

MELISSA DA CRUZ PENHA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA, GENOTÓXICA *IN VITRO* E ANTIMUTAGÊNICA, ANTITUMORAL *IN VIVO* DO HEXAFOSFATO DE INOSITOL E DACARBAZINA

CAMPO GRANDE

2017

MELISSA DA CRUZ PENHA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA, GENOTÓXICA *IN VITRO* E ANTIMUTAGÊNICA, ANTITUMORAL *IN VIVO* DO HEXAFOSFATO DE INOSITOL E DACARBAZINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Doutor: Guido Marks

Co-orientadora: Prof. Doutora: Danielle Boggo

CAMPO GRANDE

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO
MELISSA DA CRUZ PÊNHA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA, GENOTÓXICA *IN VITRO* E ANTIMUTAGÊNICA, ANTITUMORAL *IN VIVO* DO HEXAFOSFATO DE INOSITOL E DACARBAZINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção de título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o conceito _____.

Campo Grande, 11 de setembro 2017

BANCA EXAMINADORA

CONCEITO

Guido Marks – FAMED - UFMS (coordenador)

Rondon Tosta Ramalho - FAMED – UFMS

Lilliam May Grespan Estodutto da Silva – Faculdade Estácio de Sá

Danielle Bogo (suplente) – FACFAN – UFMS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me guiar em todas as etapas da minha vida, permitindo que eu aprenda e evolua espiritualmente. Aos meus pais, José Mauro e Dirce, que tanto me apoiaram nessa caminhada, com paciência, amor e carinho, sem eles eu nada seria, obrigada pelos valores que vocês me passaram e por me ajudarem sempre a evoluir como pessoa, como profissional e como espírito. Ao meu noivo Mauricio, que por vezes envolvi nos meus estudos. A minha irmã e meu afilhado, Thais e Arthur, que tanto foram pacientes com a minha ausência.

Ao meu orientador, Professor Doutor Guido Marks, por ter me aceito.

A minha co orientadora, Professora Doutora Danielle Boggo que sempre me apoiou e não me permitiu desistir, e que mesmo diante de várias dificuldades esteve presente, com uma palavra de carinho e conhecimento.

A professora Doutora Zaira Guterres, que me apoiou em momentos difíceis e sempre esteve disponível para ajudar e ensinar com paciência, carinho e incentivo, também pela parceria e ajuda em estudos genotóxicos. Serei eternamente grata.

A Magalli Costa Barbosa Lima e Silva, companheira de experimentos e que sempre foi um ombro amigo e uma fonte de conhecimento, muito obrigada.

Às colegas do laboratório Caroline Alexandrino, Camilla Nantes, Lana Herman, Kamyla Barbosa que sempre tiveram uma palavra amiga e me ajudaram inúmeras vezes.

Às amigas Beatriz Ursinos Catelan Schneider e Karen Schmitt que me apoiaram, incentivaram e ajudaram.

Aos médicos oncologistas Dr. Eulálio Costa por seu apoio a minha pesquisa e Dr. Henrique Ascenço por compartilhar seus conhecimentos e que me ajudaram muito.

À professora Doutora Maria de Fátima, por ter me recebido em seu Laboratório de Cultura Celular e ter auxiliado no desenvolvimento desse estudo.

À Professora Doutora. Mônica Cristina Toffoli Kadri, por quem tenho um carinho muito grande e que me recebeu no Laboratório de Farmacologia e Inflamação.

Ao Técnico Valter Silva, do Laboratório de Farmacologia e Inflamação que me ajudou sempre no tratamento dos animais, com paciência e atenção.

À Prof^a Dr^a Luciane Candeloro, pela parceria e ajuda com os estudos histopatológicos.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pelo financiamento do Projeto de Pesquisa e à CAPES pelo apoio financeiro com a bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e aos professores vinculados a ele.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho muito obrigada.

Ao meu avô João, que sempre me incentivou e hoje guia e ilumina meus passos lá de cima.

“A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos, mesmo quando todos dizem que ele é impossível”

Cora Coralina

RESUMO

O hexafosfato de inositol (IP6) é um carboidrato presente naturalmente em grãos integrais e tem comprovada ação anticâncer para vários tipos de tumor. Este estudo avaliou os efeitos antiproliferativo, genotóxico *in vitro* e efeitos antimutagênico e antitumoral *in vivo* do IP6 isolado e associado a dacarbazina (DTIC). O ensaio de citotoxicidade foi realizado em células de melanoma murino (B16F10) e linhagem normal (NIH/3T3) por meio do método do corante sulforrodamina B. Foi encontrada GI₅₀ de 2,50 mM em células B16F10 e 1,25mM em células NIH/3T3 para o IP6 e GI₅₀ de 6 µM e 3 µM para dacarbazina respectivamente. Ambos compostos apresentaram índice de seletividade de 0,5. Para o índice de combinação (IC) foram utilizadas 4 concentrações de IP6 (1,25mM, 0,6mM, 0,3mM e 0,15mM) e 3 de DTIC (3 µM, 1,5 µM e 0,75 µM) em monoterapia e associadas entre si. O cálculo do IC ocorreu por meio do *software* Compusyn. Todas as associações realizadas apresentaram sinergismo (IC<1). A avaliação da genotoxicidade foi realizada com o ensaio do Cometa *in vitro* com coloração de prata nas concentrações de IP6 de 2,5mM e 0,6mM, DTIC 6µM e 1,5µM e IP6 0,6mM + DTIC 1,5µM. O fármaco DTIC apresentou genotoxicidade nas concentrações testadas. O IP6 não apresentou genotoxicidade e sua associação DTIC 1,5 µM promoveu redução da genotoxicidade. Para verificar a atividade mutagênica e antimutagênica foi realizado ao ensaio do SMART com asas de *Drosophila melanogaster* nos cruzamentos padrão (ST) e de alta biotativação (HB) com IP6 0,5 mM, 1 mM e 2 mM, DTIC 0,01 mM, 0,02 mM e 0,04 mM e DTIC 0,02 mM associada ao IP6 nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 2 mM. A DTIC apresentou mutagenicidade em todas as concentrações no cruzamento ST. O IP6 não apresentou atividade mutagênica em ambos os cruzamentos e quando associado a dacarbazina apresentou atividade antimutagênica. A avaliação antitumoral *in vivo* ocorreu através do modelo experimental de melanoma murino em camundongos BALB/c (IP6 gavagem 100mg/kg, DTIC 50mg/kg, DTIC 25mg/kg e IP6 gavagem 100mg/kg + DTIC 25mg/kg). A administração de IP6 via gavagem e DTIC 25mg/Kg i.p. reduziu 70% do peso tumoral. Os resultados indicam que, tanto no modelo *in vitro* quanto no *in vivo* de melanoma murino, os compostos associados apresentam atividade antiproliferativa, antimutagênica e antitumoral.

Palavres chave: hexafosfato de inositol, genotoxicidade, antimutagenicidade, efeito antitumoral, melanoma murino, dacarbazina.

ABSTRACT

Inositol hexaphosphate (IP6) is a naturally occurring carbohydrate in whole grains and has proven anticancer action for various types of tumor. This study evaluated the antiproliferative, genotoxic effects *in vitro* and antimutagenic and antitumor effects *in vivo* of IP6 isolated and associated with dacarbazine (DTIC). The cytotoxicity assay was performed on murine melanoma cells (B16F10) and normal cells (NIH/3T3) by the sulforhodamine B dye method. In B16F10 was found GI_{50} 2.50 mM and 1.25mM in NIH/3T3 cells for IP6 and GI_{50} of 6 μ M and 3 μ M for dacarbazine respectively. Both compounds had a selectivity index of 0.5. For the combination index (CI), 4 concentrations of IP6 (1.25mM, 0.6mM, 0.3mM and 0.15mM) and 3 of DTIC (3 μ M, 1,5 μ M and 0,75 μ M) were used associated with each other. The calculation of the IC was performed using Compusyn software. All associations performed showed synergism (CI <1). Genotoxicity evaluation was performed with the *in vitro* silver-stained Comet assay at the concentrations of IP6 of 2.5mM and 0.6mM, DTIC 6 μ M and 1.5 μ M and IP6 0.6mM + DTIC 1.5 μ M. The DTIC drug showed genotoxicity at the concentrations tested. IP6 did not show genotoxicity and its association with DTIC 1.5 μ M promoted reduction of genotoxicity. To verify the mutagenic and antimutagenic activity, the SMART assay was performed with the *Drosophila melanogaster* wings at standard (ST) and high biotivation (HB) crosses at 0.5 mM, 1 mM and 2 mM of IP6 and 0.01 mM, 0.02 mM and 0.04 mM of DTIC and 0.02 mM DTIC associated with IP6 at concentrations of 0.5 mM, 1 mM and 2 mM. The DTIC showed mutagenicity at all concentrations at the ST cross. IP6 did not present mutagenic activity in both crosses and when associated with dacarbazine showed antimutagenic activity. The *in vivo* antitumor evaluation was performed through the experimental model of murine melanoma in BALB/c mice (IP6 gavage 100mg/kg, DTIC 50mg/kg, DTIC 25mg/kg and IP6 gavage 100mg/kg + DTIC 25mg/kg). Administration of IP6 via gavage and DTIC 25mg/kg i.p. reduced 70% of tumor weight. The results indicate that in both, the *in vitro* and *in vivo* murine melanoma models, the associated compounds show antiproliferative, antimutagenic and antitumor activity.

Key words: inositol hexaphosphate, genotoxicity, antimutagenicity, antitumor effect, murine melanoma, dacarbazine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios da diferenciação celular na formação do câncer	20
Figura 2: Tipos de células que originam o câncer de pele.	22
Figura 3: ABCD das pintas e alterações indicativas de malignidade.....	23
Figura 4: Estrutura química do inositol hexafosfato.....	26
Figura 5: : Mecanismo de ação da dacarbazina.....	31
Figura 6: Representação do princípio do Teste do Cometa	32
Figura 7: Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	34
Figura 8: Foto de microscopia eletrônica demonstrando os pelos selvagem (a), mwh (b) e flr3 (c)	35
Figura 9: Representação dos tipos de manchas mutantes no teste SMART. Destaque para os tricomas em aumento de 400x	35
Figura 10: Roteiro do estudo para avaliação do potencial citotóxico, genotóxico, mutagênico e antimutagênico do inositol hexafosfato isolado e em associação com a dacarbazina.....	38
Figura 11: Perfil de análise para classificação dos cometas. Classe 0 – a; Classe 1 – b; Classe 2 – c; Classe 3 – d.....	45
Figura 12: Média e desvio padrão da atividade antiproliferativa das amostras em linhagem B16F10, expostas a diferentes concentrações de cada amostra por 48 horas. CN: controle negativo; DXR: doxorubicina; DTIC: dacarbazina; IP6: inositol hexafosfato.	50
Figura 13: Média e desvio padrão da atividade citotóxica das amostras em linhagem 3T3, expostas a diferentes concentrações de cada amostra por 48 horas. CN: controle negativo; DXR: doxorubicina; DTIC: dacarbazina; IP6: inositol hexafosfato.....	50
Figura 14: Média e desvio padrão da viabilidade celular em linhagem celular B16F10 das concentrações em monotratamento de IP6 e DTIC em 48 horas.	52
Figura 15: Média e desvio padrão médio da viabilidade celular em linhagem celular B16F10 das concentrações associadas de IP6 e DTIC em 48 horas.	52
Figura 16: Gráfico do Índice de Combinação (IC) dos compostos DTIC e IP6 nas concentrações associadas em células B16F10 e seus respectivos índices. IC>2 antagonismo; IC=1 efeito aditivo; IC<1 sinergismo.....	53

Figura 17: Foto dos pelos das asas após os tratamentos. a) pelo selvagem, tratamento com IP6, b) mancha *mwh*, tratamento DTIC, c) mancha *flr³*, tratamento DTIC d) mancha gêmea, *mwh* e *flr³*, tratamento DTIC.....56

Figura 18: Efeito antitumoral do tratamento com IP6, DTIC e IP6+DTIC em modelo experimental murino. em relação ao peso dos nódulos após o tratamento com DTIC 50mg/kg (Controle positivo), IP6 100 mg/kg, DTIC 25mg/Kg e IP6 100 mg/kg+DTIC 25mg/Kg.60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ampliação de margem para excisão de melanoma.....	24
Tabela 2: Custo do tratamento com Nivolumabe versus Dacarbazina e o déficit financeiro em relação ao valor de APAC.....	28
Tabela 3: Valores de GI50 da DTIC e IP6 para as linhagens NIH/3T3 e B16F10 e seu índice de seletividade.	51
Tabela 4: Associações das concentrações utilizadas para inibição do crescimento e índice de combinação.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5: Média de dano obtidos com o teste do cometa em células B16F10 após tratamento com IP6 2,5 mM, IP6 0,6 mM, DTIC 5 µM, DTIC 1,5 µM e IP6 0,6 mM associado a DTIC 1,5 µM.....	55
Tabela 6: Freqüência de manchas mutantes nas asas de descendentes marcados trans-heterozigotos (<i>mwh/flr³</i>) de <i>D. melanogaster</i> usando cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com IP6.....	57
Tabela 7: Freqüência de manchas mutantes nas asas de descendentes marcados trans-heterozigotos (<i>mwh/flr³</i>) de <i>D. melanogaster</i> usando cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com DTIC.....	58
Tabela 8: Freqüência de manchas mutantes nas asas de descendentes marcados trans-heterozigotos (<i>mwh/flr³</i>) de <i>D. melanogaster</i> usando cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com IP6 e DTIC.	59
Tabela 9: Peso inicial e final dos animais dos grupos experimentais.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NIH/3T3	Linhagem Celular de fibroblasto murino
APAC	Autorização De Procedimento De Alta Complexidade
B16F10	Linhagem Celular de melanoma murino
cm	centímetros
CN	Controle Negativo
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTIC	Dacarbazina
DXR	Doxorrubicina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Medicamentos e Alimentos)
GI ₅₀	Inibição do crescimento de 50% das células (<i>Growth inhibition of 50%</i>)
HB	<i>High bioactivation</i> (Cruzamento de alta bioativação)
INCA	Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva
IP6	Hexafosfato de inositol
LDH	Lactato Desidrogenase
LMP	<i>Low Melting Point</i> (Baixo Ponto de Fusão)
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/m ²	Miligrama por metro quadrado
MITC	Metiltriazenoimidazol Carboxamida
mm	milímetros
MOC	Manual de Oncologia Clínica

NCI	<i>National Cancer Institute</i> (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América)
NMP	<i>Normal Melting Point</i> (Ponto de Fusão Normal)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão salina fosfato)
PET	Tomografia Por Emissão De Póstrons
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i> (Fosfoinosítide 3-quinases)
PIs	Fosfoinosítides
PTPI	<i>Phosphatidylinositol transfer protein</i> (Proteína de transferência de fosfatidilinositol)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas ao oxigênio)
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SMART	<i>Somatic Mutation and Recombination test</i> (Teste de Mutação e Recombinação Somáticas)
SRB	Sulforrodamina B
ST	<i>Standard cross</i> (Cruzamento padrão)
T0	Tempo zero
TC	Tomografia Computadorizada
TCA	Ácido tricloroacético
TMZ	Temozolomida
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
µg/mL	Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1	Introdução	17
2	Revisão Bibliográfica.....	19
2.1	O câncer.....	19
2.1.1	O Câncer de Pele	21
2.2	Produtos Naturais.....	24
2.2.1	Inositol Hexafosfato (IP6)	25
2.3	Tratamento e Custo.....	27
2.4	Mutagênese	29
2.4.1	Ensaio do Cometa	32
2.4.2	SMART	33
3	Objetivos	37
3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos Específicos	37
4	Materiais e Métodos.....	38
4.1	Amostras	38
4.2	Roteiro experimental	38
4.3	Avaliação da atividade anticâncer <i>in vitro</i> dos compostos	38
4.3.1	Cultura de células	38
4.3.2	Preparo das amostras	39
4.3.3	Teste de citotoxicidade	40
4.3.4	Índice de Seletividade (IS).....	41
4.3.5	Índice de Combinação	41
4.3.6	Teste Cometa	42
4.4	Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica <i>in vivo</i>	45
	4.4.1 Teste Para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)	45
4.5	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	46
4.5.1	Modelo experimental de melanoma murino	46
5	Aálise estatística	48
6	Resultados	49
6.1	Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	49

6.2	Índice de Combinação.....	53
6.3	Teste do Cometa <i>in vitro</i>	54
6.4	Teste Para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) ..	55
6.5	Modelo experimental de melanoma murino	60
7	Discussão.....	62
8	Conclusão	65
9	Referências	67
	ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal De Mato Grosso do Sul- UFMS.....	78
	ANEXO B – Artigo submetido à Revista Acta Cirurgica Brasileira . Erro! Indicador não definido.	
	ANEXO C – Tabelas complementares	80

1 INTRODUÇÃO

O câncer ou neoplasia é um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado das células. As neoplasias podem ter origem em qualquer tecido do corpo e sua intensa proliferação pode levar a invasão de tecidos adjacentes e/ou distantes (WHO, 2017). A proliferação descontrolada dessas células pode ocorrer de maneira rápida, agressiva e de difícil controle, característica de tumores malignos, ou podem ocorrer de forma lenta e restrita a um local e são denominados tumores benignos. As causas para o surgimento dos cânceres são variadas, podendo estar relacionadas a fatores intrínsecos, como o genético, fatores extrínsecos como o meio ambiente, hábitos e costumes socioculturais estando normalmente esses fatores inter-relacionados (INCA, 2015).

O melanoma é um tipo de câncer que tem origem nos melanócitos (SLINGLUFF; *et al.*, 2011) e embora sua incidência seja pequena, com previsão de menos de 6 mil casos no biênio 2016/2017 no Brasil, sua elevada letalidade o torna um problema de saúde pública (INCA, 2015).

Recentemente novas drogas receberam o registro da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no Brasil, porém o custo elevado dessas medicações torna o acesso ao tratamento um desafio (BRASIL, 2017a; BOTTON, 2016). A dacarbazina (DTIC) é o medicamento de escolha no tratamento do melanoma metastático pelo Sistema Único de Saúde (SUS), porém a sobrevida global média é de apenas 10,8 meses associada a toxicidade e efeitos colaterais (BRASIL, 2013; LONG, *et al.*, 2015).

Os produtos naturais e seus análogos são uma fonte de fármacos anticâncer, sendo que parte dos medicamentos utilizados no tratamento de neoplasias teve como origem uma fonte natural (NEWMAN; CRAGG, 2012). O hexafosfato de inositol (IP6) é um tipo de carboidrato presente em cereais, grãos integrais e leguminosas (VUCENIK; SHAMSUDDIN, 2003; FU *et al.* 2016) e possui atividade antioxidante (VUCENIK; SHAMSUDDIN, 2006; BHOWMIK; *et al.*, 2017; FOSTER, *et al.*, 2017) e anticâncer demonstrada para diversos tipos de câncer como colorretal (YU, *et al.*, 2017; LIU, *et al.*, 2015), mama (BAČIĆ, *et al.*, 2010), próstata (ZHU; YUN; JIU, 2014), melanoma (WAWSZCZYK; *et al.*, 2015) entre outros.

