

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA ATIVIDADE ANTITUMORAL
DO EXTRATO DE *Opuntia ficus-indica* RICO EM BETANINA**

Me. FELIPE MENDES DE ANDRADE DE CARVALHO

Aracaju/SE
Julho – 2023

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA ATIVIDADE ANTITUMORAL
DO EXTRATO DE *Opuntia ficus-indica* RICO EM BETANINA**

Tese submetida à banca examinadora
da defesa como requisito para
obtenção do título de Doutor em
Saúde e Ambiente, na área de
concentração em Saúde e Ambiente.

Me. FELIPE MENDE DE ANDRADE DE CARVALHO

Dra. EDNA ARAGÃO FARIAS CÂNDIDO

Aracaju/SE
Julho – 2023

C331a Carvalho, Felipe Mendes de Andrade de
Avaliação experimental da atividade antitumoral do extrato de *Opuntia ficus-indica* rico em betanina / Felipe Mendes de Andrade de Carvalho; orientação [de] Prof.^a Dr.^a Edna Aragão Farias Cândido – Aracaju/ SE: UNIT, 2023.

84 f.il; 30 cm

Tese (Doutorado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes 2023

1. Triagem de medicamento antitumoral 2. Produtos naturais 3. *Opuntia ficus-indica* I. Carvalho, Felipe Mendes de Andrade de II. Cândido, Edna Aragão Farias (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 616-006.6

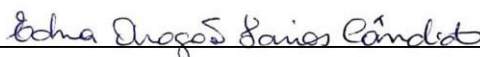
Gislene Maria S. Dias CRB-5/1410

AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO DE *Opuntia ficus-indica* RICO EM BETANINA

Me. Felipe Mendes de Andrade de Carvalho

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:



(Orientadora)



Documento assinado digitalmente
Ricardo Luiz Cavalcanti de Albu....Junior
Data: 17/08/2023 11:34:58-0300
CPF: ***.876.344-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque
Júnior

(Orientador)



Documento assinado digitalmente
MARIA NOGUEIRA MARQUES
Data: 30/09/2023 12:40:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Maria Nogueira Marques

(Titular)



Documento assinado digitalmente
SONIA OLIVEIRA LIMA
Data: 30/09/2023 10:35:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Sonia Oliveira Lima

(Titular)



Documento assinado digitalmente
RANYERE LUCENA DE SOUZA
Data: 24/08/2023 14:03:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Ranyere Lucena de Souza

(Titular)



Documento assinado digitalmente
RICARDO GUIMARAES AMARAL
Data: 28/08/2023 18:43:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Ricardo Guimarães Amaral

(Titular)

Aracaju, SE
Julho – 2023

AGRADECIMENTOS

O “fim” de uma jornada que se iniciou em 2010 está se consolidando, me tornar doutor sempre foi um objetivo, agora chegou a hora de distribuir o conhecimento e maturidade adquiridas nesses 13 anos. Chegou a hora de difundir o conhecimento através de novos talentos, seja em sala de aula ou orientações. De alguma forma farei chegar aos discentes o que aprendi com os meus professores e orientadores. Desta forma, agradeço a todos os meus professores por todo aprendizado desde o jardim de infância até o doutorado. Além dos meus professores, meus pets, Theo e Lua, amigos e familiares que sempre deram apoio com expressivo entusiasmo. Agradeço a minha mãe pelo suporte e conforto que sempre me proporcionou, a minha avó que me criou e me ensinou valores que carrego até hoje e passarei para meus filhos e netos. A minha avó que se foi, mas que me proporcionou diversas lembranças felizes. Aos meus tios, irmãos e pai. A minha companheira e amiga, Mariana, minha sogra e amiga, Nelma, minha cunhada, Júlia e o pet, Dendê pelo acolhimento e estabelecimento de um significativo apoio familiar. Ainda nessa linha de agradecimentos, explico minha eterna gratidão aos ilmos professores: Sheyla Rodrigues, Lauro Xavier, Hélio Lazarini, Kátia Gramacho, Juliana Cardoso, Patrícia Severino, Ricardo Amaral, Luciana Nalone, Luciana Holanda, Claudio Dariva, Laiza Krause, Sônia Lima, Rubens Madi, Cláudia Moura, Verônica Sierpe, Marcos Almeida, Maria Nogueira, Ranyere Lucena e Margarete Zanardo. O papel dos senhores vai além de ensinar, inspira e motiva o interesse na profissão. Especialmente agradeço a Adriana Karla por todas as oportunidades que me deu e crença que eu desempenharia um bom trabalho, desde a organização da SEMPESq à realização da meta profissional de me tornar professor de uma grande instituição de ensino superior. Agradeço imensamente a minha querida orientadora, Dra. Edna Aragão, obrigado professora, por fazer parte desse processo desde o início da iniciação científica no LPNB até o aceite na transição de mudança de orientação no doutorado. A senhora é uma grande orientadora que inspira e promove novos talentos. Obrigado por tudo, professora. Por fim, não menos importante, totalmente o oposto disso, agradeço ao meu orientador da vida, Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior. Orientador dos projetos de iniciação científica, tcc, mestrado e doutorado, uma grande trajetória foi traçada e hoje concluímos esse ciclo. Agradeço demais por tudo o que o senhor fez por mim, desde o início até hoje, o profissional que sou hoje, certamente, é porque fui seu aluno e maior fã. Aproveito para garantir que o trabalho disposto nesse macroprocesso de lapidação profissional está sendo retribuído para outros diversos talentos que estou orientando, entendendo e despertando o melhor de cada uma dentro das suas “peculiaridades”. Reitero minha profunda admiração parafraseando Jean Piaget, “Professor não é aquele que ensina, é aquele que desperta no aluno a vontade de aprender”.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivo específicos	8
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
3.1 Câncer	9
3.1.1 Epidemiologia do câncer	10
3.1.2 Etiopatogenia do câncer	12
3.1.2.1 Estágio de iniciação	13
3.1.2.2 Estágio de promoção	14
3.1.2.3 Estágio de progressão	14
3.1.2.4 Crescimento tumoral	15
3.1.2.5 O ciclo celular	16
3.1.2.6 Controle do crescimento tumoral e morte celular	16
3.2 Modelo aplicado ao estudo do câncer	17
3.2.1 Modelo de transplantação de Sarcoma 180	17
3.3 Quimioprevenção	18
3.4 Tratamento convencional e alternativo	19
3.4.1 Radioterapia	19
3.4.2 Quimioterapia Antitumoral	20
3.4.3 Cirurgia	21
3.4.4 Quimioterapia Adjuvante	22
3.5 Produtos naturais	23
3.5.1 Produtos Naturais no tratamento do câncer	24
3.6 Substâncias Naturais e Câncer	25
3.7 <i>Opuntia ficus-indica</i>	26
3.7.2 Aplicações Medicinais	28
4. METODOLOGIA	30
4.1 Obtenção do extrato de <i>Opuntia ficus-indica</i> enriquecido de betanina (SistP)	30
4.2 Cultura celular e teste citotóxico	30
4.3 Obtenção das Células Tumorais do Sarcoma 180	31
4.4 Manutenção das células tumorais do Sarcoma 180	31
4.5 Viabilidade celular pelo método de exclusão azul de Tripan	32
4.6 Animais	32
4.6.1 Aspectos Éticos	32
4.7.2 Formação de grupos experimentais	33

