do câncer de mama como “*in vivo*” em modelo de tumor de Ehrlich demonstrou atividade antitumoral e que ainda modula a resposta inflamatória. Mas nos questionamos se animal ao receber o extrato terá qualidade de vida ou sobrevivida após o tratamento.

Para responder essa pergunta, foi realizada a avaliação de sobrevida, onde foi verificado que os animais tratados com o extrato tiveram uma sobrevida comparável ao animal tratado com a ciclofosfamida, lembrando que eles não perderam peso, mostrando até mesmo parâmetros de toxicidade menores que o da ciclofosfamida.

A partir dos dados apresentados, o trabalho mostrou que o extrato de *P. purpurogenum* de ambiente marinho poluído sem sofrer qualquer tipo de mutação em laboratório demonstrou efeito antineoplásico e possui efeito no controle do processo inflamatório associado ao tumor e uma das substâncias provavelmente responsáveis por esse resultado são Macrophorin A, Purpurogemutantidin, Purpurogemutantín, Berkeleyacetal C e Rubratoxin B que podem servir como protótipos de moléculas com efeito antitumoral e anti-inflamatório e/ou modulador da resposta imune, sugerindo potencial aplicação no câncer e outras doenças associadas a inflamação.



## 7 CONCLUSÃO

Os extratos de fungo apresentaram meroterpenóides, determinados na análise química por infusão direta (ESI/MS). Foram identificados compostos químicos Macrophorin A, Purpurogemutantidin, Purpurogemutantín, Berkeleyacetal C, Rubratoxin B, Purpurogemutantidin Na<sup>+</sup>;

No ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método MTT, para o extrato FR1 e FR2 demonstraram atividade citotóxica de forma dependente concentração sobre as células MCF-7 e MDA-MB-231. Entretanto, nem todos os extratos demonstraram comportamento tempo dependente;

No ensaio *in vitro* a citotoxicidade para célula normal de mama foi verificado pelo método MTT, que para o extrato FR1 e FR2 demonstraram ser específicos e apresentando um comportamento dose dependente;

Em ensaio *in vivo*, o acompanhamento do desenvolvimento do tumor na forma sólida, demonstrou uma diminuição significativa na área do tumor quando comparado ao CTL-, em que os resultados histológicos demonstraram essa diminuição;

Houve uma diminuição de TNF- $\alpha$  nos animais com tumor tratados com o extrato e o aumento de TNF- $\alpha$  nos animais sem indução tratados com o extrato, onde fica evidente seu comportamento imunomodulador;

O extrato FR1 promoveu a diminuição da celularidade do baço, linfonodo periférico e medula óssea dependente da dose quando comparados ao CLT-. Assim como, não alterou as concentrações séricas das enzimas AST e ALT em nenhum dos grupos analisados;

O tratamento com FR1 aumentou a sobrevivência dos animais.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A perspectiva é elucidar melhor os mecanismos antitumorais através dos estudos relacionados à morte induzida por apoptose e necrose. Estes mecanismos podem indicar novos alvos terapêuticos. Além disso, verificar a produção de citocinas e radicais de oxigênio via receptor do tipo Toll-like. Este ensaio pode gerar dados que mostrem a presença de mediadores inflamatórios e regulatórios da resposta imune, definindo melhor o efeito imunomodulador observado no ensaio *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS, A. C. A. **Breast Cancer** - What is breast cancer? 2016.

ADAMES, I. et al. 3-epi-Waol A and Waol C: polyketide-derived  $\gamma$ -lactones isolated from the endophytic fungus *Libertella blepharis* F2644. **Tetrahedron letters**, v. 56, n. 1, p. 252-255, 2015.

Al, W. et al. Cladosporone A, a new dimeric tetralone from fungus *Cladosporium* sp. KcFL6'derived of mangrove plant *Kandelia candel*. **The Journal of antibiotics**, v. 68, n. 3, p. 213, 2015.

ALDUBAYAN, M. A. et al. Antineoplastic Activity and Curative Role of Avenanthramides against the Growth of Ehrlich Solid Tumors in Mice. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.

ALI, B. M. et al. Dorzolamide synergizes the antitumor activity of mitomycin C against Ehrlich's carcinoma grown in mice: role of thioredoxin-interacting protein. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 388, n. 12, p. 1271-1282, 2015.

AL MOUSTAFA, A. E. et al. Brain metastases progression of breast cancer. In: **Breast Cancer-Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways**. IntechOpen, 2011.

ALVARADO, A. et al. Experimental mammary carcinogenesis-Rat models. **Life sciences**, v. 173, p. 116-134, 2017.

AKRAM, M. et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological research**, v. 50, n. 1, p. 33, 2017.

ANTONI, S. et al. An assessment of GLOBOCAN methods for deriving national estimates of cancer incidence. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 3, p. 174, 2016.

APARICIO, S.; CALDAS, C. The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. **New England journal of medicine**, v. 368, n. 9, p. 842-851, 2013.

ARCHER, D. B.; CONNERTON, I. F.; MACKENZIE, D. A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. In: **Food Biotechnology**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 99-147.

ARRUEBO, M. et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. **Cancers**, v. 3, n. 3, p. 3279-3330, 2011.

ATAY, S. et al. Diverse effects of the lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), in combination with tamoxifen citrate and doxorubicin in MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 6, 2016.

AZIZ, N. A. et al. Synergistic efficacy of  $\gamma$ -radiation together with gallium trichloride and/or doxorubicin against Ehrlich carcinoma in female mice. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 1825-1834, 2016.

BADAR, F. et al. Management of breast lesions by breast physicians in a heavily populated South Asian developing country. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 3, p. 827-32, 2011.

BADISA, R. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Res**, v. 29, p. 2993–2996, 2011.

BADR EL-DIN, N. K. et al. Baker's yeast sensitizes metastatic breast cancer cells to paclitaxel in vitro. **Integrative cancer therapies**, v. 17, n. 2, p. 542-550, 2018.

BAKER, C. J. O. et al. Semantic web infrastructure for fungal enzyme biotechnologists. **Web Semantics: Science, Services and Agents on the World Wide Web**, v. 4, n. 3, p. 168-180, 2006.

BANCROFT J. D.; COOK H. C. Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application. Edinburgh, London, New York, Tokyo: Churchill Livingstone; 1994.

BARBOSA, I. R. et al. Cancer mortality in Brazil: temporal trends and predictions for the year 2030. **Medicine**, v. 94, n. 16, 2015.

BASILE, A. et al. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 4, p. 7861-7875, 2015.

BASS, R. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Amidinourea and Triazine Congeners as Inhibitors of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Proliferation. **ChemMedChem**, v. 12, n. 4, p. 288-291, 2017.

BELLO, M. A. **Análise estatística espacial da mortalidade por câncer de mama feminina no estado do Rio de Janeiro, 2001 a 2006**. Dissertação de Mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

BHATNAGAR, I.; KIM, S. K. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. **Marine drugs**, v. 8, n. 10, p. 2673-2701, 2010.

BLAND, I. K.; COPELAND, E. M. **La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas**. Ed. Médica Panamericana, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/versaofinal.pdf>>. Acessado em: 14/04/2019

BUENO, M. **A origem curiosa das palavras**. Rio de Janeiro. Ed José Olímpio, 2003.

BURSTEIN, M. D. et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 7, p. 1688-1698, 2015.

CAFÊU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, p. 991-995, 2005.

CALDERANI, F. A. et al. Compostos bioativos com propriedades antitumorais produzidos por fungos endofíticos. **Revista Uningá Review**, v. 25, n. 2, 2018.

CALGAROTTO, A. K. **Efeitos in vivo e ex vivo de compostos derivados do nitroestireno na resposta imunoematopóética**. 2012.

CALIXTO-CAMPOS, Cassia et al. Quercetin reduces Ehrlich tumor-induced cancer pain in mice. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2015, 2015.

CALIXTO-CAMPOS, C. et al. The Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: a novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

CAMPOS, F. F. et al. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 65-74, 2015.

CAO, P. et al. New duclauxamide from *Penicillium manginii* YIM PH30375 and structure revision of the duclauxin family. **Organic letters**, v. 17, n. 5, p. 1146-1149, 2015.

CARVALHO, F. S. et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. **Medicinal research reviews**, v. 34, n. 1, p. 106-135, 2014.

CASTRO-CARVALHO, B. et al. Marine-derived fungi extracts enhance the cytotoxic activity of doxorubicin in nonsmall cell lung cancer cells A459. **Pharmacognosy research**, v. 9, n. Suppl 1, p. S92, 2017.

CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. **Drug design, development and therapy**, v. 8, p. 1911, 2014.

CENTKO, R. M. et al. Dhilirolides E–N, meroterpenoids produced in culture by the fungus *Penicillium purpurogenum* collected in Sri Lanka: structure elucidation, stable isotope feeding studies, and insecticidal activity. **The Journal of organic chemistry**, v. 79, n. 8, p. 3327-3335, 2014.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 47-59, 2012.

CHANG, C. H.; CHEN, S. J.; LIU, C. Y. Adjuvant treatments of breast cancer increase the risk of depressive disorders: a population-based study. **Journal of affective disorders**, v. 182, p. 44-49, 2015.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.

CHEANG, M. C.U et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.

CHEN, S. et al. Three new diterpenes and two new sesquiterpenoids from the endophytic fungus *Trichoderma koningiopsis* A729. **Bioorganic chemistry**, v. 86, p. 368-374, 2019.

CHEN, Y. C. et al. *Antrodia cinnamomea*, a Treasured Medicinal Mushroom, Induces Growth Arrest in Breast Cancer Cells, T47D Cells: New Mechanisms Emerge. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, p. 833, 2019.

CHEN, Y.; ZHANG, Y. Application of the CRISPR/Cas9 system to drug resistance in breast cancer. **Advanced Science**, v. 5, n. 6, p. 1700964, 2018.