Com o objetivo de contribuir com as pesquisas de agentes anticancer e a redução da toxicidade dos tratamentos já existentes o presente trabalho avaliou a atividade antiproliferativa, o índice de combinação e a genotoxicidade do IP6 e DTIC em células de melanoma murino (B16F10), a antimutagenicidade em *Drosophila melanogaster* e a atividade antitumoral em modelo experimental murino.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O câncer

Cerca de 8,2 milhões de pessoas morrem em decorrência de câncer todos os anos, representando 13% das mortes no mundo (WHO, 2017). A maior incidência de câncer ocorre nos países em desenvolvimento, estão previstos mais de 7 milhões de novos casos no ano de 2020 em países com médio ou baixo índice de desenvolvimento humano (IDH), esse valor corresponde a quase 45% dos casos diagnosticado e 54% das mortes causadas pelo câncer no mundo. Para o Brasil são esperados mais de 550 mil casos e aproximadamente 300 mil mortes para esse mesmo ano (FERLAY; *et al.*, 2015; WHO, 2017). Segundo dados do DATAPREV mais de 200 milhões de reais foram gastos no ano de 2015, entre auxílio-doença e aposentadoria por invalidez que esteja relacionada a algum tipo de neoplasia. Esses dados demonstram o impacto econômico gerado no tratamento dessa doença (BRASIL, 2017a).

No ano de 2015, somente no Brasil mais de 200 mil pessoas morreram em decorrência de algum tipo de neoplasia, dentro desse quadro mais de 24 mil pessoas desenvolveram câncer e foram a óbito devido a fatores relacionados à alimentação (IHME, 2015). Uma dieta rica em frutas, verduras, grãos integrais, cereais e leguminosas e pobres em alimentos prontos para consumo e bebidas açucaradas poderia prevenir cerca de 3,5 milhões de novos casos de câncer no mundo por ano. Esse hábito associado ainda à prática regular de atividade física e manutenção do peso corporal adequado poderia prevenir 33% dos casos de neoplasias de próstata, mama, colo do útero, pulmão, cólon, reto, estômago, cavidade oral, laringe, bexiga e esôfago (INCA, 2015).

As células normais possuem crescimento controlado através de fatores sinalizadores que mantem a homeostase celular, enviando sinais para divisão, crescimento e inibição da proliferação, porém as células tumorais degradam ou inibem esses sinais e adquirem a capacidade de se multiplicar desordenadamente (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O câncer maligno possui como características proliferação rápida, agressiva, com invasão de tecidos adjacentes e de difícil controle, já os tumores benignos são restritos a um local e ocorrem de forma lenta (INCA, 2015), embora algumas vezes possam apresentar grande volume, quando

removidos não voltam a se proliferar (NCI, 2017). Esses tumores possuem características semelhantes às células do tecido que lhe deu origem, já os tumores malignos apresentam células de tamanhos e formatos irregulares e diferentes do tecido que lhe deu origem (PRADO, 2014). As células neoplásicas possuem a habilidade de estimular células normais a produzirem novos vasos que irão fornecer nutrientes e oxigênio para o desenvolvimento e sobrevivência do tumor (NCI, 2017).

A hiperplasia é um tipo de proliferação celular acelerada, que possui características normais a nível celular, já a displasia além da intensa proliferação celular, tem presença de células alteradas morfológicamente, característica semelhante ao câncer. A displasia, quando não tratada, pode se desenvolver e se transformar em neoplasia, primeiramente denominada *in situ*, ou seja, localizada e contida em um local não comprometendo tecidos adjacentes, mas quando não tratada pode evoluir para câncer invasivo, com habilidade de infiltração e metástase (Figura1) (NCI, 2017).

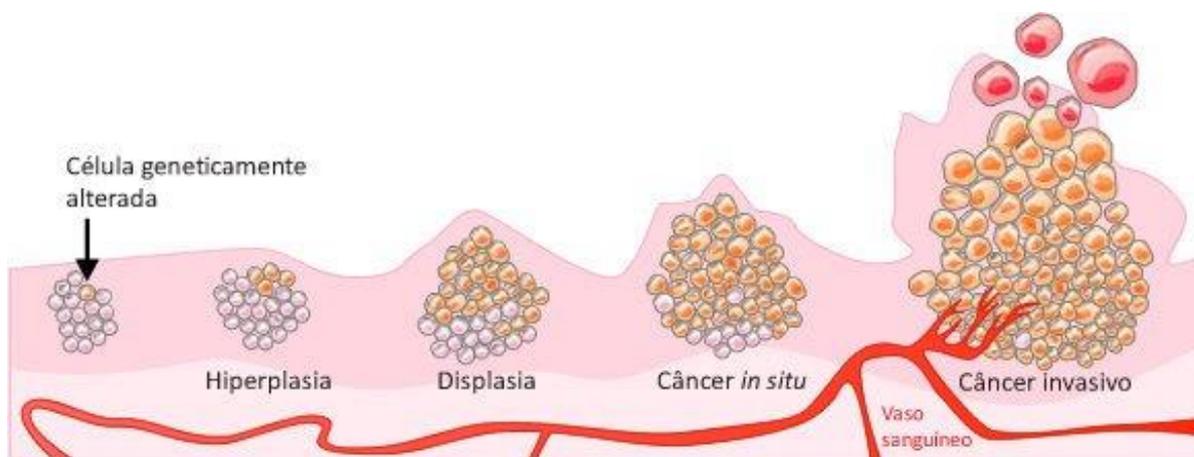


Figura 1: Estágios da diferenciação celular na formação do câncer. Fonte: INCA, ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2011.

O diagnóstico de câncer pode ser realizado através de exames de sangue, imagem e/ou através de biópsia. Dessa forma é possível analisar o grau de invasão tecidual, o comprometimento de linfonodos e a presença ou não de metástases. O estadiamento é realizado por meio do sistema TNM (*Tumor Node Metastasis*) e tem escala de I (prognóstico favorável) a IV (prognóstico desfavorável), onde a letra T representa o tumor primário, N o comprometimento ou não de linfonodos e M a

presença ou ausência de metástases, sendo ele fator diretamente relacionado ao prognóstico da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Os tratamentos podem ocorrer através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo e imunoterapia (INSTITUTO ONCOGUIA, 2017). Após o estadiamento é possível definir a abordagem e a conduta adequada para cada tipo de câncer. O tratamento embora essencial pode ser limitado devido a toxicidade dos medicamentos. Apesar dos avanços da última década em relação ao tratamento oncológico, ainda há tipos de câncer com baixo índice de sobrevida, o que indica a necessidade do desenvolvimento de novas terapias (NCI, 2017; COSTA-LOTUFO; *et al.*, 2010).

2.1.1 O câncer de pele

O câncer de pele pode ser classificado como não melanoma e melanoma. O tipo não melanoma é o mais frequente entre todos os tipos de câncer, somente para 2016/2017 estavam previstos mais de 175 mil casos no Brasil, o que corresponde a aproximadamente 30% de todos os casos de câncer. Embora os números sejam alarmantes o câncer de pele do tipo não melanoma possui baixa taxa de mortalidade e alto índice de cura (INCA, 2015). Os tipos mais comuns são carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas ou epidermoide, sendo o primeiro representando 80% dos casos diagnosticados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Por outro lado o câncer de pele melanoma possui baixa incidência, mas alta mortalidade, cerca de 30% dos casos (FERLAY; *et al.*, 2015). No mundo a taxa de mortalidade é de 0,76 a cada 100.000 habitantes, já no Brasil essa taxa sobe para 0,83, um aumento de quase 10% com relação a taxa mundial (BRASIL, 2014).

A diferença entre o câncer não melanoma e melanoma está na célula que lhe deu origem, o melanoma se origina nos melanócitos, já o não melanoma geralmente tem origem nas células basais e escamosas (Figura 2). O carcinoma basocelular tem origem nas células basais presentes na camada inferior da epiderme, normalmente ocorre em áreas expostas a incidência solar, como cabeça e pescoço e raramente invade tecidos adjacentes, porém se não tratado pode evoluir e apresentar metástase óssea. O carcinoma de células escamosas ou

epidermoide apresentam certo grau de diferenciação histológica da célula que lhe deu origem. Esse tipo de câncer aparece com maior incidência em áreas expostas a radiação solar como rosto, orelha, pescoço, lábios e possui uma capacidade invasiva maior quando comparado ao carcinoma basocelular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

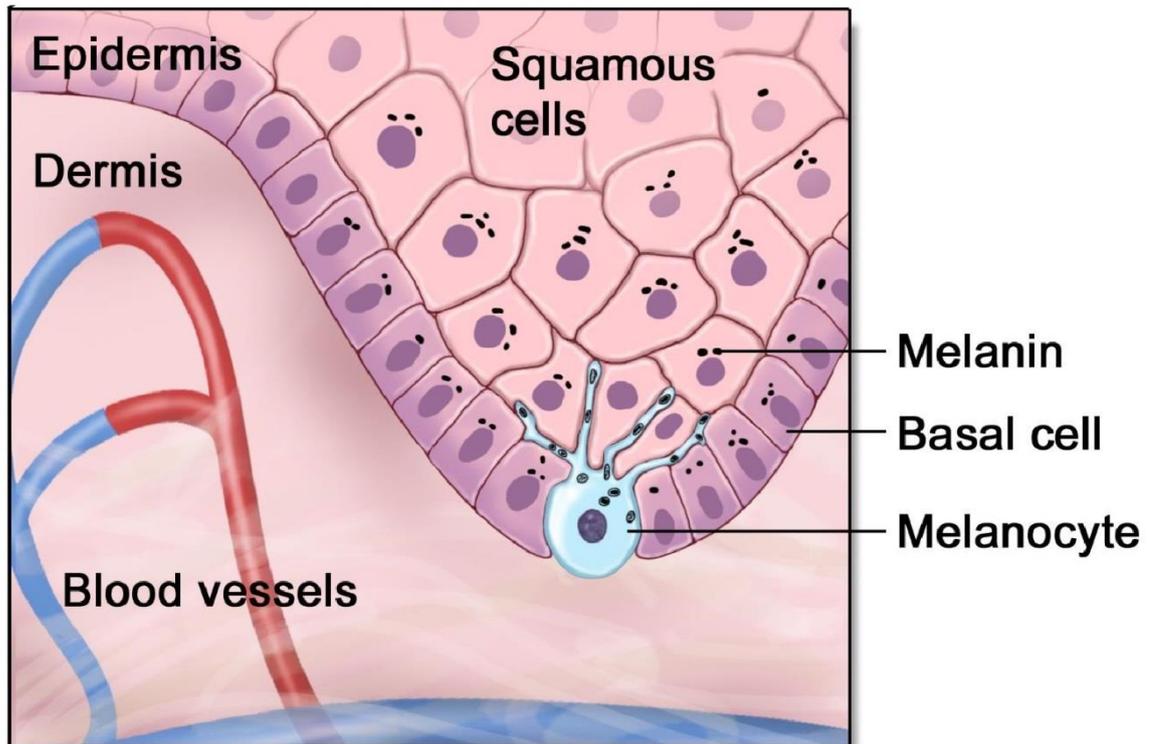


Figura 2: Tipos de células que originam o câncer de pele. Fonte: NCI, 2017. Acesso em: 10 jul. 2017.

O melanoma tem origem nos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina, e se encontram na camada inferior da epiderme. O melanoma possui capacidade invasiva e metastática maior que os outros tipos de câncer de pele, podendo ocorrer em qualquer parte do corpo, sendo mais comum no tronco para os homens e nas pernas para as mulheres (KONRAD, *et al.*, 2011; ALMEIDA, *et al.*, 2014; PINTO, *et al.*, 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; INCA 2015; NCI, 2017). A maior incidência desse tipo de câncer está relacionado principalmente a exposição solar (raios UV), a pessoas com fototipos 1 e 2 na classe de Fitzpatrick, histórico de queimaduras solar na infância, histórico familiar ou pessoal de melanoma, sistema imunológico comprometido, idade, presença de

nevus e certos tipos de mutação genética (MOREIRA, *et al.*, 2014; NCI, 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017;).

O prognóstico do melanoma está diretamente relacionado ao estadiamento. Nos Estados Unidos a taxa de sobrevivência em 5 anos após diagnóstico, foi de 98,5% para carcinoma *in situ* e de apenas 19,9% para estágios mais avançados e com metástase entre os anos de 2007 e 2013 (NCI, 2017). Devido a esse fator os dermatologistas recomendam uma regra descrita como ABCD das pintas para identificação precoce do melanoma, a fim de verificar as alterações indicativas de malignidade (Figura 3) (INSITUTO ONCOGUIA, 2017).



Figura 3: ABCD das pintas e alterações indicativas de malignidade. Fonte: Hospital Daher, 2013. Acesso em: 12 jul. 2017.

A letra A representa a assimetria, ou seja, passando um traço ao meio, os lados se correspondem ou não simetricamente, o B representa a borda, se regular ou assimétrica, o C a cor, se tom único ou mais de um tom presente e D o diâmetro, se menor ou maior que 6 mm (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2017).

O melanoma estadiado pelo método TNM pode ter sua classificação acompanhada das letras a e b, que indicam ausência ou presença de lesão ulcerada, fator que impacta no prognóstico do câncer de acordo com o Comitê

Conjunto Americano de Câncer (AJCC) (LÉON; *et al.*, 2013; INSTITUTO ONCOGUIA, 2017).

Para o tratamento do melanoma é recomendado excisão cirúrgica da lesão com ampliação da margem, sempre que possível (Tabela 1). Nos estadiamentos I e II é realizado o acompanhamento com exames de sangue, para avaliação da função hepática, coagulação, lactato desidrogenase (LDH) e de imagem, como o raio X. Já para os casos de estadiamento III e IV devem ser realizados exames complementares, como tomografia computadorizada (TC) ou tomografia por emissão de pósitrons (PET) para verificação do comprometimento de nódulos ou metástase. Com a presença de metástase o tratamento indicado é paliativo com quimioterapia, imunoterapia ou terapia alvo (LÉON; *et al.*, 2013).

Tabela 1: Ampliação de margem para excisão de melanoma. Fonte: Autor

Espessura da lesão	Ampliação de margem
<i>In situ</i>	0,5 mm
≤ 1 mm	1 cm
1,01 – 2 mm	1 – 2 cm
2,01 – 4 mm	2 cm
> 4 mm	2 cm

O estadiamento IV apresenta pior prognóstico, sendo a média de sobrevida global de 8 a 12 meses e com taxa de sobrevivência superior a 5 anos de apenas 10% (GARBE, *et al.*, 2011). Esses dados retratam a necessidade de descoberta de novas terapias e desenvolvimento de programas para o diagnóstico precoce (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

2.2 Produtos naturais

Os produtos naturais são uma fonte de novos fármacos. Nos anos de 1981 a 2014, aproximadamente 50% das novas drogas anticâncer aprovadas para comercialização, eram de origem natural ou derivada de um produto natural (GULLO, *et al.*, 2006; NEWMAN; CRAGG, 2016). O medicamento Taxol®, derivado

da *Taxus brevifolia*, vimblastina e vincristina, ambas derivada da Vinca são exemplos de fármacos utilizados no tratamento do câncer e que tiveram como fonte uma origem natural (DEWICK, 2009; BRANDÃO, *et al.*, 2010).

Contudo, o interesse na descoberta de novas drogas de origem natural vem reduzindo nos últimos anos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Um dos motivos apontados para esse decréscimo é o potencial de novas drogas-alvo, medicamentos que interagem a nível molecular e com maior seletividade (RISHTON, 2008). Por outro lado o custo para o desenvolvimento desses fármacos é alto, entre a pesquisa, desenvolvimento e aprovação pela FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos, o valor ultrapassa 1 bilhão de dólares. O custo elevado no desenvolvimento reflete no valor final do medicamento o que onera os planos de saúde. Com isso, o reajuste nos valores das operadoras de saúde torna o acesso a esse serviço um privilégio de poucos, fazendo que parte da população antes assistida pelo serviço particular, passe a utilizar o SUS. A consequência dessa migração é a sobrecarga do sistema público de saúde e sua inefetividade (GARBER; GOLDMAN, 2004; RISHTON, 2008; TIEZZI, 2014).

2.2.1 Hexafosfato de inositol (IP6)

O composto hexafosfato de inositol (IP6) é um carboidrato polifosforado presente abundantemente em cereais integrais. Durante anos sua presença nos alimentos foi considerada como antinutriente devido sua capacidade de quelar minerais como ferro, cobre, zinco e cálcio (GRAF; EATON, 1990; BENEVIDES; *et al.*, 2011), porém Prynne e colaboradores (2010) demonstram que a deficiência desses íons associada ao IP6 ocorre somente em dietas com um baixo consumo desses minerais (PRYNNE; *et al.*, 2010).

A molécula do IP6 possui 6 grupos fosfato ligados a uma molécula de inositol (Figura 4). Os grupos fosfatos presentes nas posições 1, 2 e 3 desenvolvem o importante papel de interação com o ferro, impedindo-o de catalisar a reação de formação do radical hidroxila. Essa ação confere a característica antioxidante largamente reconhecida do IP6 por meio da quelação de cátions bivalentes, impedindo a formação de ROS (espécies reativas ao oxigênio)

(VUCENIK; SHAMSUDDIN, 2003). A sua possível aplicação em doenças cardiovasculares se justifica por possuir também ação antiagregante plaquetária e redutora de lipídios (VUCENIK; PODCZASY; SHAMSUDDIN, 1999). O uso do IP6 também vem sendo estudado na prevenção e tratamento do câncer (FU; *et al*, 2016; VUCENIK; SHAMSUDDIN, 2003).

O IP6 é consumido como suplemento alimentar, possui rápida absorção e quando submetido a hidrólise na digestão gástrica origina múltiplas moléculas secundárias que pertencem ao grupo dos fosfoinosítides (PIs). Tais moléculas participam da estrutura molecular da membrana celular e organelas celulares além de múltiplos e importantes processos de regulação celular tais como canais íons, bombas de internalização e extrusão celular, proteína de transferência de fosfatidilinositol (PITP), processos de endocitose e exocitose e controle de processos fisiológicos nucleares. Esses fatores quando desreguladas originam uma multiplicidade de doenças tais como neurodegenerativas, câncer, obesidade, diabetes e imunológicas (BIZZARRI; *et al.*, 2016). As moléculas do grupo dos PIs e enzimas (fosfatases e quinases) participam da via de sinalização de fosfatidilinositol (KANEHISA; GOTO, 2000) e apresentam múltiplas funções na fisiologia, ressaltando o efeito biológico do IP6 em regular a via PI3K inibindo a proliferação celular (BALLA, 2013; THAPA; *et al.*, 2015).

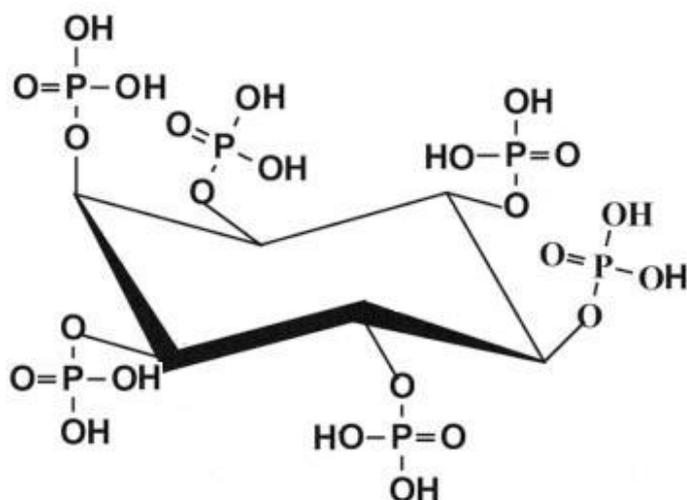


Figura 4: Estrutura química do hexafosfato de inositol. Adaptado de: YU; *et al.*, 2012.