4.8 Análise da segurança no uso do extrato	34
4.8.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos	34
4.8.2 Análise dos parâmetros bioquímicos	35
4.8.3 Avaliação macroscópica dos órgãos excisados	35
4.8.4 Avaliação histopatológica dos órgãos excisados	36
4.9 Análise do efeito antitumoral	36
4.9.1 Determinação do efeito da administração do SistP sobre a massa ponderal e percentual de inibição do crescimento dos tumores	36
4.9.2 Avaliação histopatológica descritiva dos tumores excisados	36
4.10 Detecção <i>in situ</i> de fragmentação de DNA em células tumorais usando o ensaio Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)	39
4.11 Determinação da expressão imuno-histoquímica dos antígenos Ki67, Caspase-3 ativa (clivada) e Bax	39
4.12 Procedimentos de análise quantitativa de células positivas para TUNEL, Ki67, Caspase-3 Ativa e Bax	40
4.13 Análise estatística	40

RESUMO

O câncer é considerado a segunda causa mais comum de morbimortalidade no Brasil, os modelos de tratamento frequentemente utilizados para controle e cura provocam diversos efeitos deletérios e possíveis sequelas ao paciente. Visando a redução desses efeitos, a busca por novas terapêuticas baseadas na utilização de produtos naturais ricos em betaninas, como aquelas presentes na *Opuntia ficus-indica* têm ganhado cada vez mais espaço devido as suas diversas atividades biológicas provenientes desse metabólito secundário que compõem os principais mecanismos de defesa do espécime vegetal. Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi de investigar o efeito antitumoral in vitro e in vivo do extrato de *Opuntia ficus-indica* rico em betanina (SistP). Para isso, a citotoxicidade do extrato contra as linhagens celulares responsáveis pelo câncer de cólon (HCT-116), glioblastoma (SNB19) e câncer de próstata (PC3) foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT. Para o ensaio antitumoral, foram transplantadas células do sarcoma 180 na região axilar de 36 camundongos Swiss com peso médio inicial de 28 g que posteriormente foram divididos em cinco grupos (N6) de acordo com o tratamento diário por via intraperitoneal: Salina, 5-Fluorouracil (25 mg/Kg) e SistP (3, 10 e 30 mg/kg). Após sete dias de tratamento, os animais foram eutanasiados no oitavo dia e foi avaliada a massa ponderal do tumor para a determinação da inibição de crescimento, contagem de glóbulos vermelhos e brancos, níveis séricos de AST, ALT, ureia, creatinina para avaliação da função hepática e renal e características histopatológicas do fígado, rins e baço para avaliação de atipias morfológicas. A partir dos ensaios realizados, as três doses do grupo experimental SistP apresentaram forte atividade citotóxica contra células SNB19 ($93,7 \pm 1,8\%$), HCT-116 ($84,2 \pm 3,0\%$) e PC3 ($82,1 \pm 2,8\%$). A inibição do crescimento tumoral foi significativamente maior no grupo SistP 30 mg/kg ($54,5 \pm 7,9\%$), em relação aos demais grupos experimentais ($p < 0,001$); e semelhante ao padrão ouro, grupo 5-FU ($68,0 \pm 7,2\%$; $p < 0,05$). Na dose de 30 mg/kg, o SistP também promoveu redução significativa da necrose intratumoral, e aumento da expressão *in situ* dos marcadores de apoptose celular TUNEL p (0,01), Caspase-3 ativa ($p < 0,010$ e Bax ($p < 0,01$) em comparação com o grupo salina, mas não houve diferença na imunomarcagem do antígeno de proliferação celular ki67 ($p > 0,05$). Além disso, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e patológicos nos grupos experimentais tratados com SistP. Desta forma, é possível concluir que o SistP a 30 mg/kg exerce atividade antitumoral no modelo murino testado. Além de se mostrar um produto de potencial ponto de partida para novos estudos visando o desenvolvimento de formulações com atividade quimioterápica e/ou quimiopreventiva utilizando sistemas biológicos mais complexos e em ensaios clínicos.