CHEN, S. et al. Cytotoxic and antibacterial preussomerins from the mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* ZJ-HQ1. **Journal of natural products**, v. 79, n. 9, p. 2397-2402, 2016.

CHEN, Z. et al. Cytochalasins from cultures of endophytic fungus *Phoma multirostrata* EA-12. **The Journal of antibiotics**, v. 68, n. 1, p. 23, 2015.

CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. **Nature**, v. 225, n. 5234, p. 734, 1970.

CHENG, M. J. et al. Secondary metabolites and cytotoxic activities from the endophytic fungus *Annulohyphoxylon squamulosum*. **Phytochemistry letters**, v. 5, n. 1, p. 219-223, 2012.

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

COMŞA, Ş.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, 2015.

CONG-KUI, T. I. A. N.; CHENG-BIN, C. U. I.; XIAO-XIAN, H. A. N. Isolation of fungal strains in unusual environment and screening for their antitumor activity [J]. **Journal of International Pharmaceutical Research**, v. 6, 2008.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860, 2002.

CRUZ, M. et al. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista portuguesa de pneumologia**, v. 15, n. 4, p. 669-682, 2009.

CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346, 2012.

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 10, p. 2929, 2015.

DE CAMARGO, Marcela Rodrigues et al. Pesticide dichorvos induces early solid Ehrlich tumoral development associated with a non-protective pro-inflammatory response. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 8, p. 7681-7687, 2018.

DEN HAAN, J. M. M.; KRAAL, G. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. **Journal of innate immunity**, v. 4, n. 5-6, p. 437-445, 2012.

DEL VALLE, P.; FIGUEROA, M.; MATA, R. Phytotoxic eremophilane sesquiterpenes from the coprophilous fungus *Penicillium* sp. G1-a14. **Journal of natural products**, v. 78, n. 2, p. 339-342, 2015.

DELMONICO, L.; ALVES, G.; AMARAL, L. F.P. A biologia do câncer de mama e testes moleculares de prognóstico. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, 2015.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 185-201, 2014.

DESANTIS, C. et al. Breast cancer statistics, 2013. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 1, p. 52-62, 2014.

DESHMUKH, S. K. et al. Anti-inflammatory and anticancer activity of ergoflavin isolated from an endophytic fungus. **Chemistry & biodiversity**, v. 6, n. 5, p. 784-789, 2009.

DESHPANDE, N. A.; BRAUN, I. M.; M.; Fremonta L. Impact of fertility preservation counseling and treatment on psychological outcomes among women with cancer: a systematic review. **Cancer**, v. 121, n. 22, p. 3938-3947, 2015.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature reviews cancer**, v. 6, n. 1, p. 24, 2006.

DHAKE, A. B.; PATIL, M. B. Production of  $\beta$ -Glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 170-176, 2005.

DIAKOS, C. I. et al. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 11, p. e493-e503, 2014.

DIAS, E. N. A mastologia através da história. **Mastologia Atual**, p. 3-6, 1994.

DOMVRI, K. et al. Molecular targeted drugs and biomarkers in NSCLC, the evolving role of individualized therapy. **Journal of Cancer**, v. 4, n. 9, p. 736, 2013.

DRANOFF, G. Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology?. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 1, p. 61, 2012.

DUBIN, P. J. et al. Interleukin-23-mediated inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 80, n. 1, p. 398-409, 2012.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 137-148, 2004.



DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature immunology**, v. 3, n. 11, p. 991, 2002.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. **The lancet**, v. 378, n. 9793, p. 771-784, 2011.

ECONOMOPOULOU, P.; DIMITRIADIS, G.; PSYRRI, A. Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. **Cancer treatment reviews**, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2015.

EDGE, S. B.; BYRD, D. R.; COMPTON, C. C. (Eds). Cancer Staging Manual. 7th edition. New York: SpringerVerlag; 2010. p. 347-377.

ELGAILI, E. M. et al. Breast cancer burden in central Sudan. **International journal of women's health**, v. 2, p. 77, 2010.

ELGERT, K. D.; ALLEVA, D. G.; MULLINS, D. W. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **Journal of leukocyte biology**, v. 64, n. 3, p. 275-290, 1998.

ERNST, W. Humanized mice in infectious diseases. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 49, p. 29-38, 2016.

ETOH, T. et al. Anti-inflammatory effect of berkeleyacetal C through the inhibition of interleukin-1 receptor-associated kinase-4 activity. **European journal of pharmacology**, v. 698, n. 1-3, p. 435-443, 2013.

FANG, Shi-Ming et al. A practical strategy to discover new antitumor compounds by activating silent metabolite production in fungi by diethyl sulphate mutagenesis. **Marine drugs**, v. 12, n. 4, p. 1788-1814, 2014.

FANG, S. M. et al. Purpurogemutant and purpurogemutantidin, new drimenyl cyclohexenone derivatives produced by a mutant obtained by diethyl sulfate mutagenesis of a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. **Marine drugs**, v. 10, n. 6, p. 1266-1287, 2012.

FALK, H. et al. Calcium electroporation for treatment of cutaneous metastases; a randomized double-blinded phase II study, comparing the effect of calcium electroporation with electrochemotherapy. **Acta Oncologica**, v. 57, n. 3, p. 311-319, 2018.

FALK, H. et al. Calcium electroporation induces tumor eradication, long-lasting immunity and cytokine responses in the CT26 colon cancer mouse model. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 5, p. e1301332, 2017.

FALK, H. et al. Electrochemotherapy and calcium electroporation inducing a systemic immune response with local and distant remission of tumors in a patient with malignant melanoma—a case report. **Acta Oncologica**, v. 56, n. 8, p. 1126-1131, 2017.

FELCZYKOWSKA, A. et al. Antibacterial and anticancer activities of acetone extracts from in vitro cultured lichen-forming fungi. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 300, 2017.

FEMAMA. Imunoterapia: câncer de mama e situação no Brasil. [online] Femama.org.br. 2018. Disponível em: <https://www.femama.org.br/2018/br/noticia/imunoterapia-cancer-de-mama-e-situacao-no-brasil>. Acesso em 02/04/2019.

FENG, Y. et al. Guanacastane diterpenoids from the plant endophytic fungus *Cercospora* sp. **Journal of natural products**, v. 77, n. 4, p. 873-881, 2014.

FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FERREIRA, P. M. P. et al. 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.

FIALHO, E. M. S. et al. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 58, n. 6-7, p. 480-485, 2011.

FRAJACOMO, F. T. T. et al. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. **Life sciences**, v. 162, p. 47-53, 2016.

FRANSEN, S. K. et al. Direct therapeutic applications of calcium electroporation to effectively induce tumor necrosis. **Cancer research**, v. 72, n. 6, p. 1336-1341, 2012.

FRANKLIN, C. et al. Immunotherapy in melanoma: recent advances and future directions. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 43, n. 3, p. 604-611, 2017.

FRESHNEY, R. I. et al. Culture of animal cells: a manual of basic technique. Alan R. Liss. Inc., **New York**, v. 117, 1987.

FRISVAD, J. C. et al. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Stud. Mycol**, v. 49, p. 201-241, 2004.

FRITZ, M. et al. A family 51 alpha-larabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: purification, properties and amino acid sequence. **Mycological Research**, v.112, pt.8, p.933-942, 2008.

GEYER, C. E. et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 26, p. 2733-2743, 2006.

GHATE, N. B. et al. An antioxidant extract of tropical lichen, *Parmotrema reticulatum*, induces cell cycle arrest and apoptosis in breast carcinoma cell line MCF-7. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82293, 2013.

GIRALDO, N. A. et al. The immune response in cancer: from immunology to pathology to immunotherapy. **Virchows Archiv**, v. 467, n. 2, p. 127-135, 2015.

GLOBOCAN. **Cancer incidence and mortality worldwide in 2008 - IARC**. 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>. Acessado em: 19/04/2019.

GOMES, D.C. **Produção de esclerotiorina por *P. sclerotiorum* e obtenção de derivados com aplicação potencial em alimentos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

GONZAGA, S. F. R. et al. Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 1, p. 72-6, 2008.

GOPALAKRISHNAN, V. et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 97-103, 2018.

GRADISHAR, W. J. et al. NCCN guidelines insights: breast cancer, version 1.2017. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 15, n. 4, p. 433-451, 2017.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GUERRA, M. R. et al. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev bras cancerol**, v. 51, n. 3, p. 227-34, 2005.

GUILARDUCCI, N. V. et al. Efeito da administração oral de extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.(alecrim) no desenvolvimento do Tumor Sólido de Ehrlich. **Revista Fitos**, v. 10, n. 1, p. 23-32, 2016.

GUPTA, I. et al. Molecular genetics complexity impeding research progress in breast and ovarian cancers. **Molecular and clinical oncology**, v. 7, n. 1, p. 3-14, 2017.

GUZMAN, M. L.; JORDAN, C. T. Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia. **Cancer Control**, v. 11, n. 2, p. 97-104, 2004.

HAN, S. J. et al. Prognostic significance of interactions between ER alpha and ER beta and lymph node status in breast cancer cases. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 10, p. 6081-6084, 2013.

HAN, Z. et al. A new cytotoxic isocoumarin from endophytic fungus *Penicillium* sp. 091402 of the mangrove plant *Bruguiera sexangula*. **Chemistry of natural compounds**, v. 45, n. 6, p. 805-807, 2009.

HAISER, H. J. et al. Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta*. **Science**, v. 341, n. 6143, p. 295-298, 2013.

HAGHIGHAT, S. et al. Standardized breast cancer mortality rate compared to the general female population of Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 11, p. 5525-5528, 2012.