Há mais de uma década estudos demonstram os benefícios a saúde no consumo de IP6 (BAKEWELL, 2006; VUCENIK; SHAMSUDDIN, 2006), como seu importante papel na proliferação, diferenciação e apoptose celular, em estudos *in vitro* (LIU; *et al.*, 2015) a inibição da progressão tumoral *in vivo* em modelos experimentais com animais, incluindo câncer de próstata, mama e colon (ROY; *et al.*, 2009; DINICOLA, S.; *et al.*, 2016). Porém poucos estudos publicados demonstram a ação citotóxica e genotóxica do IP6 em células de melanoma, bem como sua atividade antimutagênica em células normais quando associado a antineoplásicos como a DTIC.

2.3 Tratamento e Custo

Embora nos últimos anos novos medicamentos para o tratamento de melanoma metastático tenham sido descobertos, o custo elevado permanece como fator limitante para pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS). O tratamento é realizado calculando a dose a ser administrada, essas podem ser calculadas de acordo com o peso ou superfície corpórea do paciente. Levando em consideração que a faixa etária com maior incidência de melanoma é de 50 a 80 anos (MOREIRA, *et al.*, 2014) e conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o peso e superfície corpórea média das mulheres e homens brasileiros são de 63,2 Kg e 1,65 e 71,2 Kg e 1,82 respectivamente é possível analisar o custo do tratamento (BRASIL, 2010).

A indicação primária para o tratamento do melanoma maligno metastático, sem mutação para o gene *BRAF*, segundo o Manual de Oncologia Clínica (MOC) é o uso de nivolumabe em monoterapia, quando disponível, com dose de 3 mg/Kg a cada 2 semanas até progressão da doença ou toxicidade (BUZAID; MALUF; LIMA, 2017). A dose por ciclo média para homens é de 213,6 mg e de 189,6 mg para mulheres. As apresentações disponíveis no mercado são frascos de 40mg e 100mg (BRISTOL-MYERS SQUIBB FARMACÊUTICA LTDA, 2017), com um custo de preço fábrica de R\$ 3.113,99 e R\$ 7.839,33 respectivamente (BRASIL, 2017b). Com base nesses valores é possível verificar que o valor médio de cada ciclo, considerando o valor do medicamento, é de R\$18.792,65 para homens e R\$

15.678,66 para mulheres, comum custo mensal de R\$ 37.585,30 e R\$ 31.357,32 para homens e mulheres respectivamente.

Já no âmbito do sistema público de saúde, a recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) e do MOC no caso de indisponibilidade do uso de imunoterapia, para tratamento do melanoma metastático é, dacarbazina 250 mg/m² por 5 dias consecutivos (D1 a D5) ou 1.000 mg/m² em um único dia (D1) a cada 3 semanas, por 4 a 6 ciclos. A dose média calculada para homens é de 1820 mg e 1650 mg para mulheres. A dacarbazina (Dacarb®) está disponível na apresentação de frasco de 200 mg a um custo de R\$ 137,27 (BRASIL, 2017b). O custo médio por ciclo desse tratamento, considerando o valor do medicamento, é de R\$ 1.372,70 e R\$ 1.235,43 e custo total para 6 ciclos de R\$ 8.236,20 e R\$ 7.412,58 para homens e mulheres respectivamente.

O valor ressarcido pelo SUS para o tratamento de melanoma metastático, por meio de Autorização para Procedimento de Alta Complexidade é de R\$1.080,00/mês (SIGTAP, 2017). Dessa forma é possível verificar que há um déficit entre o custo do tratamento com relação ao valor ressarcido, conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Custo do tratamento com Nivolumabe versus Dacarbazina e o déficit financeiro em relação ao valor de APAC. Fonte: Autor.

	Nivolumabe		Dacarbazina	
	Homem	Mulher	Homem	Mulher
Custo/mês	R\$ 37.585,30	R\$31.357,32	1.372,79	1.235,43
Ressarcimento SUS /mês	R\$ 1.080,00			
<i>Déficit</i>	- R\$ 36.505,30	- R\$ 30.277,32	- R\$ 292,79	- R\$ 155,43

Através desse comparativo é possível verificar que o uso da dacarbazina no âmbito do SUS é uma das poucas alternativas para o tratamento do melanoma maligno.

O uso da dacarbazina está indicado não somente em casos de melanoma maligno, mas também de linfoma de Hodgkin, ainda há estudos *off label* para uso

em casos de sarcoma de partes moles, feocromocitoma, carcinoma medular de tireoide e tumor das células da ilhota (BRAGALONE, 2015). É um agente antineoplásico triazeno do tipo ciclo celular não específico e após sua metabolização no fígado pela enzima P450, libera seu metabólito ativo, metiltriazenoimidazol carboxamida (MTIC) que possui ação alquilante. O MTIC metila o DNA nas posições O⁶ e N⁷ da guanina, esses danos quando não reparados podem promover dupla quebra na fita de DNA e apoptose (KONDO; *et al.*, 2010; BRAGALONE, 2015; AL-BADR; ALODHAIB 2016; BUZAID; MALUF; LIMA, 2017).

O dano genético promovido pela dacarbazina é do tipo não seletivo, ou seja, a genotoxicidade ocorre em células neoplásicas e normais. A reversão dessas lesões pode acontecer por meio de enzimas de mecanismos de reparo, porém na sua ausência a falha genética é repassada levando a reações adversas, tais como vômito, alopecia, mielosupressão, náuseas e neutropenia (ETEBARI; JAFARIAN-DEHKORDI; LAME, 2015). A presença de tumores secundários é também um dos efeitos colaterais, e pode ocorrer cerca de 36 a 72 meses após a exposição ao agente alquilante (COLLINS; *et al.* 2009). Esses fatores são por vezes limitantes e ocasionam na redução de dose ou até mesmo a interrupção do tratamento (BRAGALONE, 2015).

A dacarbazina, apesar das baixas taxas de resposta e da falta de evidência na melhora da sobrevida global, continua a ser a principal opção de tratamento em ambientes de saúde mal financiados (BRASIL, 2013; SERRONE; *et al.*, 2000). A associação de compostos a DTIC em busca de sinergismo e redução dos efeitos tóxicos vem sendo realizada por diversos autores em busca de uma melhora na resposta deste fármaco (HARDY, *et al.*, 2015; BAHARARA; *et al.*, 2016; SADHU, *et al.*, 2016; YANG, *et al.*, 2016; VETMA, *et al.*, 2017).

2.4 Mutagênese

Durante as etapas de codificação do DNA ocorrem vários processos que podem levar a replicação incorreta (mutação). Essa mutação pode ser benéfica,

garantindo a variabilidade genética e a evolução das espécies, ou pode ser não benéfica e deletéria. A ocorrência de eventos mutagênicos leva a replicação incorreta do DNA, podendo ou não ser expressa fenotipicamente. As mutações podem ser do tipo espontânea, ocorrendo devido à predisposição genética, idade ou fatores hormonais, ou induzida devido a fatores comportamentais, como tabagismo, alcoolismo, exposição a radiação solar frequente ou ambientais, por agentes físicos, químicos ou biológicos, sendo frequentemente uma associação desses fatores (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013; FERIGOLO; SAGRILLO, 2016).

Agentes mutagênicos são aqueles capazes de causar lesões no DNA. Essas alterações podem ser gênicas através de substituições em uma ou mais bases do DNA ou através de inserção/deleção de nucleotídeos, porém permitindo ainda a transcrição e replicação. Pode ocorrer também a alteração cromossômica estrutural através de duplicação, deleção, translocação e inversão ou cromossômica numérica como euploidias (aumento ou redução do genoma) e aneuploidias (ganho ou perda de um ou mais cromossomos) (LEWIN, 2001; GRIFFITHS *et al.*, 2013).

As alterações genéticas podem levar a carcinogênese, mutagênese, citotoxicidade e inúmeras desordens genéticas (MOSKOWITZ; YIM; CHOCK, 2002). A carcinogênese induzida quimicamente ocorre devido a exposição a agentes que provocam lesões no DNA. Grande parte dos agentes químicos com essa característica, em sua forma natural não danifica o material genético (PINTO; FELZENSSWALB, 2003). Em algumas ocasiões a metabolização dessas substâncias as torna altamente reativas e com potencial genotóxico. Embora a função da enzima P450 seja a biotransformação da substância para eliminação, para alguns desses compostos, a sua metabolização confere um potencial reativo, com capacidade genotóxica (GUENCHEVA; *et al.*, 2003).

O dano genético por vezes é um dos mecanismos de ação de medicamentos para o tratamento do câncer, pois a genotoxicidade induzida leva a morte celular. A dacarbazina e a temozolomida são exemplos de quimioterápicos com esse tipo de ação, porém o dano não atinge somente células neoplásicas. A ação desses compostos em células normais quando não reparado pode ser repassado, ocasionando por vezes tumores secundários e efeitos colaterais indesejáveis

(COLLINS; *et al.* 2009). Os triazenos, classe ao qual pertence a dacarbazina, realizam alquilação em sua maioria na posição N⁷ da guanina, onde cerca de 70% das bases são metiladas. Embora em menor proporção, cerca de 9% das alquilações ocorram no O⁶ da guanina (Figura 5), essa reação é considerada a responsável pelos efeitos citotóxicos e mutagênicos da dacarbazina (ROOS; *et al.*, 2007; BONMASSAR; *et al.*, 2013).

Plummer e colaboradores (2013) com o objetivo de aumentar a taxa de resposta do análogo da DTIC, a temozolomida (TMZ), associaram o fármaco a um inibidor da via de reparo por excisão de base, que é um dos mecanismos de reparo responsável pela desmetilação do O⁶ da guanina. A toxicidade causada por essa associação levou a uma redução de dose do análogo TMZ de 25% a 50% em mais da metade dos pacientes. Embora o estudo tenha demonstrado um aumento da sobrevida em um ano, aproximadamente 20% dos pacientes descontinuaram o tratamento devido à progressão ou toxicidade severa (PLUMMER; *et al.*, 2013).

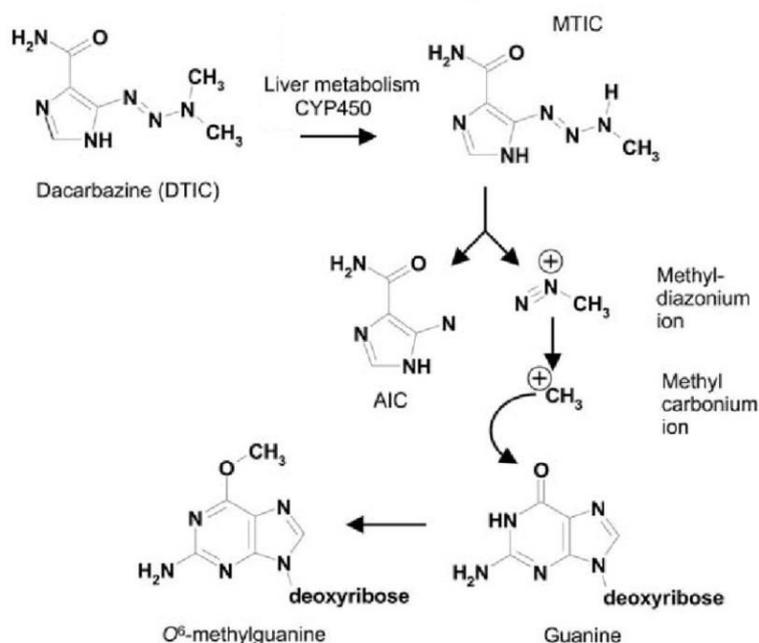


Figura 5: Mecanismo de ação da dacarbazina. Adaptado de: BONMASSAR; *et al.*; 2013.

A recente descoberta de terapias alvo beneficia apenas um subgrupo acometido por essa neoplasia. Devido a esse fator há um interesse na descoberta

de novos agente que melhorem ou aumentem a resposta dos agentes antineoplásicos existentes (PLUMMER; *et al.*, 2013).

2.4.1 Ensaio do Cometa

O Ensaio do Cometa é utilizado para a avaliação da genotoxicidade causada pela exposição celular a determinadas substâncias. É um teste simples, rápido e de fácil execução e que também é utilizado para demonstrar o potencial que algumas substâncias possuem de reparar e/ou proteger o DNA de danos (TICE; *et al.*, 2000).

O ensaio consiste basicamente em englobar as células previamente tratadas em gel de agarose, lisar a membrana e submetê-las a corrente elétrica. Isso fará com que ocorra a migração de DNA livre resultantes de quebras formando uma cauda, que pode ser visualizada através de coloração. As células que não apresentam dano se apresentam em formato arredondado, por outro lado as que foram lesadas possuem uma cauda semelhante a um cometa, correspondendo aos fragmentos de DNA danificado (Figura 6). O dano ao DNA é proporcional ao tamanho da cauda formada (AZQUETA; COLLINS, 2013).

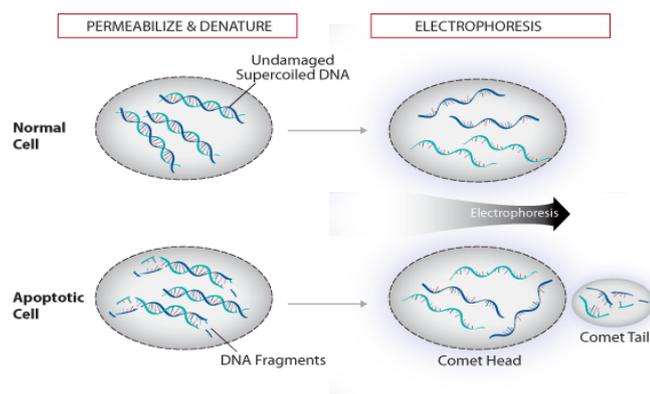


Figura 6: Representação do princípio do Teste do Cometa. Fonte: <<https://www.rndsystems.com/products/single-cell-gel-electrophoresis-assay-cometassay>>. Acesso em: 17 jul. 2017.

O ensaio do cometa avalia alterações genômicas e não as mutações, uma vez que esses danos podem ainda ser reparados através de mecanismos celulares e não acarretar em mutação.

2.4.2 SMART

A identificação de substâncias mutagênicas é de extrema importância, mas igualmente importante é a descoberta de substâncias antimutagênicas. A antimutagenese é um processo pela qual ocorre uma redução da frequência da mutação genética através de mecanismos de reparo (GANCHAROVA; 1993). É possível avaliar o efeito mutagênico e antimutagênico do DNA através de ensaios *in vivo* com o SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) com asas de *Drosophila melanogaster* conhecida como mosca das frutas. Esse ensaio é particularmente eficiente para substâncias que necessitam da ativação através da enzima P450 (GRAF *et al.*, 1984).

O SMART foi descrito primeiramente por Graf e colaboradores. em 1984 e tem como principais vantagens a rapidez (aproximadamente 10 dias, devido ao curto tempo de vida da *D. melanogaster*) (Figura 7), facilidade de reprodução, elevado número de progênie, capacidade de metabolização de substâncias, reprodutibilidade e resultados permanentes (GRAF *et al.* 1984, GRAF; SINGER, 1992; GRAF *et al.*, 1996). O teste consiste na detecção e quantificação da alteração fenotípica dos pelos das asas, caracterizando a perda da heterozigose (ANDRADE *et al.*; 2012).

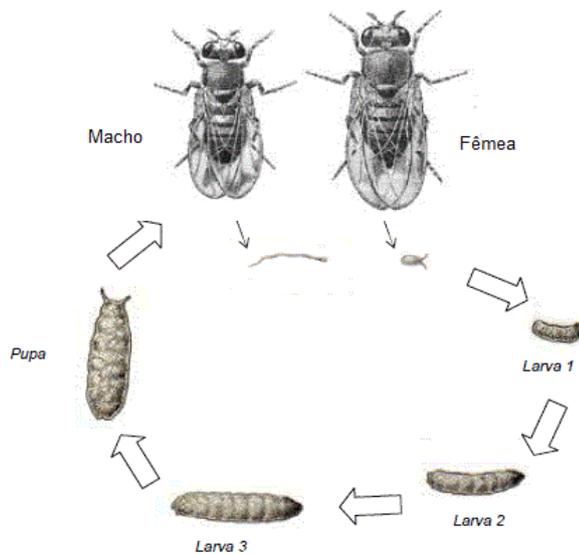


Figura 7: Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. Adaptado de: PALERMO; MUDRY, 2014.

Durante o desenvolvimento da larva sucessivas divisões mitóticas de células somáticas ocorrem, entre elas as células dos discos imaginais que darão origem aos pelos das asas. Para verificar o potencial mutagênico ou antimutagênico, as larvas de terceiro estágio recebem tratamento crônico das substâncias e na presença de evento mutagênico ocorre a expressão fenotípica com alteração no pelo das asas. Caso ocorra uma ação antimutagênica do composto, será expressa a redução dos eventos mutacionais e presença de pelos selvagens (AMORIM, 2016).

Os marcadores responsáveis pela característica dos pelos são recessivos e estão presentes no cromossomo três na forma heterozigótica. A perda da heterozigose causada por mutação ou recombinação durante a mitose, é verificada por meio da alteração do formato e quantidade dos pelos presentes na superfície dorsal da asa, e pode ser verificada através da alteração do fenótipo selvagem (Figura 8-a) para os fenótipos de múltiplos pelos (*mwh*) (Figura-b) e/ou no formato de chama de vela (*flr³*) (Figura 8-c). (GRAF *et al.* 1984).

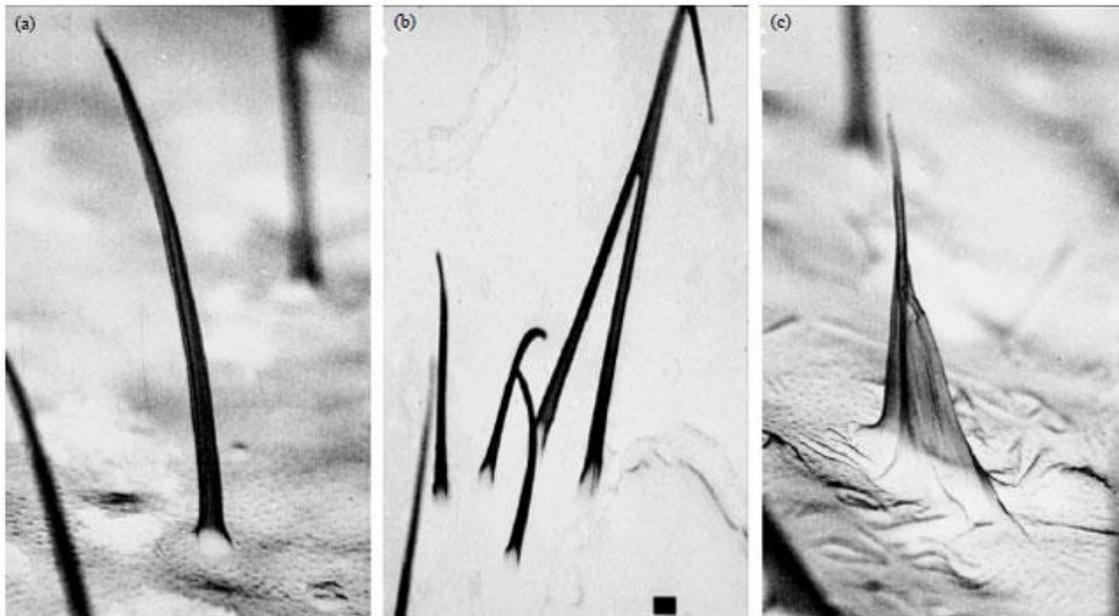


Figura 8: Foto de microscopia eletrônica demonstrando os pelos selvagem (a), *mwh* (b) e *flr³* (c). Fonte: ZAFRED; *et al.*, 2016.