Palavras-chave: Triagem de medicamento antitumoral, produtos naturais, *Opuntia ficus-indica*

ABSTRACT

Cancer is considered the second most common cause of morbidity and mortality in Brazil, the treatment models frequently used for control and cure cause several deleterious effects and possible sequelae to the patient. Aiming at reducing these effects, the search for new therapies based on the use of natural products rich in betanins, such as those present in *Opuntia ficus-indica*, has gained more and more space due to its various biological activities from this secondary metabolite that make up the main mechanisms of defense of the plant specimen. In view of the above, the objective of this work was to investigate the in vitro and in vivo antitumor effect of extract of *Opuntia ficus-indica* rich in betanin (SistP). For this, the cytotoxicity of the extract against cell lines responsible for colon cancer (HCT-116), glioblastoma (SNB19) and prostate cancer (PC3) was evaluated by the MTT cell viability colorimetric assay. For the antitumor assay, 180 sarcoma cells were transplanted into the axillary region of 36 Swiss mice with an average initial weight of 28 g, which were subsequently divided into five groups (N6) according to the daily intraperitoneal treatment: Saline, 5-Fluorouracil (25 mg/Kg) and SystP (3, 10 and 30 mg/kg). After seven days of treatment, the animals were euthanized on the eighth day and the weight of the tumor was evaluated for the determination of growth inhibition, red and white blood cell counts, serum levels of AST, ALT, urea, creatinine for evaluation of function. hepatic and renal and histopathological characteristics of the liver, kidneys and spleen for evaluation of morphological atypias. Based on the tests performed, the three doses of the SistP experimental group showed strong cytotoxic activity against SNB19 ($93.7 \pm 1.8\%$), HCT-116 ($84.2 \pm 3.0\%$) and PC3 ($82.1\% \pm 2.8\%$). Tumor growth inhibition was significantly higher in the SistP 30 group ($54.5 \pm 7.9\%$) compared to the other experimental groups ($p < 0.01$); and similar to the gold standard, 5-FU group ($68.0 \pm 7.2\%$; $p < 0.05$). At a dose of 30 mg/kg, SistP also promoted a significant reduction in intratumoral necrosis, and increased in situ expression of cell apoptosis markers TUNEL ($p < 0.01$), active Caspase-3 ($p < 0.010$) and Bax ($p < 0.01$) compared to the saline group, but there was no difference in immunostaining of unexpected cellular ki67 ($p > 0.05$). Furthermore, no significant changes were observed in hematological, biochemical and pathological parameters in the experimental groups treated with SistP. Thus, it is possible to conclude that SistP at 30 mg/kg exerts antitumor activity in the tested murine model. In addition to proving to be a potential starting point product for new studies aimed at the development of formulations with chemotherapeutic and/or chemopreventive activity using more complex biological systems and in clinical trials.

Keywords: Anti-tumor drug screening, natural products, *Opuntia ficus-indica*

1. INTRODUÇÃO

O aumento contínuo da incidência e mortalidade por câncer tornou-se um dos principais fatores que ameaçam a saúde e a segurança da vida dos seres humanos, apresentando-se como uma barreira para o aumento da expectativa de vida no mundo (ARNOLD et al., 2019). Em todo o mundo, aproximadamente 19,3 milhões de novos casos de câncer (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e quase 10 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) ocorreram em 2020 (SUNG et al., 2021). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estimou que entre 2020 e 2022 haveria 625 mil novos casos de câncer (INCA, 2019).

Embora o manejo do câncer muitas vezes envolva uma abordagem multidisciplinar, incluindo radioterapia e excisão cirúrgica, hormoterapia e imunoterapia, o uso da quimioterapia ainda se destaca no controle e cura de neoplasias malignas (BRESSAN et al., 2021). No entanto, os efeitos colaterais da quimioterapia sistêmica usada para tratar o câncer geralmente são graves, o que pode resultar em danos ao hospedeiro portador do tumor e seu sistema imunológico (SCHIRRMACHER, 2019). Uma vez que medicamentos terapêuticos seguros e eficazes são escassos para tratar o câncer ou reverter a carcinogênese e prevenir a ocorrência do câncer, os produtos naturais derivados de plantas são uma fonte promissora de novos agentes químicos para quimioterapia e quimioprevenção (SILVEIRA et al., 2021). Até o momento, mais de 60% dos agentes anticancerígenos vêm de produtos naturais e mais de 3.000 plantas são relatadas como tendo um potencial anticancerígeno considerável (AMARAL et al., 2019).