HANAFI, N.; MANSOUR, S. Z. Antitumor Efficacy of *salenostemma argel* and/or  $\gamma$ -irradiation against Ehrlich carcinoma. **J Biol Sci**, v. 10, n. 6, p. 468e79, 2010.

HARUN, A. et al. Malaysian endophytic fungal extracts-induced anti-inflammation in Lipopolysaccharide-activated BV-2 microglia is associated with attenuation of NO production and, IL-6 and TNF- $\alpha$  expression. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 166, 2015.

HE, W. J. et al. Quinone/hydroquinone meroterpenoids with antitubercular and cytotoxic activities produced by the sponge-derived fungus *Gliomastix* sp. ZSDS1-F7. **Natural product research**, v. 31, n. 5, p. 604-609, 2017.

HEINIG, U.; SCHOLZ, S.; JENNEWEIN, S. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. **Fungal diversity**, v. 60, n. 1, p. 161-170, 2013.

HELVIE, M.A. Imagin analysis: mammography. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. Diseases of the breast. 4<sup>o</sup> edição. Philadelphia: Wolkers Kluwer; 2010. 116-130.

HENNESSY, B. T. et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer research**, v. 69, n. 10, p. 4116-4124, 2009.

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome biology**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007.

HESS, L. M. et al. Weight change during chemotherapy as a potential prognostic factor for stage III epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecologic oncology**, v. 107, n. 2, p. 260-265, 2007.

HIROYOSHI, T. et al. Splenectomy protects the kidneys against ischemic reperfusion injury in the rat. **Transplant immunology**, v. 27, n. 1, p. 8-11, 2012.

HOEJHOLT, K. L. et al. Calcium electroporation and electrochemotherapy for cancer treatment: Importance of cell membrane composition investigated by lipidomics, calorimetry and in vitro efficacy. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4758, 2019.

HOWARD-ANDERSON, J. et al. Quality of life, fertility concerns, and behavioral health outcomes in younger breast cancer survivors: a systematic review. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 5, p. 386-405, 2012.

HU, W. et al. Functional miRNAs in breast cancer drug resistance. **OncoTargets and therapy**, v. 11, p. 1529, 2018.

HURVITZ, S.; MEAD, M. Triple-negative breast cancer: advancements in characterization and treatment approach. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 28, n. 1, p. 59-69, 2016.

HUSSEIN, M. et al. Breast cancer cells exhibits specific dielectric signature in vitro using the open-ended coaxial probe technique from 200 MHz to 13.6 GHz. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4681, 2019.

IBRAHIM, S. R. M. et al. Fusarithioamide B, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 3, p. 786-790, 2018.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Serviços de referência virtual. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Atlas de Mortalidade por Câncer, 2016.

INCA - Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Estimativa 2016. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2015.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer: Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

IWAMOTO, L. H. et al. Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from Piper umbellatum L. leaves. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

JAGANATHAN, S. K. et al. Effect of honey and eugenol on Ehrlich ascites and solid carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.

JAGETIA, G. C.; VENKATESHA, V. A. K. Enhancement of radiation effect by Aphanamixis polystachya in mice transplanted with Ehrlich ascites carcinoma. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 69-77, 2005.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JIA, H. et al. Immunotherapy for triple-negative breast cancer: Existing challenges and exciting prospects. **Drug Resistance Updates**, v. 32, p. 1-15, 2017.

KABBAJ, F. Z. et al. Bioactive metabolites from Chaetomium aureum: Structure elucidation and inhibition of the Hsp90 machine chaperoning activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 1, p. 126-131, 2015.

KANG, Y. et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. **Cancer cell**, v. 3, n. 6, p. 537-549, 2003.

KATZ, H.; ALSHAREDI, M. Immunotherapy in triple-negative breast cancer. **Medical Oncology**, v. 35, n. 1, p. 13, 2018.

KEEB, G.; LALA, P. K. Effects of Ehrlich ascites tumor transplantation in mice on the distribution of cells capable of forming hemopoietic colonies in vitro. **European Journal of Cancer (1965)**, v. 14, n. 4, p. 331-342, 1978.

KENNECKE, H. et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **Journal of clinical oncology**, v. 28, n. 20, p. 3271-3277, 2010.

KIM, H. Y.; PARK, H. M.; LEE, C. H. Mass spectrometry-based chemotaxonomic classification of Penicillium species (P. echinulatum, P. expansum, P. solitum, and P.

oxalicum) and its correlation with antioxidant activity. **Journal of microbiological methods**, v. 90, n. 3, p. 327-335, 2012.

KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural product reports**, v. 28, n. 7, p. 1208-1228, 2011.

KHOURI N.F. Breast Ultrasound. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. Diseases of the breast. 4<sup>o</sup> edição. Philadelphia: Wolkers Kluwer; 2010. 131-151.

KLIMP, A. H. et al. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. **Cancer research**, v. 61, n. 19, p. 7305-7309, 2001.

KO, C. H. et al. Evaluation of the combined use of metronomic zoledronic acid and *Coriolus versicolor* in intratibial breast cancer mouse model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 204, p. 77-85, 2017.

KHOKER, S. et al. Clinico-pathologic profile of breast cancer patients in Pakistan: 10 years data of a local cancer hospital. **Asian Pacific Journal Cancer Prev.** 2012;13:693–8.

KUMAR, C. S. A. et al. Synthesis and evaluation of 1-benzhydryl-sulfonyl-piperazine derivatives as inhibitors of MDA-MB-231 human breast cancer cell proliferation. **Medicinal Chemistry Research**, v. 16, n. 4, p. 179-187, 2007.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

IRVIN JR, W. J.; CAREY, L. A. What is triple-negative breast cancer?. **European journal of cancer**, v. 44, n. 18, p. 2799-2805, 2008.

LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast cancer research and treatment**, v. 83, n. 3, p. 249-289, 2004.

LAKHANI, S.R. et al. **WHO Classification of tumours of the breast**. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2012.

LAKHTAKIA, R. Conspicuous Consumption and Sedentary Living: Is this our legacy to our children?. **Sultan Qaboos University medical journal**, v. 13, n. 3, p. 336, 2013.

LAO, J. et al. Liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. **Journal of drug delivery**, v. 2013, 2013.

LAU, S. K. M.; IYENGAR, P. Implications of weight loss for cancer patients receiving radiotherapy. **Current opinion in supportive and palliative care**, v. 11, n. 4, p. 261-265, 2017.

LEE, A. V.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N. E. MCF-7 cells—Changing the course of breast cancer research and care for 45 years. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, 2015.

LEE, I. M. et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **The lancet**, v. 380, n. 9838, p. 219-229, 2012.

LETOURNEAU, J. M. et al. Acute ovarian failure underestimates age-specific reproductive impairment for young women undergoing chemotherapy for cancer. **Cancer**, v. 118, n. 7, p. 1933-1939, 2012.

LIAO, N. et al. Extracts of *Lycoris aurea* induce apoptosis in murine sarcoma S180 cells. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3723-3735, 2012.

LI, S. et al. Berkeleyacetal C, a meroterpenoid isolated from the fungus *Penicillium purpurogenum* MHZ 111, exerts anti-inflammatory effects via inhibiting NF- $\kappa$ B, ERK1/2 and IRF3 signaling pathways. **European journal of pharmacology**, v. 814, p. 283-293, 2017.

LI, C. et al. Dichlorodiaportinol A—A new chlorine-containing isocoumarin from an endophytic fungus *Trichoderma* sp. 09 from *Myoporium bontioides* A. Gray and its cytotoxic activity. **Pharmacognosy magazine**, v. 10, n. Suppl 1, p. S153, 2014.

LI, H. et al. Antifungal, phytotoxic and toxic metabolites produced by *Penicillium purpurogenum*. **Natural product research**, v. 28, n. 24, p. 2358-2361, 2014.

LIEDKE, P. E. R et al. Outcomes of breast cancer in Brazil related to health care coverage: a retrospective cohort study. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 23, n. 1, p. 126-133, 2014.

LIMA, A. S. et al. **Manual Básico de Oncologia Experimental**: Tumor de Ehrlich, 2017.

LIMA, A. L. P. et al. Rastreamento oportunístico do câncer de mama entre mulheres jovens no Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 1433-1439, 2011.



LIN, Y. S. et al. Antrodia cinnamomea extract inhibits the proliferation of tamoxifen-resistant breast cancer cells through apoptosis and skp2/microRNAs pathway. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 152, 2018.

LIN, T. et al. Myrotheciumones: Bicyclic cytotoxic lactones isolated from an endophytic fungus of Ajuga decumbens. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 11, p. 2504-2507, 2014.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175-1183, 2007.

LODHIA, K. A. et al. Prioritizing therapeutic targets using patient-derived xenograft models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1855, n. 2, p. 223-234, 2015.

LOPES, Fernanda Cortez. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos**. 2011. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

LORDICK, F.; HACKER, U. Gewichtsverlust aus onkologischer Sicht. **DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 141, n. 04, p. 247-252, 2016.

LU, J. et al. Prediction of cancer drugs by chemical-chemical interactions. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e87791, 2014.

LY, M. et al. Breast cancer in Sub-Saharan African women: review. **Bulletin du cancer**, v. 98, n. 7, p. 797-806, 2011.

LYNCH, H. T. et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. **Molecular oncology**, v. 3, n. 2, p. 97-137, 2009.

MACIEL, M. C. G. et al. Tityus serrulatus scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Toxicon**, v. 89, p. 1-8, 2014.

MANNING, H. C.; BUCK, J. R.; COOK, R. S. Mouse models of breast cancer: platforms for discovering precision imaging diagnostics and future cancer medicine. **Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 57, n. Suppl 1, p. 60S, 2016.

MADY, M. S. et al. The indole alkaloid meleagrins, from the olive tree endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, as a novel lead for the control of c-Met-dependent

breast cancer proliferation, migration and invasion. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 24, n. 2, p. 113-122, 2016.