As manchas (mutações) podem ocorrer de forma simples pequena ou simples grande, onde expressam ou pelos múltiplos (*mwh*) ou pelos em formato de chama de vela (*flr³*). Manchas gêmeas, na qual é expresso ambos marcadores em uma única mancha (*mwh* e *flr³*) (Figura 9) ocorre exclusivamente em eventos de recombinação (GRAF *et al.* 1984).

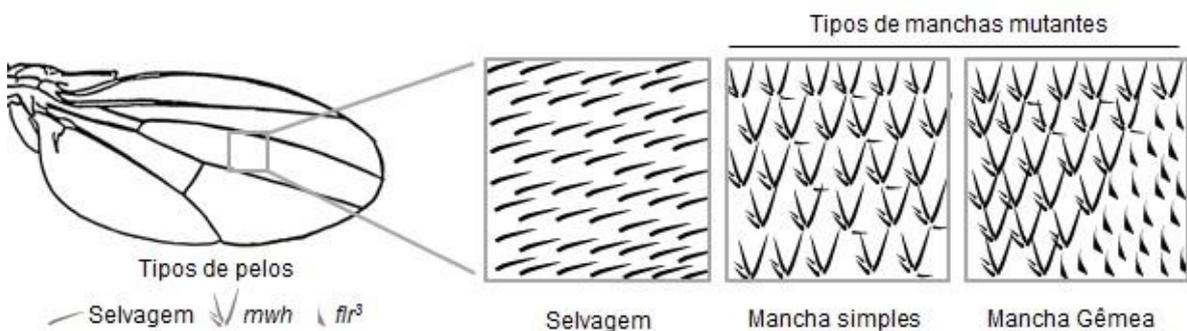


Figura 9: Representação dos tipos de manchas mutantes no teste SMART. Destaque para os tricomas em aumento de 400x. Fonte: FERNANDES, 2012.

O genoma da *D. melanogaster* apresenta uma conservação evolutiva alta, quando comparada ao genoma humano. Essa conservação se deve não apenas as sequências do DNA, mas também as funções gênicas, configurando uma alta homologia genética. Através de análise de proteomas foi verificado que mais de

60% dos 289 genes relacionados a doenças humanas possuem homólogos em *Drosophila* sendo 75% portadores de sequências proteicas similares em ambos organismos (TICKOO; RUSSELL, 2002).

Diversos compostos químicos, dentre eles muitos de origem natural, foram testados por meio do ensaio SMART com as asas de *D. melanogaster*. Este ensaio é importante para detecção de efeitos mutagênicos, antimutagênicos e citoprotetores (FERNANDES, 2012; TASSET-CUEVAS; *et al.*, 2013; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2015; JIMÉNEZ.; *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Estudar a atividade antiproliferativa, genotóxica *in vitro* e antimutagênica, antitumoral *in vivo* do hexafosfato de inositol e dacarbazina.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antiproliferativo do IP6 em linhagem neoplásica (B16F10) e a citotoxicidade em linhagem normal (NIH/3T3);
- Estabelecer o índice de seletividade do IP6;
- Verificar o índice de combinação dos compostos IP6 e DTIC *in vitro* em células B16F10;
- Avaliar o efeito genotóxico do IP6, e associado a DTIC em células B16F10;
- Verificar a atividade antimutagênica do IP6 associado a DTIC *in vivo*;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do IP6 associado a DTIC em modelo experimental de melanoma murino (BALB/c);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

O hexafosfato de Inositol (IP6) foi adquirido da Sigma® (Lote: 123K1413). O fármaco dacarbazina (Evodazin® 200 mg, Evolabis Lote: 09076) foi cedido pelo Dr. Eulálio Costa.

4.2 Roteiro experimental

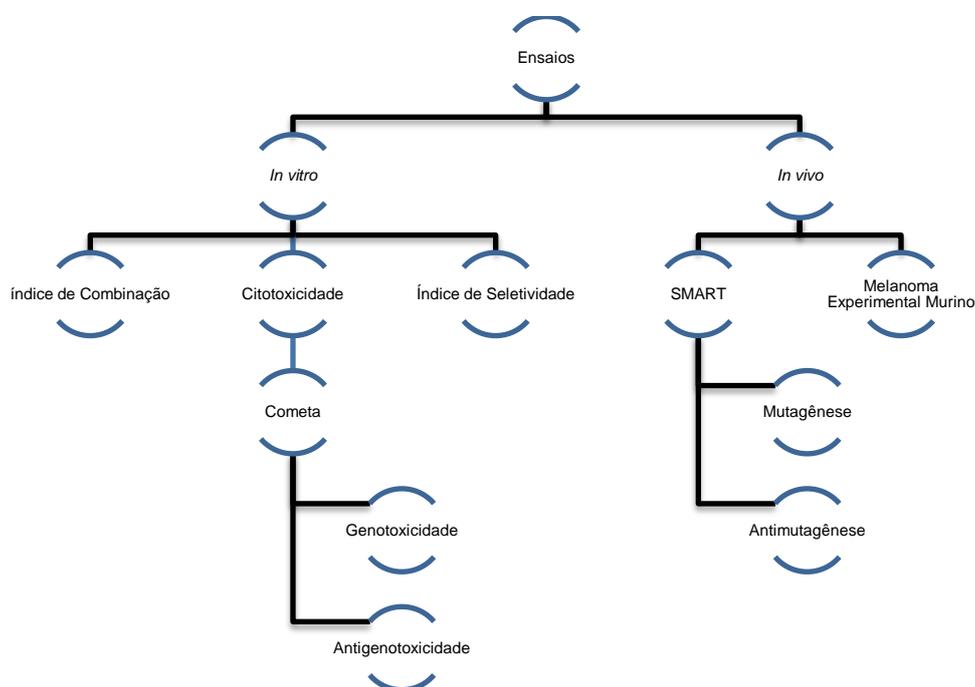


Figura 10: Roteiro do estudo da atividade antiproliferativa, genotóxica *in vitro* e antimutagênica, antitumoral *in vivo* do hexafosfato de inositol e dacarbazina.

4.3 Avaliação da atividade anticâncer *in vitro* dos compostos

4.3.1 Cultura de células

Foram utilizadas as linhagens de B16F10 (ATCC-CRL - 6475, melanoma murino) e NIH/3T3 (ATCC-CRL 1658, fibroblasto murino) adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro para realização do Índice de Seletividade (HOUGHTON *et al.*, 2007), todas as células foram mantidas em nitrogênio líquido.

Para os testes as linhagens celulares foram descongeladas em banho-maria a 37°C (FRESHNEY, 2005), em seguida a suspensão de células foi transferida para um tubo cônico de 15 mL contendo 9 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo antibióticos, Penicilina e Estreptomicina (1%), e Soro Fetal Bovino (SFB) (10%), denominado como meio completo. O tubo foi centrifugado a 1000 rpm (rotações por minuto) por 4 minutos, em seguida o sobrenadante foi aspirado e desprezado. O *pellet* celular foi suspenso com 5 mL de meio completo e transferido para frasco de cultura celular de 25 cm² e acondicionados em incubadora a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂ até que fosse atingida confluência celular de 80%.

Ao atingir a quantidade necessária de células, foi aspirado o meio completo do frasco de cultivo celular e as células foram removidas através da adição de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Os frascos com tripsina foram acondicionados de 1 a 4 minutos em incubadora (37°C, CO₂) até completo desprendimento das células. Em seguida foi realizada a transferência para tubos de fundo cônico de 15 mL, e para inativação da tripsina foi adicionado volume 3 vezes maior de meio completo. A suspensão celular em tubo cônico foi levado para centrífuga a 1000 rpm por 4 minutos, ao final o sobrenadante foi aspirado e descartado. O *pellet* celular foi novamente suspenso em 2 mL de meio completo. A contagem de células suspensas no meio foi realizada em câmara de Neubauer com corante Azul de Tripán, que cora as células não viáveis e que foram excluídas da contagem. A diluição da suspensão celular com corante foi realizada na proporção 1:4 para determinação da quantidade de células por mL e obtenção de uma suspensão com 7500 a 10000 células a cada 100µL.

4.3.2 Preparo das amostras

As amostras foram diluídas em meio de cultura celular (DMEM) imediatamente antes do uso. O IP6 foi diluído na concentração de 20mM e em seguida foi realizada diluição seriada em meio DMEM, sendo utilizadas as concentrações de 1mM, 3mM, 5mM e 7,5mM para determinação da GI₅₀. Para os demais ensaios foram realizadas diluições para obtenção da concentração a ser aplicada. A DTIC foi diluída na concentração de 30µM e em seguida foi realizada

diluição seriada em meio DMEM, sendo utilizadas as concentrações de 4,4 μ M, 5,5 μ M, 6,6 μ M e 7,7 μ M para determinação da GI₅₀. Para os demais ensaios foram realizadas diluições para obtenção da concentração a ser aplicada. A DTIC foi exposta a luz por 1 hora antes da aplicação para ativação (JIN, *et al.*, 2011).

4.3.3 Teste de citotoxicidade

O método colorimétrico utilizado foi o da sulforrodamina B (SRB), que cora as proteínas presente na membrana celular descrito por Skehan e colaboradores (1990). Em placas de 96 poços foi adicionado 100 μ L da suspensão celular e em seguida foram estabilizadas por 24 h a 37 °C na incubadora na presença de 5% de CO₂. Para a placa T₀ a leitura com SRB foi realizada ao final das 24 horas de estabilização. Com as células aderidas, após o período de estabilização, foi adicionada uma alíquota de 100 μ L de cada concentração das amostras-teste, do controle positivo (doxorrubicina) e meio de cultura (controle negativo) às cavidades da placa. Foram utilizadas quatro concentrações de cada amostra-teste, para a DTIC 4,4, 5,5, 6,6 e 7,7 μ M, para o IP6 1, 3, 5 e 7,5 mM e para a doxorrubicina (controle positivo) 0,025; 0,25; 2,5 e 25 μ g/mL sendo cada uma adicionada em três poços (triplicata). Para o controle negativo, as células foram cultivadas somente na presença de meio de cultura, também realizado em triplicata. As placas foram novamente incubadas a 37 °C em presença de 5% CO₂ por 48 horas. Para a realização da coloração com SRB, após as 48 horas o sobrenadante foi aspirado e as células fixadas com ácido tricloroacético (TCA) 20% por 30 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas com água por 5 vezes e deixadas para secar. Então foi adicionado 50 μ L de SRB (Sigma, USA) 0,1% diluído em ácido acético 1%. As placas foram então incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos protegidas da luz. Decorrido os 30 minutos o corante que não se ligou as proteínas de membrana foi removido por meio de lavagem com ácido acético 1% por 5 vezes, ou até que não fosse mais visível a liberação de corante. As placas foram secas e então foi adicionado tampão Trizma Base (10mM, pH 10,5) (Sigma, USA) para solubilizar o corante das células fixadas. As placas foram colocadas em agitação por 20 minutos para dissolução do corante e a leitura

foi realizada em comprimento de onda de 540nm em leitor de microplaca Molecular Devices SpectraMax 190®.

Foram obtidas as leituras das absorvâncias de três ensaios independentes do tempo zero (T0, início da incubação), e após 48 horas de tratamento para o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e amostras-teste (T) em cada uma das concentrações. A porcentagem de crescimento celular (média e desvio padrão) pode ser determinada utilizando a equação $100 \times [(T - T0) / C - T0]$. A concentração que inibiu 50% do crescimento celular (GI₅₀) pode ser determinada por análise de regressão não linear em programa para gráficos e análises de dados (*Origin* Versão 6.0).

4.3.4 Índice de Seletividade (IS)

O IS pode ser verificado através da razão entre o valor da GI₅₀ de cada composto-teste na linhagem de células normais (NIH/3T3) e o valor da GI₅₀ de cada composto na linhagem de células neoplásicas ($IS = GI_{50} \text{ NIH/3T3} / GI_{50} \text{ células neoplásicas}$). O índice de seletividade com valor significativo deve ser maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991). Isso indica que o composto é pelo menos duas vezes mais ativo na linhagem neoplásica do que em células normais.

4.3.5 Índice de Combinação

Para avaliar o índice de combinação do IP6 e DTIC foi analisada a inibição do crescimento de ambos compostos, em monotratamento e em associação, com concentrações inferiores a GI₅₀ da linhagem B16F10 através da leitura realizada por *software Origin* Versão 6.0. As concentrações para a DTIC utilizadas foram 3µM, 1,5µM e 0,75µM e de IP6 1,25mM, 0,6mM, 0,3mM e 0,15mM. As associações foram realizadas conforme a tabela 3.

Tabela 3: Associações das concentrações utilizadas para inibição do crescimento e índice de combinação.

Concentrações de IP6	Concentrações de DTIC
IP6 1,25 mM	DTIC 3 μ M
	DTIC 1,5 μ M
	DTIC 0,75 μ M
IP6 0,6 mM	DTIC 3 μ M
	DTIC 1,5 μ M
	DTIC 0,75 μ M
IP6 0,30 mM	DTIC 3 μ M
	DTIC 1,5 μ M
	DTIC 0,75 μ M
IP6 0,15 mM	DTIC 3 μ M
	DTIC 1,5 μ M
	DTIC 0,75 μ M

As leituras da porcentagem de inibição dos compostos isolados e associados foram inseridas no *software* CompuSyn, que utiliza o método descrito por Chou e Talalay (1983). Os valores do IC são classificados como antagonismo (IC > 1), efeito aditivo (IC = 1) e sinergismo (IC < 1).

4.3.6 Teste Cometa

- Preparo da lâmina

Previamente a realização do ensaio do cometa foram confeccionadas lâminas histológicas com agarose de ponto de fusão normal (*normal melting point* ou NMP) para proporcionar uma melhor adesão da segunda camada. Para a diluição da agarose NMP um béquer contendo agarose NMP e água Mili Q foi colocado em micro-ondas para aquecimento, evitando a ocorrência de fervura, e após a total solubilização a mesma foi mantida em manta térmica a 60 °C, já que seu ponto de endurecimento é em torno de 37 °C. Em seguida as lâminas foram parcialmente imersas na solução de agarose NMP 1,5% e retiradas, removendo a agarose da parte inferior com auxílio de papel toalha, permitindo assim a formação de uma fina camada de agarose NMP.

Para o teste do cometa foram utilizadas células B16F10. As células foram adicionadas em placa de 96 poços em densidade de 10000 células/poço e

deixadas para estabilização em incubadora por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. As células foram então tratadas nas concentrações de DTIC de 6µM (controle positivo) e 1,5µM, IP6 2,5mM e 0,6mM, DTIC 1,5µM + IP6 0,6mM e meio de cultura (controle negativo) por 4 horas. Para a remoção das células da placa de 96 poços, foi adicionada tripsina por 3 minutos e a inativação ocorreu com a adição de meio completo em volume 3 vezes maior. A suspensão de células foi transferida para microtubos identificados. Os microtubos foram centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 1mL de PBS e novamente centrifugadas, ao final o sobrenadante foi descartado.

A agarose LMP (*low melting point*) possui baixo ponto de fusão, permanecendo líquida até 36 °C permitindo assim o englobamento das células sem necessidade de aquecimento. Para a inclusão foi pipetado 20 µL da suspensão de células e adicionado a 220 µL de agarose LMP 1%. Em seguida as células suspensas em agarose LMP foram dispostas em duas lâminas preparadas previamente com a primeira camada de agarose NMP e cobertas com lamínula e mantidas a 8 °C por 20 minutos. Após a inclusão das células a lamínula foi removida e procedeu-se com a lise. Para a lise das células as lâminas foram imersas em cubetas horizontais com solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM em pH 10, o Triton-X 1% e DMSO 10%) e colocadas em geladeira por uma hora e meia protegidas da luz. Em seguida as lâminas foram dispostas em cuba de eletroforese e cobertas com solução alcalina de eletroforese gelada (300mM NaOH + 1mM EDTA pH 13) por 30 minutos protegido da luz, em sequência foi realizada a corrida de eletroforese por 20 minutos a 20V e 300mA. Após a eletroforese as lâminas foram retiradas da cuba e dispostas horizontalmente. A neutralização ocorreu com a adição de tampão Tris (0,4M, pH 7,5) em 3 lavagens de 5 minutos. As lâminas foram então dispostas verticalmente para secagem em temperatura controlada de 37°C e em seguida fixadas com etanol por 5 minutos, por fim, foram dispostas verticalmente em temperatura ambiente para secagem.

Para a coloração com prata foi seguida a metodologia de Cerda e colaboradores (1997). As lâminas foram hidratadas por 5 minutos com água destilada e em seguida cobertas com solução de fixação (TCA 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5% e glicerol 5%) por aproximadamente 10 minutos e lavadas

novamente com água destilada por 3 vezes. As lâminas foram dispostas verticalmente para secagem até o dia seguinte (*overnight*). No dia seguinte as lâminas foram reidratadas com água destilada por 5 minutos. A solução para coloração com prata foi preparada imediatamente antes do uso, a solução A foi preparada com 5% de carbonato de sódio em água destilada e a solução B com 0,02% de nitrato de amônia, 0,02% de nitrato de prata, 0,1% de ácido tungstosilícico e 0,05% de formaldeído, as soluções foram misturadas na proporção de 68 mL da Solução A e 32 mL da Solução B. As lâminas foram colocadas horizontalmente e com auxílio de uma pipeta cobertas com solução de coloração de prata por cerca de 14 minutos ou até as lâminas adquirirem coloração amarronzada. As lâminas foram então lavadas por 3 vezes em água destilada e cobertas por uma solução de ácido acético 1% por 5 minutos para que a reação fosse parada. Novamente as lâminas foram lavadas por 3 vezes em água destilada por 5 minutos e deixadas *overnight* para secagem.

Para a classificação dos cometas foi realizada análise visual em microscopia ótica em aumento de 400x, da relação comprimento da cauda e diâmetro da cabeça. Foi realizada a contagem de 100 células sequenciais, identificando o tipo de dano causado, se classe 0 (sem dano-figura 11a), classe 1 (dano mínimo-figura 11b), classe 2 (dano médio-figura 11c) ou classe 3 (dano máximo-figura 11d) segundo critérios descritos por Tice (1995). O Índice de Dano ao DNA (ID) foi obtido com a seguinte fórmula:

$ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)$, onde n representa o número de nucleoides contados para cada classe de dano.