A *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, popularmente conhecida como figo da Índia, é uma planta xerófila originária do México e pertencente à Família *Cactaceae* que pode ser encontrada em todo o mundo, incluindo todos os continentes americanos (SILVA et al., 2021). Os frutos de *O. ficus-indica* são ricos em betanina, um pigmento vermelho-violeta contendo nitrogênio solúvel em água (AMAYA-CRUZ et al., 2018; MENA et al., 2018; TAHIR et al., 2019). A betanina induz a expressão de enzimas desintoxicantes/antioxidantes aumentando os níveis de mRNA e de proteína nuclear do fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide-2 (Nrf2) e a ligação de Nrf2 a sequências de elementos de resposta antioxidante (ARE) em não tumor THLE-2 de fígado humano, mas não na linha de células HepG2 derivada de hepatoma, sugerindo potenciais efeitos hepatoprotetores e anticarcinogênicos (KRAJKA-KUŹNIAK et al., 2013).

O extrato etanólico rico em betanina obtido do fruto de *Opuntia ficus-indica* inibe a proliferação de linhagens de células tumorais, como HeLA (câncer de colo do útero), e suprime o crescimento de tumores de câncer de ovário em camundongos (ZOU et al., 2005). Por sua vez, o extrato metanólico de frutos de *Opuntia ficus-indica* obtido por extração Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) com altos teores de betanina ($\geq 96,95\%$) demonstrou apresentar atividades antioxidantes, citoprotetoras e antiangiogênicas (SMERIGLIO et al., 2019). Além disso, extratos ricos em betanina derivados de outras fontes naturais, como a beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.), demonstraram induzir apoptose e morte celular autofágica na linhagem celular MCF-7 (câncer de mama humano).

A purificação de grandes quantidades de qualquer betalaína é difícil devido à sua instabilidade, que é fortemente influenciada pelo teor de açúcar, luz, oxigênio, pH e temperatura (DELGADO-VARGAS et al., 2000). A extração e purificação de compostos bioativos a partir de produtos naturais é frequentemente realizada utilizando altos teores de solventes orgânicos que são capazes de promover danos ambientais (QUEIROZ et al., 2001). Assim, foi desenvolvido um processo integrado otimizado de extração e purificação de betanina *Opuntia ficus-indica* usando sistemas aquosos bifásicos à base de tetrahidrofurano (THF) e sais de sódio, com um fator de purificação de $13,7 \pm 0,5$ vezes e um coeficiente de partição de betanina para fase rica em sal e a capacidade antioxidante aumentou aproximadamente 65%. (SANTOS et al., 2017).

Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito antitumoral do sistema purificado rico em betanina obtido utilizando o sistema aquoso bifásico à base de THF e sódio em modelo murinho de sarcoma 180.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* do extrato de *Opuntia ficus-indica* rico em betanina (SistP).

2.2 Objetivo específicos

Analisar a atividade citotóxica do SistP em modelo experimental *in vitro* contra linhagens tumorais malignas de carcinoma de cólon (HCT-116), glioblastoma (SNB19) e adenocarcinoma de próstata humanos (PC3).

Analisar o efeito da administração do SistP sobre o crescimento tumoral em modelo experimental *in vivo* de Sarcoma 180.

Investigar o efeito da administração do SistP em diferentes doses sobre as características histopatológicas dos tumores Sarcoma 180 experimentalmente induzidos.

Determinar o efeito da administração do SistP em diferentes doses sobre a expressão *in situ* de biomarcadores de proliferação celular e apoptose celular.

Analisar potenciais efeitos toxicológicos da administração de diferentes doses de SistP sobre as características anatomopatológicas e indicadores bioquímicos séricos de função do fígado, dos rins e do baço de animais com tumores Sarcoma 180.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Câncer

Neoplasia é o termo utilizado para denominar o processo de proliferação anormal de células e tecidos, podendo ser caracterizada como benigna, quando apresentam limites bem definidos, crescimento lento, incapacidade de infiltrar-se em outros tecidos e provocar metástase (DE ASSIS et al., 2011) e malignas quando se apresentam com limites poucos definidos, crescimento rápido, capacidade elevada de se infiltrar em outros tecidos gerando metástase (DE ASSIS et al., 2011).

É uma doença grave e de alto comprometimento para o ser humano, representando a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento (MATTIUZZI et al., 2020) e 3% dos casos registrados anualmente em todo o mundo. Trata-se de uma situação patológica clínica e grave, na qual a doença é provocada por uma neoplasia classificada como maligna (FENG et al., 2021).