MARELLI, G. et al. Inflammation as target in cancer therapy. **Current opinion in pharmacology**, v. 35, p. 57-65, 2017.

MCKENZIE, F. et al. Cigarette smoking and risk of breast cancer in a New Zealand multi-ethnic case-control study. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e63132, 2013.

MELÉNDEZ-GONZÁLEZ, C. et al. Acremoxanthone E, a novel member of heterodimeric polyketides with a bicyclo [3.2. 2] nonene ring, produced by *Acremonium camptosporum* W. GAMS (Clavicipitaceae) endophytic fungus. **Chemistry & biodiversity**, v. 12, n. 1, p. 133-147, 2015.

MENG, L. et al. Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 2, p. 163-165, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações de Saúde. **Estatísticas vitais**. 2011. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acessado em 17/04/2019.

MNT - Medical news today. Breast cancer; 2013. Disponível em: [https://www.medicalnewstoday.com/categories/breast\\_cancer](https://www.medicalnewstoday.com/categories/breast_cancer).

MONSUEZ, J. J. et al. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. **International journal of cardiology**, v. 144, n. 1, p. 3-15, 2010.

MOORE, M. A. et al. Cancer epidemiology in South Asia-past, present and future. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 11, n. Suppl 2, p. 49-66, 2010.

MURPHY, R. A. et al. Nutritional intervention with fish oil provides a benefit over standard of care for weight and skeletal muscle mass in patients with nonsmall cell lung cancer receiving chemotherapy. **Cancer**, v. 117, n. 8, p. 1775-1782, 2011.

MOUSSA, A. Y.; MOSTAFA, N. M.; SINGAB, A. N. B. Pulchrinin A: First report of isolation from an endophytic fungus and its inhibitory activity on cyclin dependent kinases. **Natural product research**, p. 1-8, 2019.

NAGASHIMA, H. Rubratoxin-B-induced secretion of chemokine ligands of cysteine-cysteine motif chemokine receptor 5 (CCR5) and its dependence on heat shock protein 90 in HL60 cells. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 997-1000, 2015.

NATORI, S. et al. Production of rubratoxin B by *Penicillium purpurogenum* Stoll. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 19, n. 4, p. 613-617, 1970.

NAZARI, M. et al. Inactivation of nuclear factor- $\kappa$ B by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis and chemo-sensitizing effect in Ramos cells. **European journal of pharmacology**, v. 650, n. 2-3, p. 526-533, 2011.

NETO, S. A. G.; MELO, M. M.; SOTO-BLANCO, B. Efeitos farmacológicos e toxicidade das plantas do gênero Marsdenia. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 4, p. 809-819, 2016.

NIELSEN, K. F. Mycotoxin production by indoor molds. **Fungal genetics and biology**, v. 39, n. 2, p. 103-117, 2003.

OKUSHIMA, L. et al. Spectral characteristics of Penicillium species using a frequency controlled liquid crystal filter. **Biosystems engineering**, v. 88, n. 3, p. 265-269, 2004.

OLIVEIRA, Camila M. et al. Dihydroisocoumarins produced by Xylaria sp. and Penicillium sp., endophytic fungi associated with Piper aduncum and Alibertia macrophylla. **Phytochemistry letters**, v. 4, n. 2, p. 93-96, 2011.

OLIVEIRA, L.P. et al. Atividade citotóxica e antiangiogênica de Punica granatum L., Punicaceae. Elsevier, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.201-207, 2010.

OSHIRO, M. L. et al. Câncer de mama avançado como evento sentinela para avaliação do programa de detecção precoce do câncer de mama no centro-oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 1, p. 15-23, 2014.

OSMANOVA, N.; SCHULTZE, W.; AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 2, p. 315-342, 2010.

OZASLAN, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.

PANDI, M. et al. Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from Lasiodiplodia theobromae, an endophytic fungus of the medicinal plant Morinda citrifolia. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1428-1435, 2011.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 4, p. 439-445, 2010.

PARTRIDGE, A. H. et al. First international consensus guidelines for breast cancer in young women (BCY1). **The Breast**, v. 23, n. 3, p. 209-220, 2014.

PARTRIDGE, A. et al. Age of menopause among women who remain premenopausal following treatment for early breast cancer: long-term results from International Breast Cancer Study Group Trials V and VI. **European journal of cancer**, v. 43, n. 11, p. 1646-1653, 2007.

PDQ. Adult Treatment Editorial Board. Breast Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version, PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda, MD: National Cancer Institute (US), 2017.

PEREIRA, C. B T. **Serviços de referência virtual**. Como surge o Câncer? Nova Iguaçu, 2015.

PEREZ-BONILLA, M. et al. Hormonemate derivatives from *Dothiora* sp., an endophytic fungus. **Journal of natural products**, v. 80, n. 4, p. 845-853, 2017.

PEROU, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. **The oncologist**, v. 16, n. Supplement 1, p. 61-70, 2011.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **nature**, v. 406, n. 6797, p. 747, 2000.

PESSINA, A. et al. CFU-S and CFU-C proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich ascitic fluid. **Oncology**, v. 39, n. 6, p. 391-395, 1982.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw o edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br J Pharmacol**. v.142, n. 142, p.331–8, 2004.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular oncology**, v. 5, n. 1, p. 5-23, 2011.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast cancer research**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.

PUSZTAI, L. et al. New strategies in breast cancer: immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 9, p. 2105-2110, 2016.

PETIT, P. et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 8-9, 2009.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A. **Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification**. CRC Press, 2014.

PITT, J. I. et al. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer, 2009.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important?. **Sabouraudia**, v. 38, n. Supplement\_1, p. 17-22, 2000.

PRAT, A. et al. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 303, 2015.

QUEIROZ, M. L. S. Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanedae* bark extract and  $\beta$ -lapachone on the hematopoietic response of tumour-bearing mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 117, n. 2, p. 228-235, 2008.

RAHNAMA, M. et al. Evaluation of anti-cancer and immunomodulatory effects of carnosol in a Balb/c WEHI-164 fibrosarcoma model. **Journal of immunotoxicology**, v. 12, n. 3, p. 231-238, 2015.

RAJ, K. G. et al. Anti-proliferative effect of fungal taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* against human pathogenic bacteria and human colon cancer cell line HCT 15. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, p. 667-674, 2015.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 120, n. 2, p. 293-308, 2010.

RAMOS, F. M. **Aplicação de realidade virtual para construção de atlas de anatomia e fisiopatologia do câncer de mama**. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) - Centro Universitário de Marília, Marília, 2005.

RAND, M. S. Selection of biomedical animal models. In: **Sourcebook of models for biomedical research**. Humana Press, 2008. p. 9-15.

RAVIRAJ, J. et al. Radiosensitizers, radioprotectors, and radiation mitigators. **Indian Journal of Dental Research**, v. 25, n. 1, p. 83, 2014.

RÊGO, M. B. A. et al. TENDÊNCIA DE ÓBITOS POR CÂNCER DE MAMA NO ESTADO DO MARANHÃO/BREAST CANCER DEATH TENDENCY IN THE STATE OF MARANHÃO, BRAZIL. **Revista de Pesquisa em Saúde**, v. 16, n. 2, 2016.

REMON, J. et al. Immune-checkpoint inhibition in first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer patients: Current status and future approaches. **Lung Cancer**, v. 106, p. 70-75, 2017.

RIBEIRO, J. I. **Carcinoma da mama: estado-da-arte**. 2014. Dissertação de Mestrado.

RIBEIRO-SILVA, A. et al. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. **Histopathology**, v. 47, n. 5, p. 458-466, 2005.

RIZZO, M. S. **Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de Ehrlich em camundongos**. 2000. Tese de Doutorado.

ROBINSON, D. R. et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. **Nature genetics**, v. 45, n. 12, p. 1446, 2013.

ROBBINS, C. S. et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6Chigh monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. **Circulation**, v. 125, n. 2, p. 364-374, 2012.

RODRIGUEZ, M. G. P. **Avaliação dos efeitos antitumorais da metaloproteinase ofídica jararagina no adenocarcinoma de mama**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 2012.

ROSS, J. R. **Estratégias para a cobertura do rastreamento populacional do câncer de colo de útero e de mama em uma área rural da estratégia de Saúde da Família de Caxias-Maranhão**. 2016.

ROUTY, B. et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 91-97, 2018.

ROUZIER, R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clinical cancer research**, v. 11, n. 16, p. 5678-5685, 2005.

RUGGERI, B. A.; CAMP, F.; MIKNYOCZKI, S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. **Biochemical pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 150-161, 2014.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R. G. Neoplastic ascite: effects of phenol, glycerin and acetic in Ehrlich ascite tumor. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 6, p. 534-536, 2003.

SABATIER, R. et al. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. **Molecular cancer**, v. 13, n. 1, p. 228, 2014.

SALEM, D. S. et al. Breast imaging in the young: the role of magnetic resonance imaging in breast cancer screening, diagnosis and follow-up. **Journal of thoracic disease**, v. 5, n. Suppl 1, p. S9, 2013.

SAMSON, R. A. **Food and indoor fungi**. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010.

SANTOS, C. C. F. et al. Design and synthesis of cenocladamide analogues and their evaluation against breast cancer cell lines. **MedChemComm**, v. 8, n. 4, p. 755-766, 2017.

SANTOS, O. J. et al. Use of raw Euphorbia tirucalli extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 1, p. 18-21, 2016.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.

SCHACHNA, L. Dispelling the myths about ankylosing spondylitis. **Internal medicine journal**, v. 34, n. 11, p. 591-593, 2004.

SCHNITT, S. J.; COLLINS, L. C. Pathology of benign breast disorders. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. Diseases of the breast. 4ª edição. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2010. 69-85.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MÁRQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters**, v. 74, n. 2, p. 111-115, 2000.