A frequência de dano é calculada através da porcentagem do número total de cometas com cauda (Classe 1 a Classe 3) divididos pelo total de nucleoides contados através da seguinte fórmula:

$$\text{Frequencia de dano} = [(n \text{ total} - n \text{ Classe } 0) \cdot 100] / n \text{ total}$$

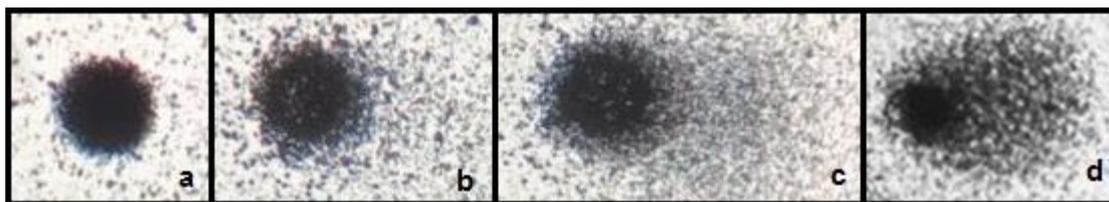


Figura 11: Perfil de análise para classificação dos cometas. Classe 0 – a; Classe 1 – b; Classe 2 – c; Classe 3 – d. Fonte: Autor.

4.4 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica *in vivo*

4.4.1 Teste Para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O teste é realizado com o cruzamento de três linhagens diferentes de *Drosophila melanogaster*. Linhagem *mwh* (com constituição genética *y; mwh jv*), linhagem *flr³* (e constituição genética *flr³ / In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx34e e BdS*) e linhagem *ORR/flr³* (de constituição genética *ORR; flr3 /In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx34e e BdS*), sendo essa última linhagem proveniente da linhagem Oregon R (R), resistente ao DDT, que possui os cromossomos 1 e 2, contendo genes responsáveis por alto nível de enzimas de metabolização do tipo citocromo P(CYP)6A2 (GRAF E VAN SCHAİK, 1992). O cruzamento padrão (ST – *standard cross*) ocorre entre machos *mwh* e fêmeas virgens *flr³*. O cruzamento de alta ativação (HB – *high bioactivation*) ocorre entre machos *mwh* e fêmeas virgens *ORR/flr³*.

Para a realização do teste, machos *mwh* foram cruzados com fêmeas virgens *flr³* (cruzamento ST) e *ORR/flr³* (cruzamento HB). Após o cruzamento os indivíduos foram transferidos para frascos com meio de cultura específico para ovoposição com base de ágar 4% w/v, fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae* - Fleischmann®) e sacarose. As fêmeas realizaram ovoposição por 8 horas. Após 72 horas as larvas foram lavadas em água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. As larvas foram então transferidas para vidros com meio alternativo (purê instantâneo de batata Yoki®) e tratados seguindo dois protocolos: determinação da mutagenicidade com os compostos, isoladamente, IP6 (0,5mM, 1mM, 2mM) e DTIC (0,01mM, 0,02mM e 0,04mM) e

antimutagenicidade com a combinação de IP6 (0,05mM, 1mM e 2mM) e DTIC (0,02mM). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras, água Mili-Q. As larvas foram submetidas a tratamento crônico por 48 horas. As moscas adultas foram então fixadas com etanol 70% e as asas coletadas e montadas lâminas e cobertas com lamínula com solução de Faure (30g de goma arábica, 50g de hidrato de cloral, 20mL de glicerol e 50mL de H₂O). A análise da ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes foi realizada em microscópio ótico comum em aumento de 400x. As mutações foram classificadas como mancha simples pequena, quando a mutação era verificada em uma ou duas células apenas, mancha simples grande, quando havia presença de manchas em mais de duas células consecutivas e manchas gêmeas, quando havia presença de mancha *flare* e *mwh* em um intervalo inferior a 2 células. A ausência de mutação confere fenótipo selvagem de um pelo por célula.

A frequência dos tipos de mancha mutante por indivíduo de uma série tratada foi comparada com seu respectivo controle, usando o teste Binomial Condicional de Kastembaum e Bowman (1970). Para avaliar resultados negativos, fatores de multiplicação (m) foram introduzidos no teste. São eles: m=2 para manchas simples pequenas e total de manchas, devido às suas altas frequências espontâneas e m=5 para manchas simples grandes e gêmeas, que raramente surgem de forma espontânea (GRAF *et al.*, 1984; FREI e WÜRGLER 1988; FREI *et al.*, 1992). Sendo assim estabelecidos os critérios para o diagnóstico positivo, requerendo que uma frequência de mutações no tratado seja m vezes maior que a frequência obtida no controle negativo (ANDRADE; LEHMANN, 2003).

A porcentagem de inibição foi calculada a partir das frequências de mutações obtidas dos indivíduos que foram tratados com as amostras associadas à DTIC, de acordo com Abraham (1994): % I = frequência de mutações DTIC – frequência de mutações das amostras associado a DTIC X 100/ frequência de mutações DTIC.

4.5 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

4.5.1 Modelo experimental de melanoma murino

O projeto de pesquisa para avaliação da atividade anticâncer *in vivo* foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) (Protocolo nº750/2016). O experimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Inflamação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os animais (BALB/c) utilizados para a realização dos experimentos foram fornecidos pelo Biotério Central da UFMS.

Foram utilizados 30 camundongos machos da linhagem BALB/c, com peso entre 25-30. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (dimensão 40 x 35 x 17 cm), na quantidade máxima de três animais por caixa, à temperatura de 22°C ± 2°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVITAL[®] CR1) e água à vontade. A aclimatação ocorreu durante 5 dias antes do início do experimento.

Para o desenvolvimento do tumor, foram inoculadas suspensões de células B16-F10 (750.000 células/0,2mL PBS) via subcutânea na região interescapular dos camundongos. Os animais foram distribuídos em 5 grupos contendo 6 animais cada:

1. Grupo controle negativo: tratados com solução salina via gavagem;
2. Grupo Controle positivo: tratados com DTIC intraperitoneal (i.p.) na dose de 50mg/kg;
3. Grupo DTIC i.p. 25mg/kg;
4. Grupo IP6 100mg/kg, via gavagem;
5. Grupo IP6 100mg/kg, via gavagem + DTIC. 25mg/kg, i.p.

Para a gavagem foi utilizada cânula de gavagem para camundongo. Os animais foram submetidos a jejum de 4 horas antes de receber o tratamento oral. A gavagem com IP6 (grupos 4 e 5) ou solução salina (grupo 1) ocorreu por 21 dias (D1 a D21), já o tratamento com a DTIC nas doses de 50mg/kg (grupo 2) e 25mg/kg (grupo 3 e 5) ocorreram durante 5 dias (D11 a D15).

Após 21 dias da inoculação das células, foi realizada a eutanásia dos animais em câmara de CO₂. Os nódulos hipodérmicos formados na região dorsal dos camundongos foram retirados e pesados em balança analítica (5 casas

decimais) RADWAG® para verificação da redução do peso tumoral. Para avaliação do ganho de peso, os animais foram pesados no D0 (inoculação das células B16-F10), no D11 e D21 (eutanásia).

Para análise histológica, após a eutanásia, foram coletados rim, fígado e baço fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas. Em seguida, as peças foram desidratadas em baterias de álcool e xilol e então incluídas em parafina. Para confecção da lâmina as peças foram cortadas em micrótomo com espessura de 5 µm. Os cortes foram corados por hematoxilina-eosina (HE). A avaliação histopatológica foi realizada no Laboratório de Histologia da UFMS.

A análise foi realizada baseada nas alterações morfológicas de esteatose, degeneração hidrópica, degeneração hialina, infiltrado leucocitário, fibrose, apoptose e necrose. Para cada parâmetro foi escores (0 / ausente / Grau 0), (+ / leve / grau 01), (++) / moderada / grau 02) e (+++ / intensa / grau 03), determinando a intensidade da lesão em cada área analisada. A análise foi realizada ao acaso, com 10 secções de cada órgão. Foi atribuído em cada área analisada o grau de lesão encontrada, depois realizada média aritmética da lesão encontrada.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A porcentagem de crescimento celular obtida segundo Monks e colaboradores (1991) foi utilizada na elaboração de gráficos por regressão não linear para obtenção da GI_{50} em *software* de análise de dados *Origin* 6.0.

O Índice de Combinação foi determinado através de análise de dados com o *software* Compusyn®.

O Ensaio do Cometa foi analisando utilizando o Teste ANOVA com pós teste de Tukey para comparação entre grupos por meio do *software* *BioEstat* 5.3®, considerando estatisticamente significativo $p < 0,05$.

Para o teste do SMART tratamento estatístico aplicado foi segundo a metodologia descrita por Frei e Würigler (1988), utilizando o teste do qui-quadrado para proporções, bicaudal, com nível de significância $\alpha=\beta=0,05$. Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo.

Os resultados obtidos no ensaio *in vivo* de atividade antitumoral com relação ao peso dos tumores foram expressos como média \pm erro padrão da média e

comparados com os controles por meio da análise de variância ANOVA seguidos pelo pós-teste de Dunnett por meio do *software BioEstat 5.3®*. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

A análise histopatológica foi dada em escores, os valores foram expressos em mediana e foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para análise da diferença entre os grupos, seguido do teste de Mann-Whitney para localizar as diferenças estatísticas. Foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata. Os resultados da atividade antiproliferativa em linhagem B16F10 e citotóxica em NIH/3T3 são demonstrados nas figuras 12 e 13 respectivamente por meio de média e desvio padrão. Para a análise e expressão da atividade anticâncer foi utilizada a GI_{50} (concentração suficiente para inibir 50% da proliferação celular). As concentrações utilizadas são expressas em $\mu\text{g/mL}$, μM e mM devido a diferença de massa entre os compostos. A GI_{50} foi calculada por regressão não linear em *software* de análise de dados *Origin 6.0*. Para a DTIC e IP6 foram encontrados respectivamente $6\mu\text{M}$ e $2,5\text{mM}$ para linhagem neoplásica (B16F10) e $3\mu\text{M}$ e $1,25\text{mM}$ para linhagem normal (NIH/3T3).

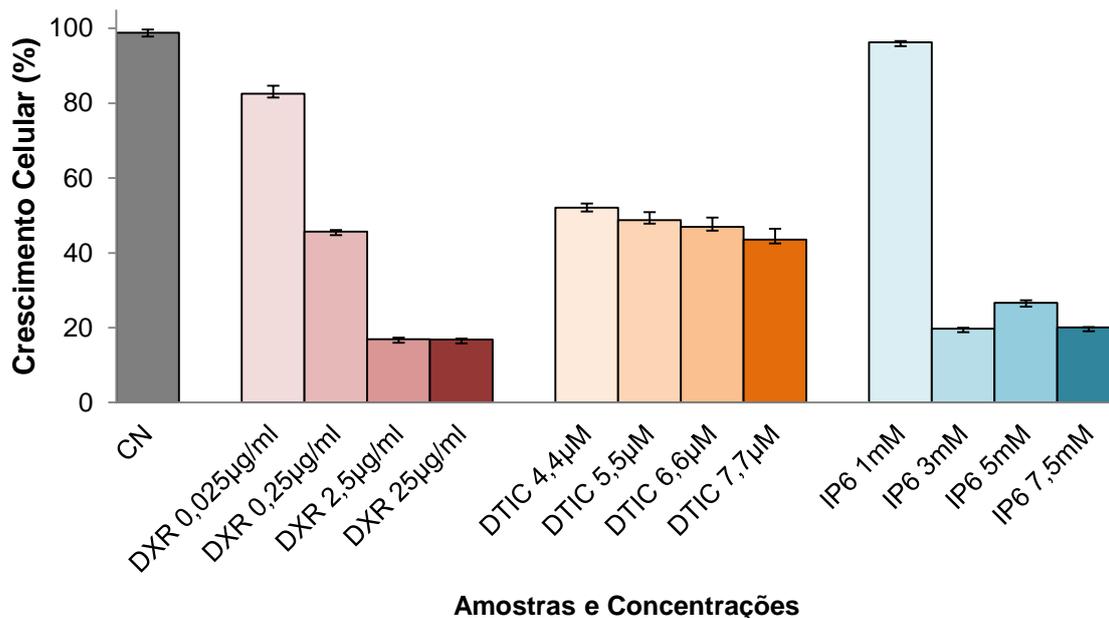


Figura 12: Média e desvio padrão da atividade antiproliferativa das amostras em linhagem B16F10, expostas a diferentes concentrações de cada amostra por 48 horas. CN: controle negativo; DXR: doxorubicina (controle positivo); DTIC: dacarbazina; IP6: hexafosfato de inositol.

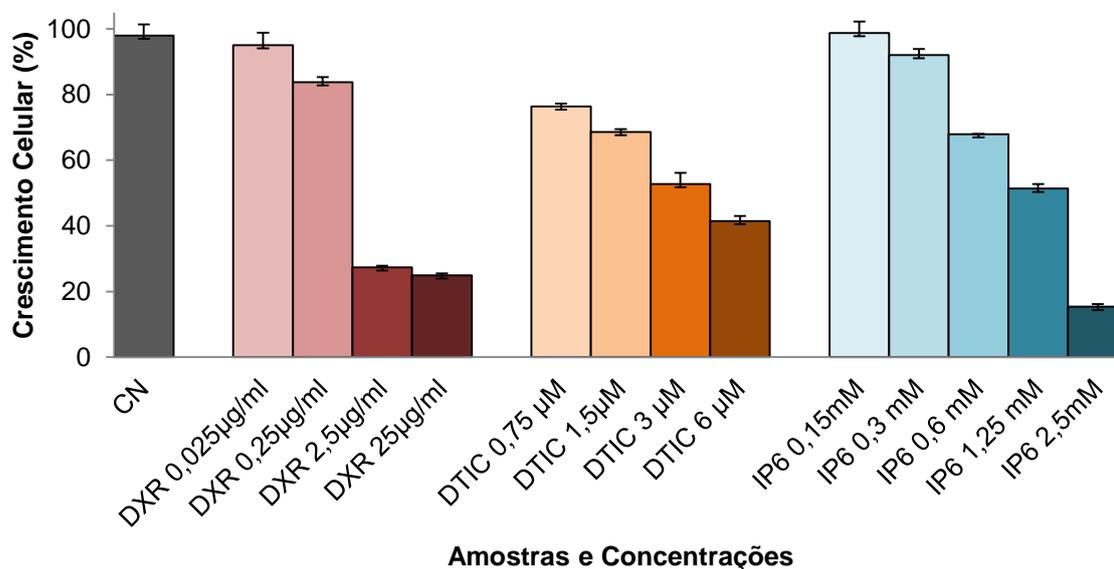


Figura 13: Média e desvio padrão da atividade citotóxica das amostras em linhagem NIH/3T3 expostas a diferentes concentrações de cada amostra por 48 horas. CN: controle negativo; DXR: doxorubicina; DTIC: dacarbazina; IP6: hexafosfato de inositol.

Determinada a GI_{50} dos compostos nas linhagens celulares neoplásica e normal, foi possível calcular o índice de seletividade (IS), que indica quantas vezes o composto é mais seletivo para células neoplásicas (tabela 3).

Tabela 4: Valores de GI_{50} da DTIC e IP6 para as linhagens NIH/3T3 e B16F10 e seu índice de seletividade.

Amostras	GI_{50} em NIH/3T3	GI_{50} em B16F10	IS*
DTIC (μ M)	3	6	0,5
IP6 (mM)	1,25	2,5	0,5

* significativos para valores maiores ou iguais a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

Os índices de seletividade calculados para o IP6 e para a DTIC foram inferiores a 2, o que indica a não seletividade dos compostos para as células de melanoma murino. Ambos os compostos apresentaram IS de 0,5. Para identificação da atividade antiproliferativa dos compostos em associação foi realizado co-tratamento de concentrações do IP6 com DTIC.

As concentrações utilizadas do IP6 e DTIC foram inferiores as encontradas de GI_{50} na linhagem não neoplásica (NIH/3T3) para verificar possível sinergismo das substâncias em células de melanoma murino. O resultado da inibição do crescimento das concentrações aplicadas separadamente e combinadas podem ser visualizado nas figuras 14 e 15 respectivamente.

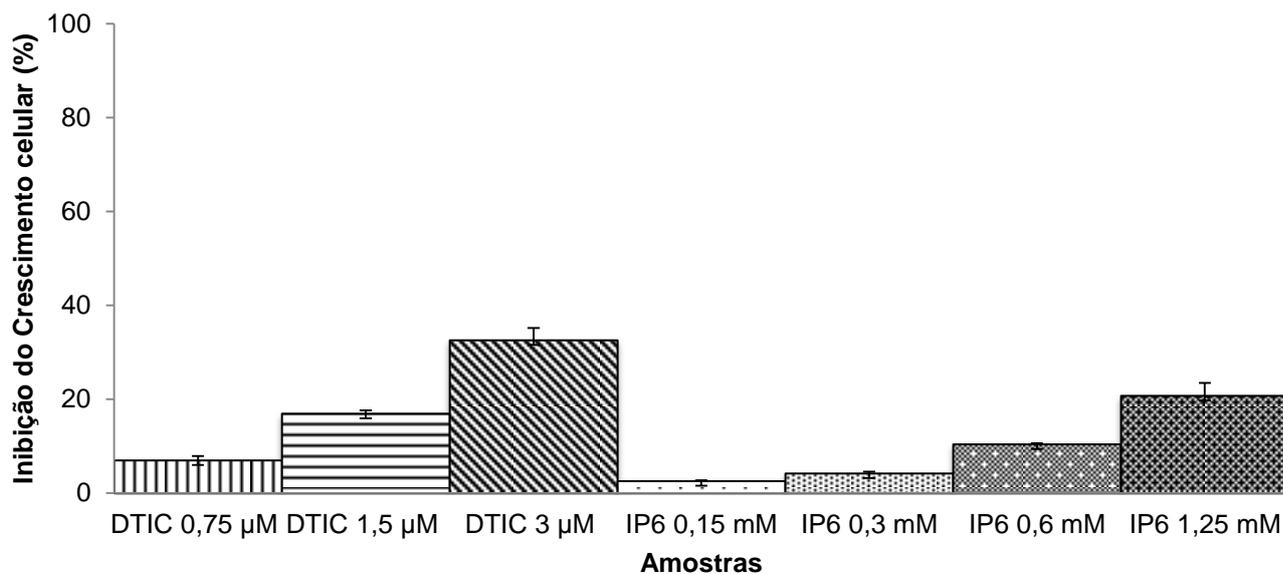


Figura 14: Média e desvio padrão da viabilidade celular em linhagem celular B16F10 das concentrações em monoterapia de IP6 e DTIC em 48 horas.