Caracterizado como uma doença genética, o câncer é causado por mudanças nos genes que controlam o metabolismo celular, especialmente alterando como elas crescem e se dividem. Para que a neoplasia se desenvolva, fatores genéticos e ambientais estão envolvidos (BLACK; MCGRANAHAN, 2021). Neste sentido, a poluição industrial, ambiental e os agentes envolvidos na produção alimentar são fatores de risco de potencial elevado, que agem através da exposição a longo prazo afetando a saúde humana (INCA, 2019; MUKHERJEE et al., 2021). Por outro lado, estudos sugerem que a doença pode ser deflagrada pela exposição a determinados tipos de radiação, substâncias químicas carcinogênicas, vírus oncogênicos, doenças pré-malignas como gastrite atrófica e condiloma por HPV 16 e 18 (FERLAY et al., 2021; COX et al., 2021). Estudos demonstraram que a exposição prolongada e o contato com esses fatores de risco, através da pele, inalação ou ingestão podem induzir inflamação e promover o desenvolvimento de doenças como síndrome metabólica, cardiovasculares e principalmente o câncer (WU et al., 2016; COX et al., 2021).

Quando o organismo não consegue se defender desses agressores, sejam eles externos ou internos, fica vulnerável à mutação das células, favorecendo o surgimento da doença, através desse desequilíbrio (COX et al., 2021).

Além disso, a neoplasia pode se desenvolver em qualquer parte do corpo (INCA, 2019), cada órgão pode ser afetado por diferentes tipos de câncer, estes se

diferenciam frente ao grau de agressividade, influenciando nas diferentes faixas etárias, a partir dos subtipos anatômicos e moleculares que exigem estratégias de gerenciamento específicas para o controle dos impactos socioeconômicos provocados pelo elevado índice de morbidade e custo com o tratamento. Neste sentido, pesquisas relacionadas a prevenção ou tratamentos menos custosos, gera grande expectativa na sociedade (WHO, 2020; SIEGEL et al., 2022).

3.1.1 Epidemiologia do câncer

De acordo com os registros da pesquisa realizada por SUNG et al (2020) sobre todos os cânceres desenvolvidos, um percentual de 64% deles ocorre antes dos 70 anos. Essa informação corrobora aos dados da WHO (2020), que mantém a mesma faixa etária como limite estabelecido para o desenvolvimento da doença. Entre as doenças com etiologia infecciosa, estima-se que entre 8 e 17% estão ligadas ao câncer, sendo o desenvolvimento deste, relacionado as infecções crônicas causadas por parasitoses, bactérias e vírus (SUNG et al., 2020; FERLAY et al., 2021).

Por outro lado, estudos apontam que deficiências ambientais e socioeconômicas de algumas populações) estão relacionadas ao desenvolvimento rápido da doença (HU et al., 2019; MARTINS, 2020. A falta de informações sobre os fatores de risco, e de atenção básica a saúde ampliam os índices de câncer de colo do útero e de estômago nessa população menos favorecida, podendo evoluir ao óbito. (PERVAIZ; FAISAL, 2020; FARIAS et al., 2021). Neste sentido, o desequilíbrio socioeconômico desfavorece as populações e são considerados responsáveis pela manutenção de muitas doenças, inclusive o câncer, aumentando as estatísticas de incidência e mortalidade da doença (BRAY et a., 2012; HU et al., 2019).

No Brasil o perfil epidemiológico é tão grave quanto o de outros países da América latina, onde o câncer de pele não melanoma lidera o ranking de incidência em homens e mulheres (INCA, 2019). Seguindo a escala decrescente da incidência de câncer no Brasil, em segundo lugar, o câncer de próstata é o mais comum em homens, atingindo cerca de 28,6% deles, seguindo pelo câncer de pulmão 8,1% e o câncer de intestino 7,8%. Neste mesmo sentido, nas mulheres o segundo tipo mais comum de câncer é o de mama, atingindo cerca de 28,1% da população feminina. Em terceiro lugar o câncer de intestino atinge aproximadamente 8,6% e o de colo do útero 7,9% (SWERDLOW et al, 2008; BRAY et al., 2010; INCA, 2015).

De acordo com os dados obtidos por Rahman (2008), o câncer de próstata representa a terceira maior causa de morte entre os homens, em todo o mundo, com um aumento da incidência bastante significativo. No Brasil a doença também é a segunda causa de morte em homens, enquanto as mulheres sofrem mais com o câncer de mama, de colo do útero, do estômago e câncer retal (LIMA et al, 2013; INCA 2015; SOUZA et al, 2016).

Frente ao exposto, a incidência de câncer é alta e representa um problema de saúde pública de alto custo financeiro para as instituições públicas e privadas. Os registros de diagnósticos da última década apontaram o aumento de 20% da incidência (INCA 2015). Esses diagnósticos são ocasionados pelo aumento e envelhecimento da população, a falta de conhecimento dos fatores de risco agravando o status da doença a nível mundial (GULLETT et al., 2010; LOPEZ et al., 2016).