SHABAB, M. et al. Isolation and Phylogenetic Analysis of Marine Fungus *Penicillium* sp. Sdb1 and Partial Characterization of its Cysteine Protease Inhibitor. **Int. J. Adv. Biotech. Res**, v. 2, p. 135, 2011.

SHAABAN, M.. (3 R, 4 S)-isostreptenol III from *Penicillium purpurogenum* MM. **Natural product research**, p. 1-5, 2018.

SHAABAN, M.; EL-METWALLY, M. M.; LAATSCH, H. New bioactive metabolites from *Penicillium purpurogenum* MM. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 71, n. 4, p. 287-295, 2016.

SHALOM, G.; PRATTEN, J.; WILSON, M.; NAIR, S.P. Cloning, heterologous gene expression and biochemical characterization of the alpha-1,3-glucanase from the filamentous fungus *Penicillium purpurogenum*. **Protein Expression and Purification**, v.60, n.2, p.170-175, 2008.

SHANG, K. M. et al. Novel effect and the mechanistic insights of fruiting body extract of medicinal fungus *Antrodia cinnamomea* against T47D breast cancer. **Phytomedicine**, v. 24, p. 39-48, 2017.

SHAW, J. J. et al. Biosynthesis and genomic analysis of medium-chain hydrocarbon production by the endophytic fungal isolate *Nigrograna mackinnonii* E5202H. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 8, p. 3715-3728, 2015.

SHAW, D. et al. Pharmacovigilance of herbal medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 140, n. 3, p. 513-518, 2012.

SHEEJA, K.; KUTTAN, G. Modulation of natural killer cell activity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity by andrographolide in normal and Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **Integrative cancer therapies**, v. 6, n. 1, p. 66-73, 2007.

SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1291-1299, 2015.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.

SILVA, I. P. et al. Bioactive compounds of *Aspergillus terreus*—F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 62, 2017.

SILVA, L. B. Condições de vida e adoecimento por câncer. **Libertas**, v. 10, n. 2, 2012.

SILVA, E. D. et al. Dhilirolides A– D, Meroterpenoids Produced in Culture by the Fruit-Infecting Fungus *Penicillium purpurogenum* Collected in Sri Lanka. **Organic letters**, v. 13, n. 5, p. 1174-1177, 2011.

SILVA, M. S. Fungos endofíticos: Fontes promissoras de novas substâncias com atividades antioxidante e antiviral. Monografia. Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.

SILVA, M. G. et al. Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx. **Microbiological research**, v. 159, n. 4, p. 317-322, 2004.

SILVA, R. J. et al. Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom. **Mediators of inflammation**, v. 11, n. 2, p. 99-104, 2002.



SIVAN, A. et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. **Science**, v. 350, n. 6264, p. 1084-1089, 2015.

SMYTH, M. J.; DUNN, G. P.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Advances in immunology**, v. 90, p. 1-50, 2006.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J., 1996. Biometry: The principle and practice of statistics. Biological Research. 2.ed. New York: W. H. Freeman and Company.

SORLIE, T. et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, p. 127, 2006.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, 2003.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 18, p. 10393-10398, 2003.

SOULE, H. D. et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer research**, v. 50, n. 18, p. 6075-6086, 1990.

SOULE, H. D. et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1409-1416, 1973.

SRIRAM, M. I. et al. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. **International journal of nanomedicine**, v. 5, p. 753, 2010.

STIERLE, D. B.; STIERLE, A. A.; PATAVINI, B. The berkeleyacetals, three meroterpenes from a deep water acid mine waste *Penicillium*. **Journal of natural products**, v. 70, n. 11, p. 1820-1823, 2007.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

SUN, J. et al. Anti-neuroinflammatory constituents from the fungus *Penicillium purpurogenum* MHZ 111. **Natural product research**, v. 31, n. 5, p. 562-567, 2017.

SUN, J. F. et al. Pestalols A–E, new alkenyl phenol and benzaldehyde derivatives from endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. AcBC2 isolated from the Chinese mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. **The Journal of antibiotics**, v. 67, n. 6, p. 451, 2014.

SUN, R. et al. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. **Phytochemistry letters**, v. 4, n. 2, p. 101-105, 2011.

SUTELIFFE, J. **A history of medicine: from prehistory to the year 2020**. Simon & Schuster, 1992.

TANG, M. C. et al. Late-stage terpene cyclization by an integral membrane cyclase in the biosynthesis of isoprenoid epoxy cyclohexenone natural products. **Organic letters**, v. 19, n. 19, p. 5376-5379, 2017.

TAKATA, R. et al. Immunostimulatory effects of a polysaccharide-rich substance with antitumor activity isolated from black currant (*Ribes nigrum* L.). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2042-2050, 2005.

THOM, G.; LEAN, M. Is there an optimal diet for weight management and metabolic health?. **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1739-1751, 2017.

THOMPSON, A. et al. Evaluation of the current knowledge limitations in breast cancer research: a gap analysis. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 2, p. R26, 2008.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

UTSUMI, K. et al. Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 1, p. 397-403, 1990.

VALADARES, M. C. et al. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 294-299, 2006.

VALADARES, M. C.; KLEIN, S. I.; QUEIROZ, M. L. S. Titanocene modulation of cytokine imbalance induced by Ehrlich ascites tumour progression. **European journal of pharmacology**, v. 503, n. 1-3, p. 203-208, 2004.

VALADARES, M. C. et al. Enhancement of natural killer cell function by titanocenes in mice bearing Ehrlich ascites tumour. **European journal of pharmacology**, v. 473, n. 2-3, p. 191-196, 2003.

VALADARES, M. C.; QUEIROZ, M. L. S. The effect of a titanocene dichloride derivative, Ti IV (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> NCS<sub>2</sub>, on the haematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. **European journal of pharmacology**, v. 439, n. 1-3, p. 35-42, 2002.

VENUGOPALAN, A.; SRIVASTAVA, S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 873-887, 2015.

VIAUD, S. et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. **science**, v. 342, n. 6161, p. 971-976, 2013.

VODUC, K. D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **Journal of clinical oncology**, v. 28, n. 10, p. 1684-1691, 2010.

WANG, Y. et al. Purpuroside A, 5/5/5 Spirocyclic Sesquiterpene Lactone in Nature from the Endophytic Fungus *Penicillium purpurogenum*. **Organic letters**, v. 20, n. 22, p. 7341-7344, 2018.

WANG, M. et al. Cytotoxic cochlioquinone derivatives from the endophytic fungus *Bipolaris sorokiniana* derived from *Pogostemon cablin*. **Fitoterapia**, v. 110, p. 77-82, 2016.

WANG, H. et al. Purpurides B and C, Two New Sesquiterpene Esters from the Aciduric Fungus *Penicillium purpurogenum* JS03-21. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 7, p. 1185-1192, 2013.

WANG, X. et al. Anti-angiogenic and antitumor activities of Huaier aqueous extract. **Oncology reports**, v. 28, n. 4, p. 1167-1175, 2012.

WANG, Q. X. et al. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 5, p. 777-781, 2011.

WANG, H. et al. Anti-influenza virus polyketides from the acid-tolerant fungus *Penicillium purpurogenum* JS03-21. **Journal of natural products**, v. 74, n. 9, p. 2014-2018, 2011.

WANG, T. et al. Anti-tumor effects of Rubratoxin B on cell toxicity, inhibition of cell proliferation, cytotoxic activity and matrix metalloproteinase-2, 9. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 4, p. 646-650, 2007.

WANG, L. et al. *Penicillium persicinum*, a new griseofulvin, chrysogine and roquefortine C producing species from Qinghai province, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 2, p. 173-179, 2004.

WASS, J.; FINER, N. Action on obesity: comprehensive care for all. **Clinical Medicine**, v. 13, n. 1, p. 4-5, 2013.

WATSON, I. R. et al. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. **Nature reviews Genetics**, v. 14, n. 10, p. 703, 2013.

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

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocrine-related cancer**, v. 17, n. 4, p. R245-R262, 2010.

WELSH, J. Animal models for studying prevention and treatment of breast cancer. In: **Animal models for the study of human disease**. Academic Press, 2013. p. 997-1018.

WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. **Translational Research**, v. 179, p. 204-222, 2017.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904, 2008.

WHO. **Global Health Observatory data repository - Health Expenditure per Capita, all countries, selected years**. 2013. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.78?lang=en>>. Acessado em: 10/04/2019.

WHO. **Global Health Observatory. Cancer**. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>. Acessado em: 05/04/2019.

WOLFF, A. C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 131, n. 1, p. 18-43, 2007.

WONG, S. H. et al. Gavage of fecal samples from patients with colorectal cancer promotes intestinal carcinogenesis in germ-free and conventional mice. **Gastroenterology**, v. 153, n. 6, p. 1621-1633. e6, 2017.

XIA, M. W. et al. Three new and eleven known unusual C25 steroids: Activated production of silent metabolites in a marine-derived fungus by chemical mutagenesis strategy using diethyl sulphate. **Marine drugs**, v. 12, n. 3, p. 1545-1568, 2014.

XIAO, Z. et al. Asperterpenols A and B, new sesterterpenoids isolated from a mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. 085242. **Organic letters**, v. 15, n. 10, p. 2522-2525, 2013.

XU, M. et al. Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Oncology letters**, v. 11, n. 5, p. 3075-3080, 2016.

XU, Y. et al. Secoemestrin D, a cytotoxic epitetrahydrodioxopiperazine, and emericellenes A–E, five sesterterpenoids from *Emericella* sp. AST0036, a fungal endophyte of *Astragalus lentiginosus* 1. **Journal of natural products**, v. 76, n. 12, p. 2330-2336, 2013.