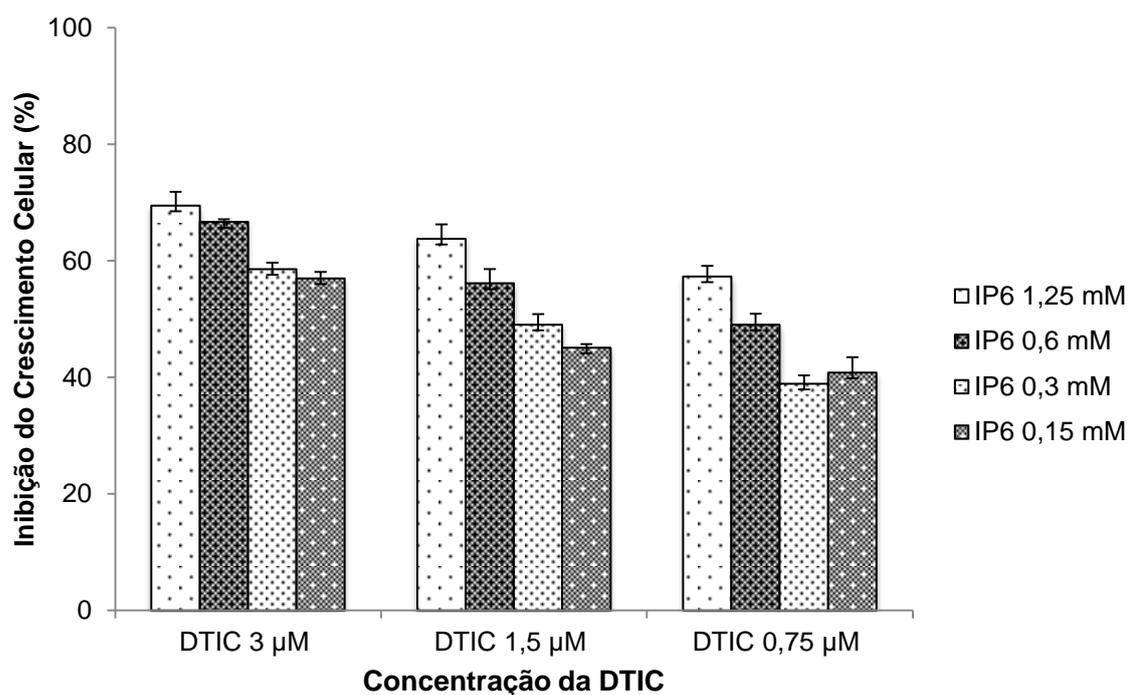


Figura 15: Média e desvio padrão médio da viabilidade celular em linhagem celular B16F10 das concentrações associadas de IP6 e DTIC em 48 horas.

A inibição do crescimento celular mínima das concentrações associadas foi de 39%. A associação que promoveu uma maior inibição foi a de IP6 1,25 mM e DTIC 3µM, inibindo 69,5% do crescimento celular. As concentrações associadas

que apresentaram inibição do crescimento próximo a 50%, foi a associação de IP6 0,6 mM e DTIC 1,5 μ M, com 56,1% de inibição.

6.2 Índice de Combinação

Verificado que a associação dos compostos promoveu aumento da inibição do crescimento celular quando comparado com os compostos isolados, foi calculado o índice de combinação (IC) de todas as concentrações associadas através do *software* CompuSyn, que utiliza o método descrito por Chou e Talalay (1983). Valores inferiores a 1 indicam sinergismo, enquanto valores superiores a 1 mostram antagonismo, valores iguais a 1 são classificados como efeito aditivo. Todas as concentrações associadas tiveram um IC < 1, ou seja, o IP6 e a DTIC através de sinergismo foram capazes de potencializar a inibição do crescimento celular (Figura 16).

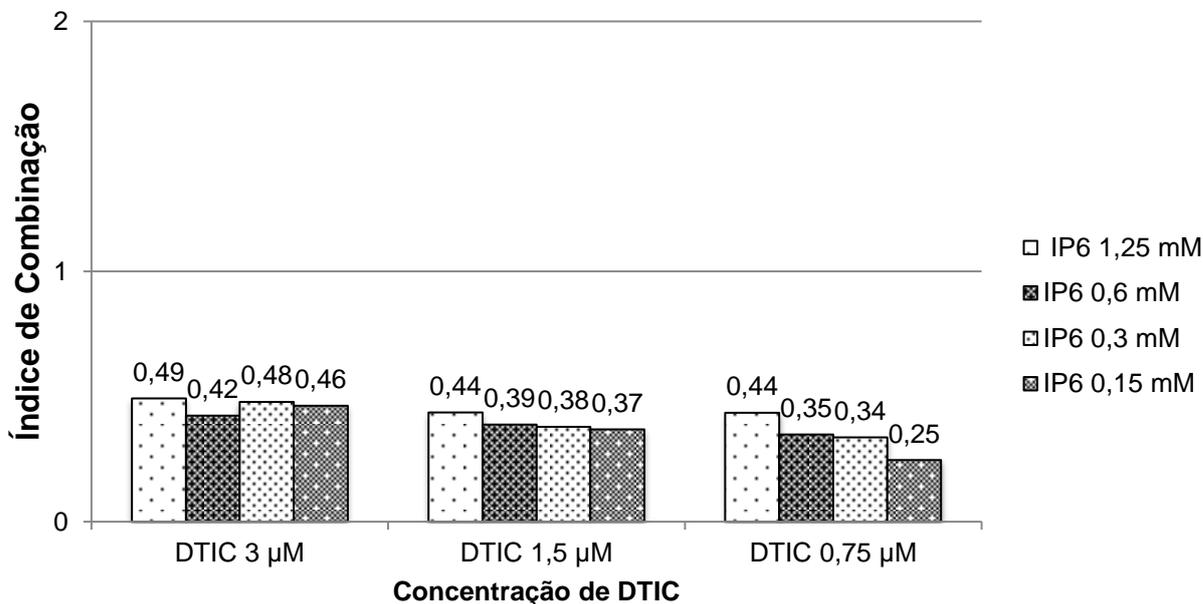


Figura 16: Gráfico do Índice de Combinação (IC) dos compostos DTIC e IP6 nas concentrações associadas em células B16F10 e seus respectivos índices. IC>2 antagonismo; IC=1 efeito aditivo; IC<1 sinergismo.

A escolha da associação para realização do teste do cometa foi baseado no critério de presença de sinergismo. Visto que todas as concentrações associadas

apresentaram $IC < 1$, o segundo critério foi a escolha da associação que apresentasse inibição do crescimento celular em linhagem neoplásica próxima de 50%, para que fosse possível realizar a comparação com a concentração de GI_{50} das amostras aplicadas individualmente. Dessa forma a concentração escolhida foi a IP6 0,6 mM + DTIC 1,5 μ M que apresentou $IC = 0.39$ e inibição do crescimento de 56,1%.

6.3 Teste do Cometa *in vitro*

A tabela 5 apresenta a média dos resultados obtidos da leitura do ensaio do cometa em células B16F10 tratadas com IP6 (2,5 mM, 0,6 mM) e DTIC (6 μ M, 1,5 μ M) e co-tratamento de IP6 e DTIC (0,6 mM:1,5 μ M) realizado em triplicata.

O quimioterápico, como agente alquilante, induziu aumento da frequência dos cometas. A DTIC na concentração de GI_{50} exibiu 100% de células com cometa, ou seja, todas as células analisadas sofreram algum tipo de lesão no DNA com prevalência de cometas nas classes 2, dano intermediário e 3, dano máximo. Quando a concentração foi reduzida a um quarto (1,5 μ M) foi observada uma redução dos danos, com 83% das células apresentando cometa. A classe de cometas predominante foi do tipo 1, dano mínimo e 2, dano intermediário. O IP6 apresentou genotoxicidade em 39% das células em ambas às concentrações testadas, demonstrando que sua genotoxicidade não é dependente da concentração. A predominância dos cometas foi na classe 0, o que indica dano ausente, seguida da classe menor dano, classe 1. Por outro lado o IP6 quando associado à DTIC, ambos na menor concentração, apresentaram redução do dano de 57,3%. A média do índice de dano da combinação dos compostos difere estatisticamente da DTIC 1,5 μ M ($p < 0,05$), o que demonstra que a associação do IP6 a DTIC teve ação antígenotóxica. Quando comparado ao controle negativo foi verificado que não há diferença estatística, demonstrando que a associação não é genotóxica.

É possível verificar a classe de dano de todos os compostos testados (Tabela5). As células quando expostas a DTIC 1,5 μ M apresentou cometas em maior quantidade nas classes 1 e 2, enquanto as células expostas a DTIC 6 μ M

apresentou majoritariamente cometas das classes 2 e 3, indicando um maior dano. Já para o composto IP6, em ambas as concentrações testadas, as classes de dano foram do tipo 0, sem dano, e 1, dano mínimo. Quando realizada a associação de IP6 0,6 mM e DTIC 1,5 µM foi verificado predominância de cometas de classe 0 e 1 reduzindo a genotoxicidade da DTIC 1,5 µM isolada.

Tabela 5: Média de dano obtidos com o teste do cometa em células B16F10 após tratamento com IP6 2,5 mM, IP6 0,6 mM, DTIC 5 µM, DTIC 1,5 µM e IP6 0,6 mM associado a DTIC 1,5 µM (ANOVA com pós teste de Tukey).

Tratamentos	N° total de células						Índice de dano
	Analizadas	Com cometa	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	
Controle negativo	100	22	78	19	2,3	0,7	25,7
DTIC 6 µM	100	100	0	15,3	61,3	23,3	208*
IP6 2,5 mM	100	39	61	34	4,7	3,3	53,4
IP6 0,6 mM	100	39	61	29	8,3	1,7	50,7
DTIC 1,5 µM	100	83,7	16,3	51,7	27,3	4,7	120,3*
IP6 0,6 mM + DTIC 1,5 µM	100	50	50	40,3	7,3	2,3	62

*p<0,05

6.4 Teste Para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

Verificado que o composto IP6 não é genotóxico e que associado a DTIC foi capaz de reduzir a atividade genotóxica do quimioterápico, com preservação da atividade antiproliferativa em células tumorais, foi realizado o teste do SMART para verificar se o IP6 seria capaz de reduzir os danos mutagênicos provocados pela DTIC *in vivo* em células não neoplásicas.

A análise das lâminas mostrou presença majoritária de pelos selvagens, indicando que não houve perda da heterozigose (Figura 17a) quando as larvas foram submetidas ao tratamento crônico com IP6. Por meio de análise estatística

foi verificado que o IP6 isolado não demonstrou atividade mutagênica em todas as concentrações testadas (0,5 mM, 1 mM e 2 mM), em ambos os cruzamentos (Tabela 6). O quimioterápico DTIC apresentou ação mutagênica em todas as concentrações testadas (0,01 mM, 0,02 mM e 0,04 mM) no cruzamento padrão (ST). Já o cruzamento de alta bioativação (HB) a menor concentração aplicada (0,01 mM) não apresentou mutagênese (tabela 7). A prevalência das manchas simples pequenas (*mwh* ou *flr*³) evidencia que a mutação causada pela DTIC não é do tipo recombinogênica, visto que não foram visualizadas manchas gêmeas em quantidade significativa (Figura 17b,c,d).

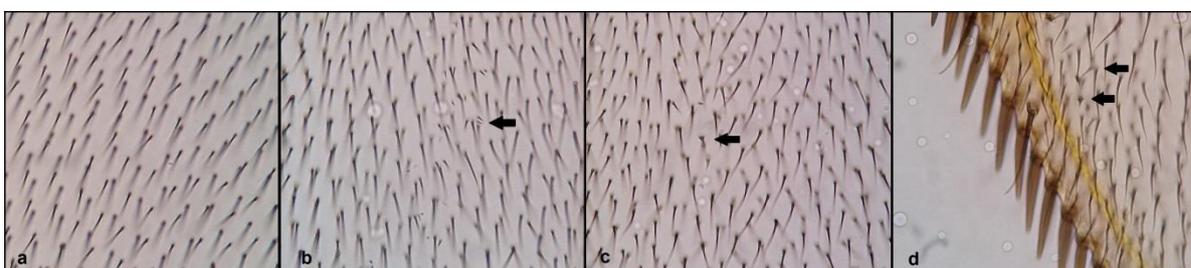


Figura 17: Foto dos pelos das asas após os tratamentos. a) pelo selvagem, tratamento com IP6, b) mancha *mwh*, tratamento DTIC, c) mancha *flr*³, tratamento DTIC d) mancha gêmea, *mwh* e *flr*³, tratamento DTIC.

A atividade antimutagênica do IP6 foi avaliada por meio da associação dos compostos IP6 (0,5 mM, 1 mM e 2 mM) e DTIC (0,02 mM). Houve redução da mutagênese superior a 100% para concentração intermediária de IP6 e de 78,2% para a maior concentração no cruzamento padrão. Já no cruzamento de alta bioativação o IP6 apresentou atividade antimutagênica, superior a 100% nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM (Tabela 8). Conferindo assim uma atividade mutagênica ao IP6 quando associado a DTIC ($p \leq 0,05$).

Tabela 6: Frequência de manchas mutantes nas asas de descendentes marcados trans-heterozigotos (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* usando cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com IP6.

Cruzamento e Concentração (mM)	Nº de moscas (N)	Manchas simples pequena (1-2 céls) ^b m=2		Mancha simples grande (>1-2 céls) ^b m=5		Manchas Gêmeas m=5		Total de manchas m=2		Total clones <i>mwh</i> ^c (N)
		Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	
(ST)	(N)	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	(N)
CN	20	0.30	(06)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.30	(06)	06
IP6 (0.5)	20	0.20	(04)	0.20	(04)	0.05	(01)	0.45	(09)-	09
IP6 (1.0)	20	0.15	(03)	0.10	(02)	0.00	(00)	0.25	(05)-	05
IP6 (2.0)	20	0.50	(10)	0.05	(01)	0.00	(00)	0.55	(11)-	11
(HB)	(N)	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	(N)
CN	20	0.37	(07)	0.15	(03)	0.50	(01)	0.55	(11)	11
IP6 (0.5)	20	0.10	(02)	0.05	(01)	0.00	(00)	0.15	(03)-	03
IP6 (1.0)	20	0.35	(07)	0.15	(03)	0.50	(01)	0.55	(11)-	11
IP6 (2.0)	20	0.35	(07)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.35	(07)-	07

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples simples *flr³* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela 7: Frequência de manchas mutantes nas asas de descendentes marcados trans-heterozigotos (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* usando cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com DTIC.

Cruzamento e Concentração (mM)	Nº de moscas (N)	Manchas simples pequena (1-2 céls) ^b m=2		Mancha simples grande (>1-2 céls) ^b m=5		Manchas Gêmeas m=5		Total de manchas m=2		Total clones <i>mwh</i> ^c (N)
		Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	
(ST)	(N)	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	(N)
CN	20	0.30	(06)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.30	(06)	6
DTIC (1 . 10 ⁻²)	20	0.65	(13)	0.05	(01)	0.05	(01)	0.75	(15)+	15
DTIC (2 . 10 ⁻²)	20	0.65	(13)	0.05	(01)	0.05	(01)	0.75	(15)+	15
DTIC (4 . 10 ⁻²)	20	0.60	(13)	0.20	(04)	0.00	(00)	0.85	(17)+	17
(HB)	(N)	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	Freq.	Nº de	(N)
CN	20	0.35	(07)	0.15	(03)	0.05	(01)	0.55	(11)	11
DTIC (1 . 10 ⁻²)	20	0.30	(06)	0.05	(01)	0.05	(01)	0.40	(08)-	08
DTIC (2 . 10 ⁻²)	20	0.60	(12)	0.15	(03)	0.00	(00)	0.75	(15)-	25
DTIC (4 . 10 ⁻²)	20	0.80	(16)	0.20	(04)	0.00	(00)	1.00	(20)-	20

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela 8: Frequência de manchas mutantes nas asas de descendentes marcados trans-heterozigotos (*mwh / flr³*) de *D. melanogaster* usando cruzamento padrão (ST) e de altbioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com IP6 e DTIC.

Cruzamento e Conc. (mM)	Nº de moscas	Manchas simples pequena (1-2 céls) ^b m=2		Mancha simples grande (>1-2 céls) ^b m=5		Manchas Gêmeas m=5		Total de manchas m=2		Total clones <i>mwh</i> ^c (N)	Redução mutação (%)
		Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas		
(ST)	(N)	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	(N)	(%)
CN	20	0.30	(06)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.30	(06)	06	
DTIC 0,02		0.65	(13)	0.05	(01)	0.05	(01)	0.75	(15)	15	
DTIC 0,02 + IP6 0.5	20	0.60	(12)	0.05	(01)	0.00	(00)	0.65	(13)	13	
DTIC 0,02 + IP6 1.0	20	0.20	(04)	0.05	(01)	0.00	(00)	0.25	(05)+	05	>100
DTIC 0,02 + IP6 2.0	20	0.30	(06)	0.10	(02)	0.00	(00)	0.40	(08)+	08	78,2
(HB)	(N)	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	Freq. mutações	Nº de manchas	(N)	(%)
CN	20	0.35	(07)	0.15	(03)	0.05	(01)	0.55	(11)	11	
DTIC 0,02		0.60	(12)	0.15	(03)	0.00	(00)	0.75	(15)	15	
DTIC 0,02 + IP6 0.5	20	0.15	(03)	0.10	(02)	0.05	(01)	0.30	(06)+	06	>100
DTIC 0,02 + IP6 1	20	0.25	(05)	0.15	(03)	0.00	(00)	0.40	(08)+	08	>100
DTIC 0,02 + IP6 2	20	0.75	(15)	0.00	(00)	0.05	(01)	0.80	(16)	16	

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

6.5 Modelo experimental de melanoma murino

Os animais tratados apresentaram comportamento normal durante todo tratamento e em todos os grupos. Os resultados demonstraram uma redução do peso tumoral médio dos animais tratados com o controle positivo (DTIC 50mg/Kg), DTIC 25mg/kg e IP6 100mg/Kg (gavagem) + DTIC 25mg/Kg em relação ao controle negativo ($p < 0,01$) (Figura 18). A redução do peso tumoral foi de 86,3%, 61,8% e 70,2% para o controle positivo, DTIC 25mg/kg e IP6 100mg/kg + DTIC 25mg/kg respectivamente. A redução da dose da DTIC (25mg/kg) quando aplicada isoladamente, produziu um tumor com peso 28% maior em comparação com sua associação ao IP6.

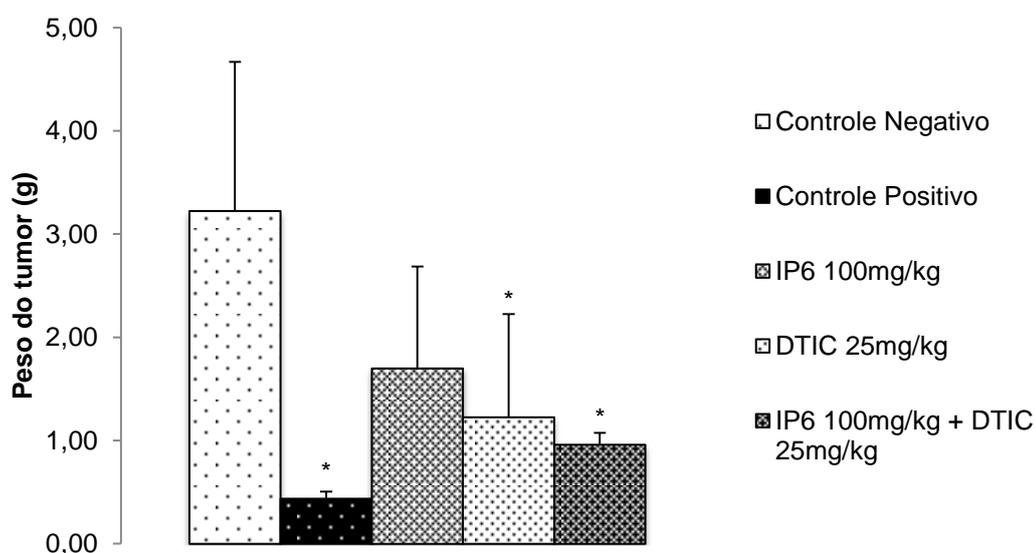


Figura 18: Efeito antitumoral do tratamento com IP6, DTIC e IP6+DTIC em modelo experimental murino. em relação ao peso dos nódulos após o tratamento com DTIC 50mg/kg (Controle positivo), IP6 100 mg/kg, DTIC 25mg/Kg e IP6 100 mg/kg+DTIC 25mg/Kg. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão da média. * $p < 0,01$ (ANOVA com pós teste de Dunnett).