Contudo, a maior incidência do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento. Devido principalmente a fatores de riscos como infecções, falta de saneamento básico e a ausência de políticas públicas em relação à saúde e a educação (PORTA et al, 2010; GHONCHEH et al., 2015; MAHDAVIFAR et al., 2016). O instituto Nacional do Câncer estimou para 2016 e 2017, 394.450 novos casos de câncer no Brasil, sendo que 190.520, representando 48% desse total, em mulheres e 203.930 casos em homens, representando um percentual de 52% do valor total de novos casos (INCA 2015). Em decorrência disso, a mortalidade por consequência do câncer ainda é muito alta. A taxa mundial aumentou durante o século XX, quando foi considerado um fenômeno principalmente ligado a epidemia do tabagismo. A doença atingiu o pico em 1991 com 215 mortes para cada 100.000 pessoas. Entre os anos de 1991 e 2012, houve uma diminuição, a taxa caiu para 23% com a redução do tabagismo e as melhorias como a detecção precoce da doença, assistência no tratamento, aumentando a sobrevida do paciente (SIEGEL et al., 2022).

No estudo realizado por Who, (2015), foi possível observar que em 2015 um total de 8,8 milhões de mortes se deu em consequência do câncer. De acordo com os registros do ano anterior realizado por Ferlay et al, (2014), os dados apontaram 14,1 milhões de novos casos, 8,2 milhões de mortes e 32,6 milhões de indivíduos vivendo com câncer em todo o mundo. Além disso, uma alta taxa de indivíduos em situação socioeconômica inferior não sobrevivem após o diagnóstico da doença, geralmente detectada em estágio muito avançado e sem que os portadores recebam tratamento

adequado em tempo hábil para controle e cura da neoplasia (FERLAY et al., 2014; SARANATH, KHANNA 2014).

Neste mesmo sentido, algumas pesquisas atribuem ao câncer a maior participação na morbidade e mortalidade, principalmente nos países mais desenvolvidos (HASSANIPOUR-AZGOMI et al, 2016; SOUZA et al, 2016), onde as chances de desenvolver a doença evoluem com o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento global da população (BRIGANTI et al., 2013; DASKIVICH et al., 2013; LÓPEZ et al., 2016; DE SOUZA et al, 2016).

A Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer, Ferlay et al, (2014) ressaltou que os países em desenvolvimento são desproporcionalmente mais afetados pelo crescimento da doença e mais de 60% dos casos incidem na África, na Ásia e nas Américas do Sul e Central, contabilizando cerca de 70% das mortes causadas pela doença nessas regiões. Segundo LÓPEZ et al, (2016) a OMS registrou em 2010 que 7,6 milhões de pessoas morreram em 2008 em consequência do câncer e estima-se que até 2030 mais 13.1 milhões de pessoas morrerão com a doença (MADDAMS et al., 2012; FERLAY et al., 2014; WHO, 2015). Segundo a OMS (2014), a taxa de mortalidade pelo câncer no mundo aumentará drasticamente para 14,6 milhões até o ano de 2035.

3.1.2 Etiopatogenia do câncer

O câncer é uma enfermidade grave e de alta complexidade e pode ser iniciada por uma ação combinada de vários fatores que estão inter-relacionados e nem sempre o dano induzido pelo DNA é o responsável pelo desenvolvimento da doença (KAUR 2011; PORTA et al., 2011). Os efeitos combinados de substâncias químicas como alguns tipos de benzenos, arsênio, cádmio, substâncias radioativas, naftaleno e resíduos de agrotóxicos, são os principais responsáveis por diversos tipos de câncer (MADIA et al., 2019).

Por outro lado, a ação de agentes externos como a radiação contribuem e potencializam o desenvolvimento da doença, estes fatores estão associados ao modo de vida de cada cultura. Essa exposição frequente a agentes radioativos, como a própria radiação de faixa A emitida pelo sol, podem alterar os genes, levando ao desenvolvimento do câncer (MILLER et al., 2017).

A neoplasia também está relacionada a infecções crônicas, correspondendo de 8 a 17% da carga dessas doenças com etiologia infecciosa (GOODSON et al., 2015; MILLER et al., 2017; HARDONNIÈRE et al., 2017).

Dentre elas, destaca-se o vírus do papiloma humano (HPV), conhecido por causar câncer de colo do útero, ânus, vulva, pênis, orofaringe, cabeça e pescoço, este vírus circula comumente entre jovens (PUMIPUTAVON et al., 2017). Além dos vírus da hepatite B e C (VHB e HCV), o vírus linfotrófico de células T humanas (HTLV) e sarcoma de Kaposi's (KSHV), também estão relacionados à carga mundial do câncer (MARTIN, et al., 2008; HAUSEN 2009; PUMIPUTAVON et al., 2017; HATTA et al., 2021).

Quanto às causas externas relacionadas à exposição direta a agentes agressores, as causas internas são na maioria das vezes geneticamente pré-determinadas e influenciadas por condutas hormonais e mutações, e estão ligadas à capacidade que o organismo tem para desenvolver doenças, ou para se defender das agressões externas que podem ou não originar tumores malignos (WHO 2015; INCA 2015; HARDONNIÈRE et al., 2017).

As causas prováveis para o desenvolvimento de tumores malignos podem estar relacionadas com a instabilidade genética, possivelmente, o desenvolvimento do câncer seja decorrente da transformação celular, a doença se desenvolve como uma consequência do envolvimento e do comprometimento do crescimento celular, resultando em uma proliferação descontrolada de células que invadem os tecidos vizinhos (ANAND et al., 2008; INCA 2015; HATTA et al., 2021).