YING, Y. M. et al. Studies on the Chemical Diversities of Secondary Metabolites Produced by *Neosartorya fischeri* via the OSMAC Method. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2772, 2018.

YUAN, L. et al. Isolation of Xanthones from the Fermentation Products of the Endophytic Fungus of *Phomopsis amygdali*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 3, p. 460-463, 2015.

YUNianto, P. et al. Alkaloid (meleagrine and chrysogine) from endophytic fungi (*Penicillium* sp.) of *Annona squamosa* L. **Pak J Biol Sci**, v. 17, n. 5, p. 667-674, 2014.

YUNianto, P. et al. Isolation and identification of endophytic fungi from srikaya plants (*Annona squamosa*) having potential secondary metabolites as anti-breast cancer activity. **Microbiology Indonesia**, v. 6, n. 1, p. 4, 2012.

ZAIYOU, J.; LI, M.; XIQIAO, H. An endophytic fungus efficiently producing paclitaxel isolated from *Taxus wallichiana* var. *mairei*. **Medicine**, v. 96, n. 27, 2017.

ZHANG, W. et al. Phomopsidone A, a novel depsidone metabolite from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. A123. **Fitoterapia**, v. 96, p. 146-151, 2014.

ZHOU, D. et al. Chemotherapy Modulates Endocrine Therapy-Related Resistance Mutations in Metastatic Breast Cancer. **Translational oncology**, v. 12, n. 5, p. 764-774, 2019.

ZHOU, M. et al. Versicolols A and B, two new prenylated isocoumarins from endophytic fungus *Aspergillus versicolor* and their cytotoxic activity. **Archives of pharmacal research**, v. 40, n. 1, p. 32-36, 2017.

ZHOU, M. et al. Aspergillines A–E, highly oxygenated hexacyclic indole–tetrahydrofuran–tetramic acid derivatives from *Aspergillus versicolor*. **Organic letters**, v. 16, n. 19, p. 5016-5019, 2014.

**INCA** - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019. 120 p.: il. color. ISBN 978-85-7318-389-4 (versão eletrônica).

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estatísticas de câncer**. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acessado em 27/05/2020.

WHO. **Global Health Observatory**. Cancer. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acessado em 26/05/2020.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

UICC - **Union for International Cancer Control**. TNN Classification. 2019. Disponível em: < <https://www.uicc.org/resources/tnm>>. Acessado em 27/05/2020.

WHO. Global Health Observatory. Cancer. 2020. Disponível em: <[https://www.who.int/medical\\_devices/diagnostics/selection\\_invitro/selection\\_invitro-meetings/sub-id-63-33/en/](https://www.who.int/medical_devices/diagnostics/selection_invitro/selection_invitro-meetings/sub-id-63-33/en/)>. Acessado em 27/05/2020.

Mina LA, Lim S, Bahadur SW, Firoz AT. Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer: Emerging New Data. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2019;11:321-328. Published 2019 Dec 31. doi:10.2147/BCTT.S184710

Garaud S, Buisseret L, Solinas C, et al. Tumor infiltrating B-cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. *JCI Insight*. 2019;5(18):e129641. Published 2019 Aug 13. doi:10.1172/jci.insight.129641

Wimberly H, Brown JR, Schalper K, et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(4):326-332. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0133

Tawbi HA, Forsyth PA, Algazi A, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *N Engl J Med*. 2018;379(8):722-730. doi:10.1056/NEJMoa1805453

Harel M, Ortenberg R, Varanasi SK, et al. Proteomics of Melanoma Response to Immunotherapy Reveals Mitochondrial Dependence. *Cell*. 2019;179(1):236-250.e18. doi:10.1016/j.cell.2019.08.012

Goswami I, Coutermarsh-Ott S, Morrison RG, et al. Irreversible electroporation inhibits pro-cancer inflammatory signaling in triple negative breast cancer cells. *Bioelectrochemistry*. 2017;113:42-50. doi:10.1016/j.bioelechem.2016.09.003

Ringel-Scaia VM, Beitel-White N, Lorenzo MF, et al. High-frequency irreversible electroporation is an effective tumor ablation strategy that induces immunologic cell death and promotes systemic anti-tumor immunity. *EBioMedicine*. 2019;44:112-125. doi:10.1016/j.ebiom.2019.05.036

Guenther E, Klein N, Zapf S, et al. Prostate cancer treatment with Irreversible Electroporation (IRE): Safety, efficacy and clinical experience in 471 treatments. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215093. Published 2019 Apr 15. doi:10.1371/journal.pone.0215093

Van den Bos W, Scheltema MJ, Siriwardana AR, et al. Focal irreversible electroporation as primary treatment for localized prostate cancer. *BJU Int*. 2018;121(5):716-724. doi:10.1111/bju.13983

Wichtowski M, Murawa D, Czarnecki R, Piechocki J, Nowecki Z, Witkiewicz W. Electrochemotherapy in the Treatment of Breast Cancer Metastasis to the Skin and Subcutaneous Tissue - Multicenter Experience. *Oncol Res Treat*. 2019;42(1-2):47-51. doi:10.1159/000494093

RANG, H. P. et al. Rang & Dale farmacologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Matsuda Y, Abe I. Biosynthesis of fungal meroterpenoids. *Nat Prod Rep*. 2016;33(1):26-53. doi:10.1039/c5np00090d

Geris R, Simpson TJ. Meroterpenoids produced by fungi. *Nat Prod Rep*. 2009;26(8):1063-1094. doi:10.1039/b820413f

Sun J, Zhu ZX, Song YL, et al. Nitric Oxide Inhibitory Meroterpenoids from the Fungus *Penicillium purpurogenum* MHZ 111. *J Nat Prod*. 2016;79(5):1415-1422. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00160

Li SS, Li J, Sun J, et al. Berkeleyacetal C, a meroterpenoid isolated from the fungus *Penicillium purpurogenum* MHZ 111, exerts anti-inflammatory effects via inhibiting NF- $\kappa$ B, ERK1/2 and IRF3 signaling pathways. *Eur J Pharmacol*. 2017;814:283-293. doi:10.1016/j.ejphar.2017.08.039

de Silva ED, Williams DE, Jayanetti DR, et al. Dhilirolides A-D, meroterpenoids produced in culture by the fruit-infecting fungus *Penicillium purpurogenum* collected in Sri Lanka. *Org Lett*. 2011;13(5):1174-1177. doi:10.1021/ol200031t

Centko RM, Williams DE, Patrick BO, et al. Dhilirolides E-N, meroterpenoids produced in culture by the fungus *Penicillium purpurogenum* collected in Sri Lanka: structure elucidation, stable isotope feeding studies, and insecticidal activity. *J Org Chem*. 2014;79(8):3327-3335. doi:10.1021/jo4024039

Fang SM, Cui CB, Li CW, et al. Purpurogemutantidin and purpurogemutantidin, new drimenyl cyclohexenone derivatives produced by a mutant obtained by diethyl sulfate mutagenesis of a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. *Mar Drugs*. 2012;10(6):1266-1287. doi:10.3390/md10061266

XIA Gui-Yang, WANG Ling-Yan, ZHANG Jing-Fang, WU Yu-Zhuo, GE Guang-Bo, WANG Ya-Nan, LIN Peng-Cheng, LIN Sheng. Three new polyoxygenated bergamotanes from the endophytic fungus *Penicillium purpurogenum* IMM 003 and their inhibitory activity against pancreatic lipase [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(1): 75-80.

Schmidt LE, Deyrup ST, Baltrusaitis J, Swenson DC, Wicklow DT, Gloer JB. Hymenopsins A and B and a macrophorin analogue from a fungicolous *Hymenopsis* sp. *J Nat Prod*. 2010;73(3):404-408. doi:10.1021/np900613d

Wang HJ, Gloer JB, Wicklow DT, Dowd PF. Aflavinines and other antiinsectan metabolites from the ascostromata of *Eupenicillium crustaceum* and related species. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(12):4429-4435.

Fujimoto H, Nakamura E, Kim YP, Okuyama E, Ishibashi M, Sassa T. Immunomodulatory constituents from an Ascomycete, *Eupenicillium crustaceum*, and revised absolute structure of macrophorin D. *J Nat Prod*. 2001;64(9):1234-1237. doi:10.1021/np010152n

He WJ, Zhou XJ, Qin XC, et al. Quinone/hydroquinone meroterpenoids with antitubercular and cytotoxic activities produced by the sponge-derived fungus *Gliomastix* sp. ZSDS1-F7. *Nat Prod Res*. 2017;31(5):604-609. doi:10.1080/14786419.2016.1207076

Tang MC, Cui X, He X, et al. Late-Stage Terpene Cyclization by an Integral Membrane Cyclase in the Biosynthesis of Isoprenoid Epoxycyclohexenone Natural Products. *Org Lett*. 2017;19(19):5376-5379. doi:10.1021/acs.orglett.7b02653

Sassa T, Ishizaki A, Nukina M, Ikeda M, Sugiyama T. Isolation and Identification of New Antifungal Macrophorins E, F and G as Malonyl Meroterpenes from *Botryosphaeria berengeriana*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998;62(11):2260-2262. doi:10.1271/bbb.62.2260

Etoh T, Kim YP, Tanaka H, Hayashi M. Anti-inflammatory effect of berkeleyacetal C through the inhibition of interleukin-1 receptor-associated kinase-4 activity. *Eur J Pharmacol*. 2013;698(1-3):435-443. doi:10.1016/j.ejphar.2012.10.038



Stierle DB, Stierle AA, Patacini B. The berkeleyacetals, three meroterpenes from a deep water acid mine waste *Penicillium*. *J Nat Prod*. 2007;70(11):1820-1823. doi:10.1021/np070329z

Natori S, Sakaki S, Kurata H, Udagawa SI, Ichinoe M. Production of rubratoxin B by *Penicillium purpurogenum* Stoll. *Appl Microbiol*. 1970;19(4):613-617

Jin HJ, Zhang X, Cao H, Niu YJ, Li C, Liu H. Chemical Composition, Security and Bioactivity of the Red Pigment from *Penicillium purpurogenum* Li-3. *Chem Biodivers*. 2018;15(12):e1800300. doi:10.1002/cbdv.201800300

Sun J, Zhu ZX, Song YL, et al. Anti-neuroinflammatory constituents from the fungus *Penicillium purpurogenum* MHZ 111. *Nat Prod Res*. 2017;31(5):562-567. doi:10.1080/14786419.2016.1207075

Sun J, Zhu ZX, Song YL, et al. Nitric Oxide Inhibitory Meroterpenoids from the Fungus *Penicillium purpurogenum* MHZ 111. *J Nat Prod*. 2016;79(5):1415-1422. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00160

Shaaban M, El-Metwally MM, Laatsch H. 2016. New bioactive metabolites from *Penicillium purpurogenum* MM. *Zeitschrift Naturforsch*. 71B:287–296.