6.5.1 Análise histopatológica e ganho de massa ponderal

Os animais não apresentaram diferença estatística em relação ao peso quando comparado entre grupos. Ao comparar o peso inicial e final, todos os grupos apresentaram ganho de peso (Tabela 9).

Tabela 9: Peso inicial e final dos animais dos grupos experimentais. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão.

Grupos	Peso Corporal (g)		Ganho de massa ponderal	
	Inicial	Final	Ganho Médio	Porcentagem (%)
Controle Negativo	27,8 \pm 1,8	31,0 \pm 3,9	3,2	10,3
Controle Positivo	27,2 \pm 1,2	29,7 \pm 2,3	2,5	8,4
IP6 100mg/Kg	29,2 \pm 1,8	32,2 \pm 1,9	3,2	9,9
DTIC 25mg/Kg	29,2 \pm 1,3	31,7 \pm 1,0	2,5	7,8
IP6 100mg/Kg + DTIC 25mg/kg	28,9 \pm 2,4	30,9 \pm 2,0	2,0	6,5

Não houve diferença significativa entre os pesos finais dos grupos (ANOVA, seguido de teste de Dunett).

Não foram observadas alterações histopatológicas de esteatose, degeneração hidrópica, degeneração hialina, infiltrado leucocitário, fibrose, apoptose ou necrose em nenhum dos grupos tratados ($p > 0,05$). Os órgãos analisado, rim, baço e fígado, apresentaram aspecto normal sem evidências de alterações.

7 DISCUSSÃO

O elevado custo dos novos medicamentos tem impulsionado pesquisas em busca de agentes que atuem sinergicamente com as terapias antineoplásicas convencionais (PLUMMER; *et al.*, 2013). A dacarbazina é um agente quimioterápico reconhecido e utilizado no tratamento do melanoma metastático, porém apresenta efeitos adversos que muitas vezes podem inviabilizar a terapia, nossos estudos demonstraram atividade antiproliferativa em linhagem B16F10, conforme descrito na literatura em várias linhagens tumorais. (SERRONE; *et al.*, 2000; SAMULITIS; DORR; CHOW, 2011; BOIA-FERREIRA; *et al.*, 2017; ZHANG; *et al.*, 2017).

Nossos resultados mostram o potencial antiproliferativo do IP6 em células de melanoma murino com GI_{50} 2,5 mM. Até o momento não foram encontrados estudos científicos sobre a atividade antiproliferativa desse composto em linhagem B16F10, sendo este o primeiro registro dessa atividade de IP6 nessa linhagem tumoral. A associação do IP6 a agentes antineoplásicos demonstrou uma melhora na resposta do quimioterápico (JANUS; WEURTZ; ONDREY, 2007; BAČIĆ; *et al.*, 2010).

Para linhagem normal (NIH/3T3) foi encontrada uma GI_{50} de 1,25mM para o IP6, resultado equivalente ao encontrado por Babich e colaboradores (1993) de 1,21mM. O índice de seletividade (IS) calculado foi inferior a 2, demonstrando a não seletividade do composto para linhagem B16F10. Embora o IP6 não tenha apresentado seletividade, no ensaio *in vitro*, estudos demonstram por meio de ensaio de toxicidade aguda que o IP6 não apresentou alterações histopatológicas e bioquímicas de animais tratados com doses subagudas, demonstrando a ausência de toxicidade desse composto (SANGEETHA; *et al.*, 2013; BHOWMIK, A.; *et al.*, 2017; BIZZARRI; *et al.*, 2016).

A DTIC também não apresentou seletividade (IS=0,5), a GI_{50} encontrada para linhagem não neoplásica foi 3 μ M e 6 μ M para linhagem B16F10. Esse último valor é semelhante ao encontrado por Bahara e colaboradores (2016) nessa mesma linhagem, com GI_{50} 7,5 μ M. Nesse estudo, também foi associada uma saponina derivada de uma fonte natural ao quimioterápico DTIC e foi

demonstrada uma redução de 2,5 e 1,1 vezes das concentrações da saponina e DTIC respectivamente, mantendo atividade antiproliferativa próxima de 50% (BAHARA; *et al.*, 2016). Por meio dos ensaios realizados neste estudo, foi possível verificar a redução da concentração de ambos os compostos em 4 vezes, mantendo a atividade antiproliferativa próxima de 50% quando em uso associado de IP6 0,6 mM e DTIC 1,5 μ M.

À partir do efeito antiproliferativo das substâncias associadas, foi calculado o índice de combinação (IC) por meio de análise de *software* CompuSyn. As leituras da viabilidade celular dos compostos isolados e associados foram inseridas no *software* com suas respectivas concentrações e demonstraram um $IC < 1$ para todas as concentrações combinadas de IP6 e DTIC, ou seja, as duas substâncias associadas são capazes de potencializar o efeito anticâncer através de sinergismo. A associação que apresentou uma GI próxima de 50% (IP6 0,6 mM+DTIC 1,5 μ M) teve um IC de 0.39. Embora o IP6 já tenha sido utilizado associado a outros quimioterápicos (JANUS; WEURTZ; ONDREY, 2007; BAČIĆ; *et al.*, 2010), não há registros do cálculo do índice de combinação dessas associações. Sai e colaboradores (2014) realizaram ensaios com células de glioblastoma multiforme (GIC-1) com a temozolomida (TMZ), agente alquilante, triazeno análogo a DTIC. A associação de um produto de origem natural (triptolida) a TMZ potencializou a ação do quimioterápico apresentando um $IC = 0.53$, esses resultados exemplificam o potencial sinérgico dos produtos naturais associado aos agentes antineoplásicos convencionais.

O teste do cometa foi realizado para verificar a genotoxicidade dos compostos. O IP6 não apresentou genotoxicidade significativa tanto na concentração de 0,6 mM, quanto na de 2,5 mM em células B16F10. A porcentagem de células que apresentaram cometa foi semelhante em ambas às concentrações aplicadas de IP6, mostrando que o pequeno efeito genotóxico apresentado não foi dependente da concentração. Já a DTIC, como esperado, apresentou genotoxicidade significativa e proporcional a concentração aplicada. Na concentração de 6 μ M foi possível verificar a presença de 100% das células com cometa, o que significa que todas as células avaliadas sofreram algum tipo de dano na fita de DNA, resultado semelhante ao encontrado por Ralph e colaboradores (2016) no tratamento de

células de melanoma humano com 5 μ M do fármaco. Quando a concentração foi reduzida em 4 vezes (1,5 μ M), houve uma redução de 17% das células que apresentaram algum tipo de dano. A associação de IP6 0,6mM e DTIC 1,5 μ M promoveu uma redução da genotoxicidade causada pelo quimioterápico, mas como demonstrado no ensaio de citotoxicidade, a associação manteve atividade antiproliferativa importante de 50%. Lev e colaboradores (2004) demonstraram que a exposição a doses elevadas da DTIC pode levar a um mecanismo de resistência ao efeito citotóxico do antineoplásico, sendo benéfica a redução da concentração (LEV; *et al.*, 2004).

O IP6 possui mecanismo de ação não estabelecido para essa linhagem tumoral. Estudos evidenciaram a ação do IP6 como agente imunomodulador atuando na via PI3K, regulando genes supressores tumorais e inibindo a angiogênese (GU; *et al.*, 2009; ROY; *et al.*, 2009; LIU; *et al.*, 2015). Por meio do ensaio do cometa é possível inferir que o mecanismo de ação do IP6 para essa linhagem tumoral não esteja relacionado a genotoxicidade e quando associado a DTIC a atividade antiproliferativa se mostrou independente de genotoxicidade. Embora a busca de agentes genotóxicos ou que promovam o aumento da genotoxicidade na pesquisa de compostos anticâncer seja frequente, outras vias de morte da célula tumoral são igualmente importantes (CARVALHO, 2012).

No teste do SMART, também não foram identificadas mutações significativas em todas as concentrações testadas (0,5 mM, 1 mM e 2 mM), tanto no cruzamento ST como no cruzamento HB. Esse resultado era esperado devido a presença desse composto em castanhas, legumes e cereais que são consumidos diariamente pela população, além disso, o IP6 é encontrado nas células da maioria dos mamíferos (POYNER; *et al.*, 1993; SHAMSUDDIN; VUCENIK; COLE, 1997; SHAMSUDDIN, 1999). A DTIC na concentração de 0,02 mM teve ação mutagênica em todas as concentrações aplicadas no cruzamento ST. Esse comportamento era esperado, devido a sua ação alquilante (ROOS; *et al.*, 2007; BONMASSAR; *et al.*, 2013) e conforme demonstrado por Kurdi e Aljeddani (2016) através de ensaio com camundongos. No tratamento das larvas em que foi associado o IP6 a DTIC foi possível verificar um efeito antimutagênico. Para o cruzamento ST a associação de IP6 1 mM a DTIC 0,02 mM promoveu uma redução da mutação

superior a 100% e de 78,2% quando a concentração do IP6 foi dobrada (2 mM). Esse resultado demonstra que não houve dependência da concentração em relação a antimutagenese e o IP6. Já nos indivíduos de alta bioativação foi observada redução da mutação superior a 100% nas concentrações 0,5 mM e 1 mM de IP6, porém não foi observado esse comportamento na maior concentração (2 mM), resultado semelhante ao cruzamento ST em que foi identificado um padrão concentração não dependente. Não foram encontrados estudos científicos sobre a atividade antimutagênica desse composto sendo este o primeiro registro dessa atividade.

A avaliação da atividade antitumoral em modelo experimental de melanoma murino demonstrou redução do peso tumoral quando a DTIC 25mg/kg foi associada ao IP6. A redução do peso tumoral foi de 70,2% para a associação. Estudos demonstraram benefícios da associação do IP6 a outros compostos na redução do peso tumoral, com inibição importante, resultado também encontrado nesse estudo (VUCENIK; BEUMER; EISMAN, 2014; FU; *et al.*, 2016). A DTIC 25mg/kg apresentou diferença estatística do controle negativo e quando houve a associação do IP6 foi verificado um aumento da da redução do peso tumoral de 27,6%, resultado semelhante ao encontrado no ensaio *in vitro*, o qual a DTIC mesmo em doses reduzidas apresentou atividade antiproliferativa e quando associada ao IP6 apresentou maior atividade antiproliferativa e sinergismo por meio do índice de combinação.

8 CONCLUSÃO

O IP6 apresentou atividade antiproliferativa em linhagem B16F10 e citotóxica em linhagem normal NIH/3T3.

O IP6 não apresentou seletividade para células neoplásicas.

A associação de DTIC e IP6 apresentou sinergismo em células de melanoma (B16F10).

O IP6 não apresentou atividade genotóxica e quando associado a DTIC apresentou atividade antigenotóxica.

O IP6 apresentou atividade antimutagênica quando associado a DTIC.

Na atividade antitumoral *in vivo* o IP6 associado a DTIC promoveu redução do peso tumoral.

9 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S. K. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, v. 9, n. 4, p. 383-386, 1994.

AL-BADR, A. A.; ALODHAIB, M. M. Chapter Four-Dacarbazine. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 41, p. 323-377, 2016.

ALMEIDA, A. C. M.; *et al.* Cutaneous melanoma: clinical, epidemiological, and anatomopathological aspects of a training center in Belo Horizonte. **Rev. bras. cir. plást.**, v. 29, n. 4, p. 497-503, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment & Support. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/staging.html>>. Acesso em 21 jul. 2017;

AMORIM, E. M. **Estudo da mutagenicidade de metabólitos secundários liquênicos, utilizando o teste smart e ensaio cometa em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2016. Dissertação de Mestrado.

ANDRADE, H. H. R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. **Mutagênese Ambiental. Canoas: ULBRA**, 2003.

ANDRADE, L. R.; *et al.* Estudo da toxicidade e genotoxicidade induzidas por diferentes nanopartículas in vivo. 2012.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949-968, 2013.

BABICH, H.; BORENFREUND, E.; STERN, A. Comparative cytotoxicities of selected minor dietary non-nutrients with chemopreventive properties. **Cancer letters**, v. 73, n. 2-3, p. 127-133, 1993.

BAČIĆ, I.; *et al.* Efficacy of IP 6+ inositol in the treatment of breast cancer patients receiving chemotherapy: prospective, randomized, pilot clinical study. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 12, 2010.

BAHARARA, J.; *et al.* The Cytotoxicity of Dacarbazine Potentiated by Sea Cucumber Saponin in Resistant B16F10 Melanoma Cells through Apoptosis Induction. **Avicenna journal of medical biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 112, 2016.

BAKEWELL, S. Phytic acid: a phytochemical with complementary and alternative benefits. **Cancer biology & therapy**, v. 5, n. 9, p. 1134-1135, 2006.

BALLA, T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. **Physiological reviews**, v. 93, n. 3, p. 1019-1137, 2013.

BENEVIDES, J. C. M.; *et al.* Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.

BHOWMIK, A.; *et al.* Inositol hexa phosphoric acid (phytic acid), a nutraceuticals, attenuates iron-induced oxidative stress and alleviates liver injury in iron overloaded mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 443-450, 2017.

BIZZARRI, M.; *et al.* Broad Spectrum Anticancer Activity of Myo-Inositol and Inositol Hexakisphosphate. **International journal of endocrinology**, v. 2016. 2016.

BOIA-FERREIRA, M. *et al.* TCTP as a therapeutic target in melanoma treatment. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 5, p. 656-665, 2017.

BONMASSAR, L. *et al.* Triazene Compounds in the Treatment of acute Myeloid Leukemia: a Short Review and a Case report. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 19, p. 2389-2401, 2013.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W.M. **Genética Humana 3ed.** Artmed Editora, p. 49 2013.

BOTTON, R. C. P. Medicamentos utilizados no tratamento do câncer de pele tipo melanoma: uma revisão de literatura. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Oncologia do Complexo de Pós Graduação da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ.

BRAGALONE, D. L. Drug information handbook for oncology. **An Extensive Guide to Combination Chemotherapy Regimens.** Hudson, OH: Lexicomp, 2015.

BRANDÃO, Hugo N. *et al.* Chemistry and pharmacology of antineoplastic chemoterapeutical derivatives from plants. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. Disponível em:<<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45419.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Câmara Nacional De Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). 2013. Disponível em: <<http://conitec.gov.br/index.php/protocolos-e-diretrizes>>. Acesso em: 24 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações de Saúde. 2014. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=19465>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

BRASIL. DATAPREV. DATAPREV (dados abertos) - Benefícios por Incapacidade Concedidos por Classificação Internacional de Doenças (CID). [Online] Empresa de Tecnologia e Informações da Previdência Social, 2016. Disponível em: <<http://dadosabertos.dataprev.gov.br/opendata/Ces09/formato=csv>>. Acesso em: 20 jul. 2017.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária. 2017a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos>>. Acesso em 17 ago. 2017.

BRASIL, Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos. **Resolução CMED**, n. 2. 2017b.

BRISTOL-MYERS SQUIBB FARMACÊUTICA LTDA. Produtos. Disponível em: <http://www.bristol.com.br/Files/Bulas/YERVOY_SOL_INJ_VP_Rev0417.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2017.

BUZAID, A. C.; MALUF, A. C.; LIMA, C. M. R. MOC: Manual de oncologia clínica do Brasil. In: MOC: Manual de oncologia clínica do Brasil. 2017. Disponível em: <<http://mocbrasil.com/moc-drogas/>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

CARVALHO, A. Avaliação dos efeitos citotóxicos de cardenolídeos em células tumorais. 2012. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Catarina.

CERDA, H.; *et al.* The DNA comet assay's a rapid screening technique to control irradiated food. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 375, n. 2, p. 167-181, 1997.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 4, p. 450-454, 1983.

COLLINS, C. M.; *et al.* Dacarbazine induced acute myeloid leukemia in melanoma. **Melanoma research**, v. 19, n. 5, p. 337-340, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* A. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition**, p. 137-186, 2009.

DINICOLA, S.; *et al.* Inositol induces mesenchymal-epithelial reversion in breast cancer cells through cytoskeleton rearrangement. **Experimental cell research**, v. 345, n. 1, p. 37-50, 2016.

ETEBARI, M.; JAFARIAN-DEHKORDI, A.; LAME, V. Evaluation of protective effect of amifostine on dacarbazine induced genotoxicity. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 10, n. 1, p. 68, 2015.

FERIGOLO, P. C.; SAGRILLO, M. R. Genotoxicidade relacionado ao consumo de chimarrão. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2016;

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.

FERNANDES, F. H. **Avaliação do Potencial Antioxidante, Genotóxico e/ou Antigenotóxico e Estudo Químico de uma amostra de Própolis da Região do Cerrado de Mato Grosso do Sul**. 2012. Dissertação de Mestrado;

FOSTER, S. R. *et al.* Effects of combined inositol hexakisphosphate and inositol supplement on antioxidant activity and metabolic enzymes in the liver of streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, 2017.

FREI, H.; *et al.* The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 279, n. 1, p. 21-33, 1992.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 203, n. 4, p. 297-308, 1988.

FRESHNEY, R. I. **Culture of specific cell types**. John Wiley & Sons, Inc., 2005.

FU, M.; *et al.* Inositol Hexaphosphate and Inositol Inhibit Colorectal Cancer Metastasis to the Liver in BALB/c Mice. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p. 286, 2016.

GARBE, C., *et al.* Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. **The oncologist**, v. 16, n. 1, p. 5-24, 2011.

GARBER, A. M.; GOLDMAN, D. P. The changing face of health care. **Coping with Methuselah: The Impact of Molecular Biology on Medicine and Society**, p. 105-123, 2004.

GONCHAROVA, R. I. Antimutagenesis as a genetic process. **Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk**, n. 1, p. 26-33, 1993.

GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 61-69, 1990.

GRAF, U. I.; *et al.* Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 6, n. 2, p. 153-188, 1984.

GRAF, U.; *et al.* The wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection. **African Newsletter on Occupational Health and Safety**, v. 6, p. 9-13, 1996.

GRAF, U.; SINGER, D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Revista internacional de contaminación ambiental**, v. 8, n. 1, p. 15-27, 1992.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 271, n. 1, p. 59-67, 1992.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* Introdução à genética. In: **Introdução à genética**. Guanabara Koogan, 2013.

GU, M.; *et al.* Inositol hexaphosphate suppresses growth and induces apoptosis in prostate carcinoma cells in culture and nude mouse xenograft: PI3K-Akt pathway as potential target. **Cancer research**, v. 69, n. 24, p. 9465-9472, 2009.

GUENCHEVA, T. N.; *et al.* Metabolismo de xenobióticos. Citocromo P450. **Genética Toxicológica. Alcance, Brazil**, p. 223-247, 2003.