O processo de formação do câncer ou carcinogênese ocorre lentamente, podendo levar alguns anos para a célula neoplásica se proliferar, ou formar um tumor capaz de ser clinicamente detectável. Esse processo se inicia pela ação dos efeitos cumulativos de diferentes agentes carcinógenos, responsáveis pela iniciação, promoção e progressão do tumor. O processo da carcinogênese é composto em três estágios; Iniciação, promoção e progressão, e culminam na formação tumoral (SPANDIDOS, 2007; INCA, 2015).

3.1.2.1 Estágio de iniciação

No primeiro estágio o agente iniciador ou oncoiniciador é capaz de provocar o dano genético diretamente nas células. Geralmente, esse processo se dá com a ajuda

de agentes que atuam no DNA da célula. Os fatores que promovem este processo de iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados de agentes oncoaceleradores ou carcinógenos como o fumo, este é um agente carcinógeno completo por possuir componentes que atuam nos três estágios da carcinogênese (KUMMAR et al., 2004; OLIVEIRA, 2007). Nesta fase, ainda que as células sofram as alterações genéticas, o tumor não pode ser detectado clinicamente (OLIVEIRA et al., 2007).

3.1.2.2 Estágio de promoção

No segundo estágio, chamado de promoção é logo após o processo de iniciação da carcinogênese, quando as células já "iniciadas", ou geneticamente alteradas, sofrem o efeito dos agentes cancerígenos, classificados como oncopromotores, elas são transformadas em células malignas de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é preciso um contato contínuo com o agente promotor. É possível também, que a suspensão do contato com os agentes promotores da carcinogênese interrompa o processo durante o estágio. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas (KUMMAR et al., 2004; OLIVEIRA, 2007).

3.1.2.3 Estágio de progressão

A progressão, é o último estágio do desenvolvimento do câncer, quando a doença está totalmente caracterizada, nesse é possível observar o tumor maligno em desenvolvimento, através da multiplicação descontrolada e irreversível das células bastante alteradas. Nesse estágio, o câncer continuará evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. A **Figura 1** representa as etapas iniciais e a sequência do desenvolvimento do câncer (OLIVEIRA, 2007).

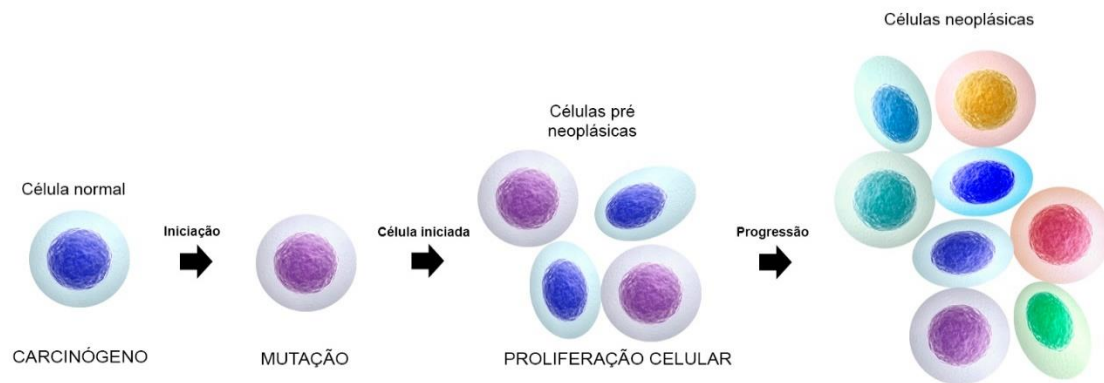


Figura 1: Representação das etapas de desenvolvimento do câncer.

3.1.2.4 Crescimento tumoral

Durante o crescimento tumoral, tanto as células cancerosas quanto as normais, se dividem mais rapidamente quando o volume tumoral é menor. Quando o volume tecidual é maior, mais lentamente as células se proliferam, porque, a fração proliferativa do tumor decresce à proporção que ele avança, aumentando seu tempo de duplicação (**Figura 2**). Um tumor apresenta tempos diferentes de duplicação em momentos diferentes de sua história natural. Quanto menor o tumor, maior a ação antiproliferativa e mais sensível será aos tratamentos (INCA 2015).