Shaaban M. (3R,4S)-isostreptenol III from *Penicillium purpurogenum* MM. *Nat Prod Res*. 2018;34(7):1032-1036. doi:10.1080/14786419.2018.1538997

de Souza GG, Pfenning LH, de Moura F, Salgado M, Takahashi JA. Isolation, identification and antimicrobial activity of propolis-associated fungi. *Nat Prod Res*. 2013;27(18):1705-1707. doi:10.1080/14786419.2013.771348

Wang M, Wang S, Wang W, Wang Y, Wang H, Zhu W. Inhibition effects of novel polyketide compound PPQ-B against influenza A virus replication by interfering with the cellular EGFR pathway. *Antiviral Res*. 2017;143:74-84. doi:10.1016/j.antiviral.2017.04.007

Xia MW, Cui CB, Li CW, Wu CJ, Peng JX, Li DH. Rare Chromones from a Fungal Mutant of the Marine-Derived *Penicillium purpurogenum* G59. *Mar Drugs*. 2015;13(8):5219-5236. Published 2015 Aug 18. doi:10.3390/md13085219

Wu CJ, Qiao H, Cui CB, et al. Two new polyketides isolated from a diethyl sulphate mutant of marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. *Nat Prod Res*. 2019;33(20):2977-2981. doi:10.1080/14786419.2018.1514397

Wu CJ, Yi L, Cui CB, Li CW, Wang N, Han X. Activation of the silent secondary metabolite production by introducing neomycin-resistance in a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. *Mar Drugs*. 2015;13(4):2465-2487. Published 2015 Apr 22. doi:10.3390/md13042465

Xia MW, Yang Y, Xu R, Li CW, Cui CB. A new polyketide purpurogenic acid: the activated production of polyketides by the diethyl sulphate mutagenesis of marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. *Nat Prod Res.* 2019;33(1):89-94. doi:10.1080/14786419.2018.1434644

Wang N, Cui CB, Li CW. A new cyclic dipeptide penicimutide: the activated production of cyclic dipeptides by introduction of neomycin-resistance in the marine-derived fungus *Penicillium purpurogenum* G59. *Arch Pharm Res.* 2016;39(6):762-770. doi:10.1007/s12272-016-0751-7

Wang N, Dong Y, Yang Y, Xu R, Li CW, Cui CB. Penicimutanin C, a New Alkaloidal Compound, Isolated from a Neomycin-resistant Mutant 3-f-31 of *Penicillium purpurogenum* G59 [published online ahead of print, 2020 May 8]. *Chem Biodivers.* 2020;10.1002/cbdv.202000241. doi:10.1002/cbdv.202000241

Fang SM, Wu CJ, Li CW, Cui CB. A practical strategy to discover new antitumor compounds by activating silent metabolite production in fungi by diethyl sulphate mutagenesis. *Mar Drugs.* 2014;12(4):1788-1814. Published 2014 Mar 27. doi:10.3390/md12041788

Wu CJ, Li CW, Cui CB. Seven new and two known lipopeptides as well as five known polyketides: the activated production of silent metabolites in a marine-derived fungus by chemical mutagenesis strategy using diethyl sulphate. *Mar Drugs.* 2014;12(4):1815-1838. Published 2014 Mar 28. doi:10.3390/md12041815

Xia MW, Cui CB, Li CW, Wu CJ. Three new and eleven known unusual C25 steroids: activated production of silent metabolites in a marine-derived fungus by chemical mutagenesis strategy using diethyl sulphate. *Mar Drugs.* 2014;12(3):1545-1568. Published 2014 Mar 13. doi:10.3390/md12031545

Chai YJ, Cui CB, Li CW, Wu CJ, Tian CK, Hua W. Activation of the dormant secondary metabolite production by introducing gentamicin-resistance in a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. *Mar Drugs.* 2012;10(3):559-582. doi:10.3390/md10030559

## ANEXO A



10/05/2019 870190044067  
11:02  
29409161902310844

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 009541 5

**Dados do Depositante (71)**

**Depositante 1 de 2**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 06279103000119

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga.

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65080-805

**País:** Brasil

**Telefone:** (98) 32728710

**Fax:**

**Email:** nit-dapi@ufma.br

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 10/05/2019 às 11:02, Petição 870190044067

**Depositante 2 de 2****Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 06352421000168**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** AV. LOURENÇO VIEIRA, 1000, CIDADE UNIVERSITÁRIA PAULO VI, JARDIM SÃO CRISTÓVÃO**Cidade:** São Luis**Estado:** MA**CEP:** 65055-310**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:** nit.ppg.uema@gmail.com**Dados do Pedido****Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *Penicillium purpurogenum***Resumo:** A presente invenção trata-se de processo de obtenção de extrato de fungo que apresentam atividade quimioterapêutica contra o câncer de mama ou anti-inflamatórios, com efeitos específicos, demonstrando que há positividade para o receptor hormonal positivo e negativo a partir do microfungo da família do *Penicillium*, às aplicações desse extrato; os processos de obtenção do extrato mais particularmente do caldo e da biomassa micelial que geram do extrato de fungo e liofilizados produzem um extratos com composição de uso terapêutico de com efeitos antioxidantes, anti-inflamatório contra o câncer de mama, cuja utilização tem ação anticancerígena no processo tumorigênico.**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 10/05/2019 às 11:02, Petição 870190044067

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 7****Nome:** AMANDA MARA TELES**CPF:** 00884911373**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins**Endereço:** Rua Jardim Aurora, n°69 Bairro- Aurora.**Cidade:** São Luis**Estado:** MA**CEP:** 65064-140**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 981 288635**Fax:****Email:** damarateles@hotmail.com**Inventor 2 de 7****Nome:** MARIA DO DESTERRO SOARES BRANDÃO NASCIMENTO**CPF:** 04492900349**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Médico**Endereço:** Rua Duque Bacelar, Q. 33, N. 41, Quintas do Calhau**Cidade:** São Luis**Estado:** MA**CEP:** 65072-023**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 981 890191**Fax:****Email:** cnsd\_ma@uol.com.br**Inventor 3 de 7**

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 10/05/2019 às 11:02, Petição 870190044067

## ANEXO B



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA**  
**CIAEP:01.0341.2014**


**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada “**Potencial anticancerígeno de frações de polissacarídeo e proteína de *Penicillium* sp de ambiente marinho avaliados por ensaios in vitro e in vivo**” registrada com o nº **23115.11239/2017-70**, sob a responsabilidade de **Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	( )ENSINO(X)PESQUISA ( ) EXTENSÃO
Vigência da autorização	02/03/2016 à 30/03/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo <i>Swiss</i>
Nº de animais	70
Peso/Idade	20g/50-60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho  
 Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA

## ANEXO C



# LIAC

Laboratório de Imunologia  
Aplicada ao Câncer

**PROTOCOLO DE SOVREVIDA-ENDPOINTS**

Identificação do experimento:	
Responsável:	
Data:	
Grupo experimental:	
Identificação do animal:	

**Nota:**

- As observações devem ser diárias no período do estudo de sobrevida.
- Em caso de alteração de comportamento com manifestação de três ou mais sinais por mais de 24h associados a sinal de dor com escore igual ou maior que dois, o animal deve ser eutanasiado por excesso de anestésico.
- Em caso de alterações de comportamento até três ou escore de dor até dois manter o animal sob vigilância e permanecendo por mais de 72h, o mesmo deve ser eutanasiado por excesso de anestésico.

**1. Checklist de monitoramento:**

Sinal	Anormalidades		Descrição do sinal e/ou intervenção:
	Não	Sim	
1) Sinais gerais de anormalidade para a espécie? *			
2) Sinais específicos de problemas que podem surgir do procedimento realizado?			
3) Algum tipo de intervenção é necessária (analgesia, dieta, troca de caixa, hidratação)?			
4) Morte humanitária é necessária?			
5) Necessidade de qualquer tratamento dado, para que sua eficácia seja avaliada?			

\* Lista de sinais relacionados a estresse, dor ou desconforto em camundongos

Sinais potenciais associados a dor ou desconforto em camundongos
Diminuição no consumo de água e alimento
Perda de peso
Isolamento social
Automutilação, mordedura de membros
Respiração acelerada
Respiração com a boca aberta
Respiração abdominal
Aumento/diminuição de movimentos
Aparência da pelagem (erizada, emaranhada, opaca)
Postura anormal
Rigidez muscular/falta de tônus muscular
Desidratação/olhos fundos
Espasmos/tremores
Vocalização (raro)
Vermelhidão ou inchaço ao redor da ferida cirúrgica

Referência: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2015). Normativa do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica.

Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP / Silvânia M. P. Neves [et al.]. -- São Paulo : FCF-IQ/USP, 2013. 216 p. il

**2. Escala de avaliação de dor – Grimace (Observar o painel demonstrativo)**

Sinal de Dor	0 Ausente	1 Moderado	2 Presente
Estreitamento da área orbital: observado por como fechamento ocular parcial ou completo ou aperto ocular			
Aplainamento do nariz / bochecha: observado por menos protuberância do nariz e da bochecha (ver acima), com eventual ausência do sulco entre a bochecha e as almofadas de bigode			
Mudança na posição das orelhas: animais com dor tendem a dobrar, enrolar e inclinar para a frente ou para fora, resultando em uma forma pontiaguda. O espaço entre as orelhas pode parecer mais amplo.			
Mudança de comportamento: observado pelos bigodes que se movem para frente (longe do rosto) da posição de base e tendem a se agrupar, dando a aparência de bigodes em pé.			

Referencia: Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., ... & McDougall, J. J. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular pain*, 7(1), 55.

**OBS:**



## PAINEL DEMONSTRATIVO

Not present

"0"



Moderate

"1"



Obvious

"2"



Orbital Tightening



Nose/Cheek Flattening



Ear Changes



Whisker Change

Referencia: Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., ... & McDougall, J. J. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular pain*, 7(1), 55.

## ANEXO D

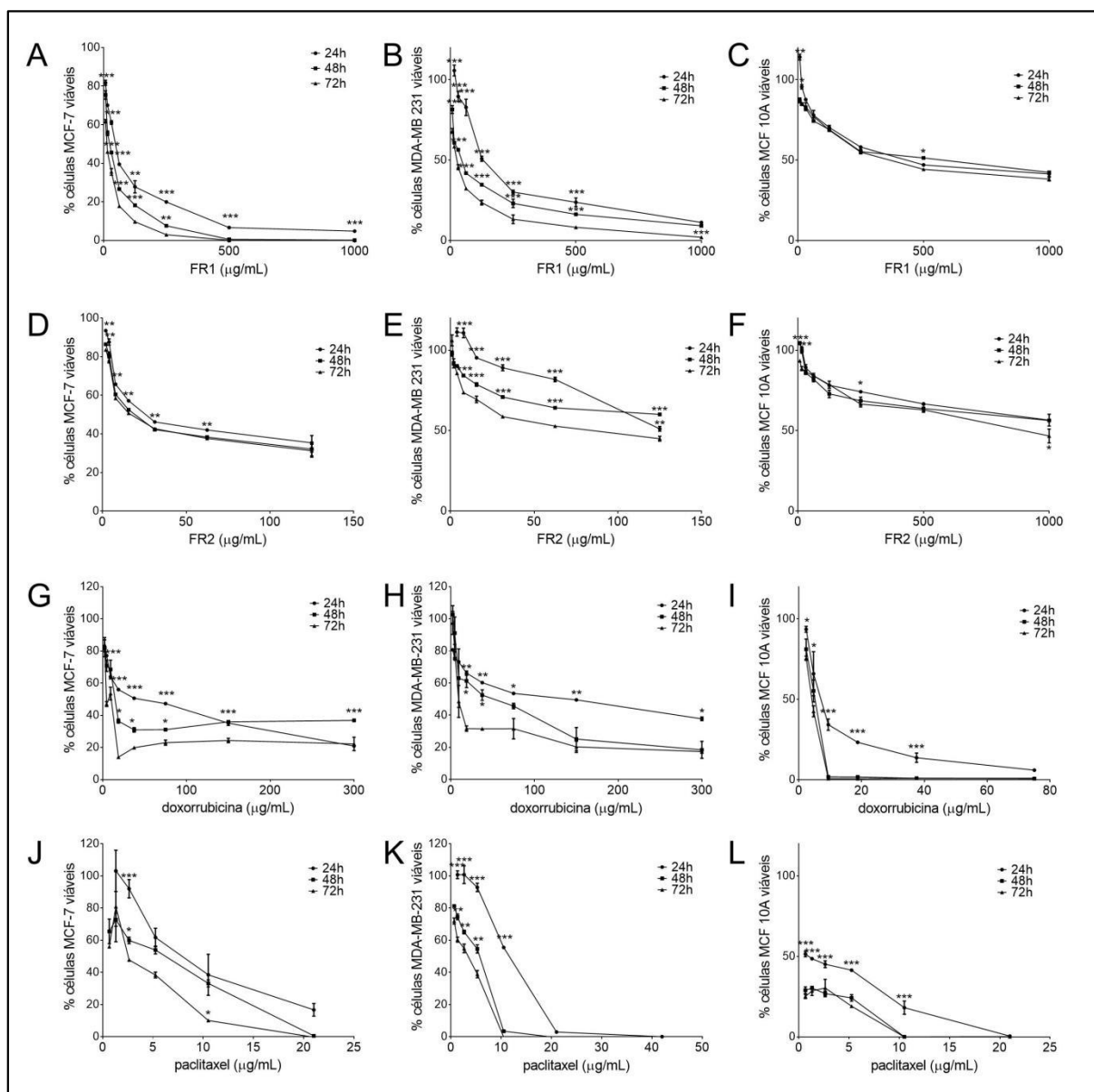


Figura 17 - Curvas cinéticas (24, 48 e 72h) relacionando a citotoxicidade e as concentrações dos extratos e drogas padrões testadas nas linhagens celulares. A frequência as células viáveis de MCF-7 (A.), MDA-MB-231 (B) e MCF-10 (C) tratadas com FR1, MCF-7 (D), MDA-MB-231 (E) e MCF-10 (F) tratadas com FR2, MCF-7 (G), MDA-MB-231 (H) e MCF-10 (I) tratadas com DOX e MCF-7 (J), MDA-MB-231 (K) e MCF-10 (L) tratadas com PAC.

## ANEXO E

Tabela 12 - Concentração inibitória de 50% das células de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231 e células normais de mama MCF 10A após tratamento com extratos de *P. purpurogenum*, doxorubicina ou paclitaxel

Linhagem	Tempo (h)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)			
		FR1	FR2	Doxorrubicina	Paclitaxel
MCF7	24	43,97 ± 1,04	29,98±1,13	37,10±1,40	8,51±1,26
	48	23,01±1,03	22,08±1,12	19,02±1,22	3,60±1,15
	72	13,85±1,03	20,14±1,13	7,57±1,19	2,27±1,21
MDA-MB-237	24	170,00±1,16	198,80±1,16	78,15±1,11	10,33±1,30
	48	44,60±1,09	112,90±1,12	40,88±1,19	3,32±1,21
	72	25,46±1,06	54,77±1,13	14,95±1,17	2,12±1,12
MCF 10A	24	407,30±1,12	926,00±1,11	7,45±1,11	1,54±1,14
	48	376,90±1,14	771,20±1,14	3,57±1,23	0,48±1,15
	72	332,00±1,11	659,80±1,10	2,89±1,18	0,42±1,17

## ANEXO F

ANEXO F – Quantificação de citocinas de camundongos Swiss inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com *Penicillium purpurogenum*

Grupo/Tratamentos	Quantificação de citocinas (pg/mL)									
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17A	IFN- $\gamma$	TNF			
Sham	1.29 $\pm$ 0.948	0.34 $\pm$ 0.148	163.9 $\pm$ 109.7	33.46 $\pm$ 11.12	47.38 $\pm$ 47.12	155.7 $\pm$ 146.3	156.1 $\pm$ 25.14 <sup>a</sup>			
EAE20	6.97 $\pm$ 0.707	3.97 $\pm$ 3.536	207.1 $\pm$ 29.45	14.05 $\pm$ 7.023	33.97 $\pm$ 2.303	315.6 $\pm$ 293.4	306.9 $\pm$ 17.93 <sup>b</sup>			
CLT-	2.04 $\pm$ 2.120	8.00 $\pm$ 0.452	395.5 $\pm$ 229.1	15.13 $\pm$ 15.13	40.33 $\pm$ 5.875	229.4 $\pm$ 211.0	508.8 $\pm$ 66.22 <sup>c</sup>			
CLT+	0.67 $\pm$ 0.046	2.83 $\pm$ 2.022	169.8 $\pm$ 53.03	41.19 $\pm$ 15.73	63.42 $\pm$ 31.08	246.5 $\pm$ 50.75	177.2 $\pm$ 27.67 <sup>a,b</sup>			
FR1 4+Tumor	0.80 $\pm$ 0.166	3.31 $\pm$ 1.849	227.5 $\pm$ 123.9	16.31 $\pm$ 5.843	162.2 $\pm$ 21.07	110.5 $\pm$ 101.0	161.7 $\pm$ 30.66 <sup>a,b</sup>			
FR1 20+Tumor	1.26 $\pm$ 0.879	3.70 $\pm$ 0.184	29.27 $\pm$ 15.98	25.13 $\pm$ 9.24	17.91 $\pm$ 14.43	24.15 $\pm$ 23.26	212.4 $\pm$ 12.03 <sup>a,b</sup>			
FR1 100+Tumor	1.08 $\pm$ 0.123	4.86 $\pm$ 1.718	73.52 $\pm$ 50.07	18.43 $\pm$ 12.49	59.28 $\pm$ 12.17	272.3 $\pm$ 148.8	261.4 $\pm$ 43.18 <sup>a,b</sup>			

Os dados representam média  $\pm$  SD. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) quando comparadas pelo teste múltipla comparação Kruskal-Wallis e Dunn's. Os grupos sem indução de tumor foram utilizados com solução salina (sham) e extrato na dose de 20mg/kg (FR120 + sem tumor) e um com indução aplicada com solução salina (CTL-), ciclofosfamida (CTL +) e o extrato de acetato de etila *Penicillium purpurogenum* a 4 mg/kg (tumor FR14 + tumor), 20 mg/kg (FR120 + tumor) e 100 mg/kg (FR1100 + tumor).