GULLO, V. P. *et al.* Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 523-531, 2006.

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

HARDY, K. M. *et al.* Targeting nodal in conjunction with dacarbazine induces synergistic anticancer effects in metastatic melanoma. **Molecular Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. 670-680, 2015.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

HOSPITAL DAHER. Lago Sul Brasília-DF. Disponível em: <<http://www.hospitaldaher.com.br/daher/cuidado-as-pintas-podem-sinalizar-o-surgimento-do-cancer-de-pele>>. Acesso em: 12 jul. 2017.

HOUGHTON, P. *et al.* The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377-387, 2007.

IHME. Institute for Health Metrics and Evaluation. GBD Cause Patterns. Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2015. <vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>. Acesso em 18 jan 2017;

INCA. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. Coordenação de Educação. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: **INCA**, 2011.

INCA. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. Estimativa 2016/2017. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2015 Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acesso em 11 jan. 2017;

INSTITUTO ONCOGUIA. Tipos de tratamento contra o câncer. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tipos-de-tratamento-contra-o-cancer/9017/1034/>> .Acesso em: 21 jul. 2017.

JANUS, S. C.; WEURTZ, B.; ONDREY, F. G. Inositol hexaphosphate and paclitaxel: symbiotic treatment of oral cavity squamous cell carcinoma. **The Laryngoscope**, v. 117, n. 8, p. 1381-1388, 2007.

JIMÉNEZ, V. E. *et al.* Study on the relationship of genotoxic and oxidative potential of a new mixed chelate copper antitumoral drug, Casiopeina II-gly (Cas II-gly) in *Drosophila melanogaster*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 48, p. 286-293, 2016;

JIN, J. *et al.* PTD4-apoptin protein and dacarbazine show a synergistic antitumor effect on B16-F1 melanoma in vitro and in vivo. **European journal of pharmacology**, v. 654, n. 1, p. 17-25, 2011.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map0407020>. Acesso em: 17 ago. 2017.

KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 9, n. 5, p. 527-549, 1970.

KONDO, N. *et al.* DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. **Journal of nucleic acids**, v. 2010. 2010.

KONRAD, P.; *et al.* Perfil epidemiológico e histopatológico dos casos de melanoma cutâneo primário diagnosticados em Criciúma no período entre 2005 e 2007. **An Bras Dermatol**, p. 457-461, 2011.

KURDI, L. A.; ALJEDDANI, F. Reduction of Dacarbazine cytogenetic effects on somatic cells in male mice using bee glue (Propolis) to manifest the scientific miracles in the Quran. **Electronic physician**, v. 8, n. 9, p. 3015, 2016.

LEÓN, M. L. V.; *et al.* Melanoma. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 11, n. 26, p. 1597-1607, 2013.

LEV, D. C.; *et al.* Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and metastasis in vivo. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 11, p. 2092-2100, 2004.

LEWIN, B. Genes VII, trad. **Henrique Ferreira (et al)**, Ed. Artmed. Porto Alegre. Brasil, p. 990, 2001.

LIU, G.; *et al.* Inositol hexaphosphate suppresses growth and induces apoptosis in HT-29 colorectal cancer cells in culture: PI3K/Akt pathway as a potential target. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 2, p. 1402, 2015.

LONG, G. V.; *et al.* Nivolumab improved survival vs dacarbazine in patients with untreated advanced melanoma. **Journal of translational medicine**, v. 13, 2015.

MONKS, A. *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MOREIRA, J.; *et al.* Cutaneous malignant melanoma: a retrospective study of seven years (2006-2012). **Acta Médica Portuguesa**, v. 27, n. 4, p. 480-488, 2014.

MOSKOVITZ, J.; YIM, M. B.; CHOCK, P. B. Free radicals and disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 354-359, 2002.

NCI. NATIONAL CANCER INSTITUTE. What is cancer? Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> >. Acesso em 10 jul. 2017;

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 81, p. 111-119, 2015.

PALERMO, A. M.; MUDRY, M. D. Etanol e isopropanol: genotoxicidad y teratogénesis evaluada aplicando el modelo de *Drosophila melanogaster*. **Acta toxicológica argentina**, v. 22, n. 3, p. 122-135, 2014.

PINTO, A. C. V. D.; *et al.* Melanoma maligno: estudo epidemiológico dos casos diagnosticados em unidade de referência em dermatologia em Bauru-sp de 2007 a 2014. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 2, 2015

PINTO, L.; FELZENSSWALB, I. Genética do câncer humano In: Mutagênese Ambiental. **Canoas: ULBRA**, 2003.

PLUMMER, R.; *et al.* A phase II study of the potent PARP inhibitor, Rucaparib (PF-01367338, AG014699), with temozolomide in patients with metastatic melanoma demonstrating evidence of chemopotentiation. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 1191-1199, 2013.

POYNER, D. R. *et al.* Characterization of metal ion-induced [3H] inositol hexakisphosphate binding to rat cerebellar membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 2, p. 1032-1038, 1993.

PRADO, B. B. F. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 21-24, 2014.

PRYNNE, C. J. *et al.* Dietary fibre and phytate—a balancing act: results from three time points in a British Birth Cohort. **British journal of nutrition**, v. 103, n. 2, p. 274-280, 2010.

R&D Systems. 2017. Disponível em: <<https://www.rndsystems.com/products/cometassay-assay-principle>>. Acesso em: 17 jul. 2017.

RALPH, A. C. L.; *et al.* Biflorin induces cytotoxicity by DNA interaction in genetically different human melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 34, p. 237-245, 2016.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American journal of cardiology**, v. 101, n. 10, p. S43-S49, 2008.

ROOS, W. P. *et al.* Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. **Oncogene**, v. 26, n. 2, p. 186, 2007.

ROY, S.; *et al.* p21/Cip1 and p27/Kip1 are essential molecular targets of inositol hexaphosphate for its antitumor efficacy against prostate cancer. **Cancer research**, v. 69, n. 3, p. 1166-1173, 2009.

SADHU, S. S. *et al.* In-vitro and in-vivo inhibition of melanoma growth and metastasis by the drug combination of celecoxib and dacarbazine. **Melanoma research**, v. 26, n. 6, p. 572-579, 2016.

SAI, K. *et al.* Triptolide synergistically enhances temozolomide-induced apoptosis and potentiates inhibition of NF- κ B signaling in glioma initiating cells. **The American journal of Chinese medicine**, v. 42, n. 02, p. 485-503, 2014.

SAMULITIS, B. K.; DORR, R. T.; CHOW, H. S. Interaction of dacarbazine and imexon, in vitro and in vivo, in human A375 melanoma cells. **Anticancer research**, v. 31, n. 9, p. 2781-2785, 2011.

SANGEETHA, M. K. *et al.* Sub-acute toxicity profile of a modified resveratrol supplement. **Food and chemical toxicology**, v. 59, p. 492-500, 2013.

SERRONE, L.; *et al.* Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 19, n. 1, p. 21-34, 2000.

SHAMSUDDIN, A. M. Metabolism and Cellular Functions of IP6.A Review. **Anticancer Research**, v. 19, n. 5, p. 3733-3736, 1999.

SHAMSUDDIN, A. M.; VUCENIK, I.; COLE, K. E. IP6: a novel anti-cancer agent. **Life sciences**, v. 61, n. 4, p. 343-354, 1997.

SIGTAP. SISTEMA DE GERENCIAMENTO DA TABELA DE PROCEDIMENTO, MEDICAMENTOS E OPM DO SUS. Disponível em: <<http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada/app/sec/procedimento/exibir/0304020230/07/2017>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

SKEHAN P.; *et al.* New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. *Journal of The National Cancer Institute*. 1990; 82(13):1107-1112.

SLINGLUFF J. C. L.; *et al.* Cutaneous Melanoma. In: DeVita Jr VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 9th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Câncer da pele. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/doenca/cancer-da-pele/>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 6, p. 71-133, 1991.

TASSET-CUEVAS, I.; *et al.* Protective effect of borage seed oil and gamma linolenic acid on DNA: in vivo and in vitro studies. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56986, 2013.

THAPA, N.; *et al.* Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase γ and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling couple to promote oncogenic growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 30, p. 18843-18854, 2015.

TICE, R. R.; STRAUSS, G. H. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 13, p. 207-214, 1995.

TICE, R. R.; *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TICKOO, S.; RUSSELL, S. Drosophilamelanogaster as a model system for drug discovery and pathway screening. **Current opinion in pharmacology**, v. 2, n. 5, p. 555-560, 2002.

TIEZZI, D. G. The search for the breast cancer cure: shall we start all over again?. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 6, p. 235-236, 2014.

VETMA, V.; *et al.* Examining the In-Vitro Efficacy of the IAP Antagonist Birinapant as a Single-Agent or in Combination with Dacarbazine to Induce Melanoma Cell Death. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, 2017.

VUCENIK, I.; PODCZASY, J. J.; SHAMSUDDIN, A. M. Antiplatelet activity of inositol hexaphosphate (IP6). **Anticancer research**, v. 19, n. 5A, p. 3689-3693, 1999.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A. M. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3778S-3784S, 2003.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A. M. Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. **Nutrition and cancer**, v. 55, n. 2, p. 109-125, 2006.

VUCENIK, I.; BEUMER, J. H.; EISMAN, J. L. Inositol hexaphosphate (IP6) and inositol against large granular lymphocytic leukemia (LGLL). 2014.

WAWSZCZYK, J.; *et al.* Antiproliferative effect of inositol hexaphosphate on human skin melanoma cells in vitro. **Acta Pol. Pharm.**, v. 72, n. 5, p. 895-900, 2015.

WHO. *Health topics*. Disponível em: <www.who.int/topics/cancer/en/>. Acesso em: 11 jan. 2017;

YANG, C.; *et al.* Oncolytic adenovirus expressing interleukin-18 improves antitumor activity of dacarbazine for malignant melanoma. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 3755, 2016.

YU, S.; *et al.* Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP) including IP isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. **Journal of animal science**, v. 90, n. 6, p. 1824-1832, 2012.

YU, W.; *et al.* Inositol hexaphosphate suppresses colorectal cancer cell proliferation via the Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling cascade in a 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. **European journal of pharmacology**, v. 805, p. 67-74, 2017.

ZAFRED, R. R. T. *et al.* Pro-oxidant activity and genotoxicity of the Astronium fraxinifolium using wing SMART and Allium cepa test. **Research Journal of Medicinal Plant**, 2016.

ZHANG, Y.; *et al.* Ethanol extract of Ilex hainanensis Merr. exhibits anti-melanoma activity by induction of G1/S cell-cycle arrest and apoptosis. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, p. 1-9, 2017.

ZHU, H. P.; YUN, F.; JIU, T. Inhibitory effect of inositol hexaphosphate on proliferation of LNCaP cells and its relation to IGFBP 3 expression. **Zhejiang da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Zhejiang University. Medical sciences**, v. 43, n. 5, p. 521-527, 2014.

**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO
DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO
SUL- UFMS**



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atividade anticâncer do inositol hexafosfato (IP6) associado a dacarbazina em modelo experimental murino", registrada com o nº 750/2016, sob a responsabilidade de **Danielle Bogo** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, em reunião de 21/03/2016.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/02/2016 a 01/03/2017
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / BALB/c
Nº de animais	60
Peso/Idade	25 - 35g/adulto
Sexo	Macho
Origem	Laboratório de Biofisiologia - LBFF/CCBS/ UFMS


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 22 de março de 2016.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186

ANEXO C – TABELAS COMPLEMENTARES

Tabela: Média e desvio padrão de dano obtidos com o teste do cometa em células B16F10 após tratamento com IP6 2,5mM, IP6 0,6mM, DTIC 6µM, DTIC 1,5µM e IP6 0,6mM associado a DTIC 1,5µM (ANOVA com pós teste de Tukey)

Tratamentos	Nº total de células						Índice de dano
	Analizadas	Com cometa	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	
Controle negativo	100	16	84	11	3	2	23
	100	23	77	21	2	0	25
	100	27	73	25	2	0	29
Média	100	22	78	19	2,3	0,7	25,7
Desvio Padrão	0	5,6	5,6	7,2	0,6	1,1	3,0
DTIC 6µM	100	100	0	21	44	35	214
	100	100	0	9	68	23	214
	100	100	0	16	72	12	196
Média	100	100	0	15,3	61,3	23,3	208*
Desvio Padrão	0	0	0,0	6,0	15,1	11,5	10,4
IP6 2,5mM	100	32	68	27	4	1	38
	100	36	64	30	6	0	42
	100	49	51	45	4	0	80
Média	100	39	61	34	4,7	0,3	44,3
Desvio Padrão	0	8,9	8,9	9,6	1,1	0,6	7,8
DTIC 1,5 µM	100	81	19	45	26	10	127
	100	86	14	47	36	3	128
	100	84	16	63	20	1	106
Média	100	83,7	16,3	51,7	27,3	4,7	120,3*
Desvio Padrão	0	2,5	2,5	9,9	8,1	4,7	12,4
IP6 0,6mM	100	42	58	24	13	5	65
	100	35	65	31	4	0	39
	100	40	60	32	8	0	48
Média	100	39	61	29	8,3	1,7	50,7
Desvio Padrão	0	3,6	3,6	4,4	4,5	2,9	13,2
DTIC 1,5 µM + IP6 0,6mM	100	46	54	24	15	7	75
	100	56	44	53	3	0	59
	100	48	52	44	4	0	52
Média	100	50	50,0	40,3	7,3	2,3	62
Desvio Padrão	0	5,3	5,3	14,8	6,7	4,0	11,8

*P<0,05

Tabela: Frequência de manchas mutantes nas asas de descendentes marcados trans-heterozigotos (mwh/flr^3) de *D. melanogaster* usando cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com IP6.

Manchas por asa (número de manchas) Diagnóstico estatístico ^a												
Cruzamento e Conc. (mM)	Nº de moscas (N)	Manchas simples pequena (1-2 céls) ^b		Mancha simples grande (>2céls) ^b		Manchas gêmeas		Total de manchas		Total clones <i>mwh</i> ^c (n)	Frequência de indução nos clones (por 10 ⁵ cél por divisão celular)	
		<i>m</i> = 2		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2			Observado	Corrigido
(ST)												
CN	20	0.30	(06)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.30	(06)	6	0.61	
IP6 (0.5)	20	0.20	(04)	0.20	(04)	0.05	(01)	0.45	(09)-	9	0.92	0.31
IP6 (1.0)	20	0.15	(03)	0.10	(02)	0.00	(00)	0.25	(05)-	5	0.51	-0.10
IP6 (2.0)	20	0.50	(10)	0.05	(01)	0.00	(00)	0.55	(11)-	11	1.12	0.61
(HB)												
CN	20	0.37	(07)	0.15	(03)	0.50	(01)	0.55	(11)	11	1.12	
IP6 (0.5)	20	0.10	(02)	0.05	(01)	0.00	(00)	0.15	(03) -	03	0.30	-0.82
IP6 (1.0)	20	0.35	(07)	0.15	(03)	0.50	(01)	0.55	(11) -	11	1.12	0.00
IP6 (2.0)	20	0.35	(07)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.35	(07) -	07	0.71	-0.31

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela: Frequência de manchas mutantes nas asas de descendentes marcados trans-heterozigotos (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* usando cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com DTIC.

Manchas por asa (número de manchas) Diagnóstico estatístico ^a												
Cruzamento e Conc. (mM)	Nº de moscas (N)	Manchas simples pequena (1-2 céls) ^b		Mancha simples grande (>2céls) ^b		Manchas gêmeas		Total de manchas		Total clones <i>mwh</i> ^c (n)	Frequência de indução nos clones (por 10 ⁵ cél por divisão celular)	
		<i>m</i> = 2		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2			Observado	Corrigido
(ST)		<i>m</i> = 2		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2		(n)	Observado	Corrigido
CN	20	0.30	(06)	0.00	(00)	0.0	(00)	0.30	(06)	6	0.61	
DTIC 0,01	20	0.65	(13)	0.05	(01)	0.05	(01)	0.75	(15) +	15	1.53	0.92
DTIC 0,02	20	0.65	(13)	0.05	(01)	0.05	(01)	0.75	(15) +	15	1.53	0.92
DTIC 0,04	20	0.60	(13)	0.20	(04)	0.00	(00)	0.85	(17) +	17	1.74	1.13
(HB)		<i>m</i> = 2		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2				
CN	20	0.35	(07)	0.15	(03)	0.05	(01)	0.55	(11)	11	1.12	
DTIC 0,01	20	0.30	(06)	0.05	(01)	0.05	(01)	0.40	(08) -	8	0.81	-0.31
DTIC 0,02	20	0.60	(12)	0.15	(03)	0.00	(00)	0.75	(15) -	15	1.53	0.41
DTIC 0,04	20	0.80	(16)	0.20	(04)	0.00	(00)	1.00	(20) -	20	2.04	0.92

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela: Frequência de manchas mutantes nas asas de descendentes marcados trans-heterozigotos (*mwh / flr³*) de *D. melanogaster* usando padrão (ST) e de alta bioativação (HB) após co-tratamento crônico de larvas com DTIC e IP6.

Manchas por asa (número de manchas) Diagnóstico estatístico ^a												
Cruzamento e Conc. (mM)	Nº de moscas (N)	Manchas simples pequena (1-2 céls) ^b		Mancha simples grande (>2céls) ^b		Manchas gêmeas		Total de manchas		Total clones <i>mwh</i> ^c (n)	Percentual de redução mutagênese	Frequência dos clones (por célula por divisão) Observado
		<i>m</i> = 2	()	<i>m</i> = 5	()	<i>m</i> = 5	()	<i>m</i> = 2	()			
(ST)		<i>m</i> = 2	()	<i>m</i> = 5	()	<i>m</i> = 5	()	<i>m</i> = 2	()	(n)		Observado
CN	20	0.30	(06)	0.0	(00)	0.0	(00)	0.30	(06)	6		0.61
DTIC 0,02	20	0.65	(13)	0.05	(01)	0.05	(01)	0.75	(15)	15		1.53
DTIC 0,02 + IP6 0.5	20	0.60	(12)	0.05	(01)	0.0	(00)	0.65	(13)	13		1.31
DTIC 0,02 + IP6 1.0	20	0.20	(04)	0.05	(01)	0.0	(00)	0.25	(05) +	5	>100 %	0.51
DTIC 0,02 + IP6 2.0	20	0.30	(06)	0.10	(02)	0.0	(00)	0.40	(08) +	8	78,2%	0.81
(HB)		<i>m</i> = 2	()	<i>m</i> = 5	()	<i>m</i> = 5	()	<i>m</i> = 2	()			
CN	20	0.35	(07)	0.15	(03)	0.05	(01)	0.55	(11)	11		1.12
DTIC 0,02	20	0.60	(12)	0.15	(03)	0.00	(00)	0.75	(15)	15		1.53
DTIC 0,02 + IP6 0.5	20	0.15	(03)	0.10	(02)	0.05	(01)	0.30	(06) +	6	>100%	0.61
DTIC 0,02 + IP6 1.0	20	0.25	(05)	0.15	(03)	0.00	(00)	0.40	(08) +	8	>100%	0.81
DTIC 0,02 + IP6 2.0	20	0.75	(15)	0.00	(00)	0.05	(01)	0.80	(16)	16		1.63

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