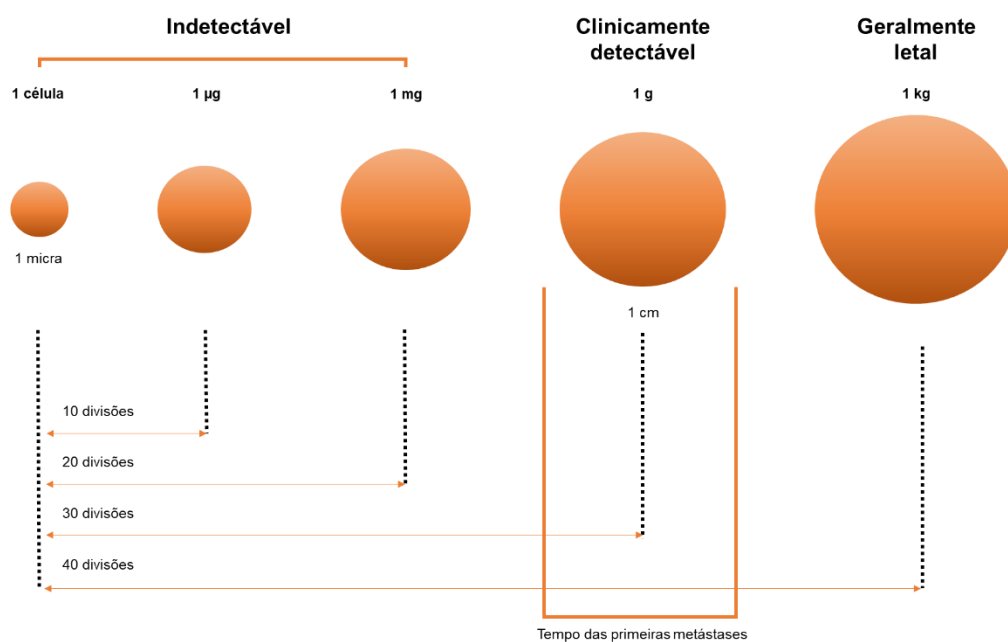


Figura 2. Imagem representativa do crescimento tumoral. Fonte: www.inca.gov.br

Além disso, mecanismos moleculares estão envolvidos na indução do crescimento descontrolado de células cancerosas. A expressão de cinases dependentes das ciclinas (CDK 4, 6, 1, e 2) e a subexpressão de proteínas supressores de tumor (p53) têm sido comumente observados em tecidos. Além disso, várias proteínas reguladoras do ciclo celular, tais como inibidores de CDK (CKIs) p21, p27, e p57, também estão envolvidas e são desreguladas ou induzidas para condições malignas ou cancerosas (WILLIAMS et al., 2012; KASI et al., 2016).

3.1.2.5 O ciclo celular

A vida da célula compreende uma sequência de eventos chamado de ciclo celular, esses eventos correspondem às cinco fases: G1, S, G2, M e G0 com duração variável até mesmo nas células que estão sob multiplicação controlada, no entanto, os processos ocorridos no interior das células são iguais para todas elas (OLIVEIRA, 2007).

3.1.2.6 Controle do crescimento tumoral e morte celular

Dentre os tipos de controle de proliferação tumoral, destaca-se o Ki67, trata-se de uma proteína nuclear, encontrada principalmente, na primeira fase do ciclo celular (G1), não ocorrendo apenas na fase G0, que tem como objetivo a marcação das células ciclantes (FARATIAN et al., 2009; PLESAN et al., 2010).

O Ki67 está intimamente associado com o dimensionamento da fração de crescimento tumoral sendo que, este antígeno não é expressivo nas fases de reparação do DNA ou na fase de repouso proliferativo celular (TAN et al., 2005; MROUJ et al., 2021).

Diversos tipos de morte celular são descritos, a exemplo da apoptose, autofagia e ou necrose, todos envolvidos na fisiopatologia do controle celular (KRYSKO et al., 2008). A apoptose funciona como uma barreira, impedindo que as células tumorais sobrevivam e proliferem no organismo, ocorrendo em diversas situações fisiopatológicas, com finalidade de eliminar células impróprias ou comprometidas, principalmente quando provenientes de lesão no DNA. Células morfollogicamente modificadas, com fragmentação ou condensação do núcleo e ou do DNA, indicam indução de morte através da apoptose (KUMAR et al., 2005; CASTILLO-FERRER et al., 2021).

Na apoptose a desintegração da membrana plasmática e a indução da inflamação no entorno das células mortas, causam a liberação da substância celular que caracteriza morfológicamente esse processo. Diante disso, o resultado da aparência morfológica provém da desnaturação das proteínas intracelulares, além da digestão enzimática e, da catástrofe bioenergética por depleção de ATP que causam a inviabilidade de sobrevivência das células (KUMAR et al., 2005).

3.2 Modelo aplicado ao estudo do câncer

Nas últimas décadas o êxito das pesquisas se deve a aplicação de metodologias mais rápidas e eficazes. Muitos estudos inclusive sobre o câncer são beneficiados pela disponibilidade dos diferentes modelos experimentais que viabilizam a análise das diversas formas em que a doença se apresenta, facilitando as respostas e informações sobre as alterações genéticas e epigenéticas do câncer através de testes de drogas anticancerígenas com esses modelos. As neoplasias de modo geral são resultantes de múltiplos eventos celulares com transformações malignas que precisam ser aprofundadas (VAN et al., 2009).

Dentre os estudos difundidos está o desenvolvimento de tumores primários de diferentes linhagens celulares de câncer em modelo animal geneticamente modificado (BURDALL et al., 2003; VARGO-GOGOLA, ROSEN 2007). Nesse tipo de estudo os modelos aplicados são mais viáveis e podem fornecer informações sobre a complexidade do câncer e os mecanismos biológicos envolvidos, que contribuem para o seu desenvolvimento. Desse modo, o tempo é reduzido e o objetivo do estudo alcançado, podendo proceder novos testes ou tratamento adequado (ENGEL et al., 1978; KAMIOKA et al. 1999; LEONETTI et al., 2006; LEE et al., 2009; FERREIRA, 2013).

3.2.1 Modelo de transplantação de Sarcoma 180

O Sarcoma 180 (S-180) ou Tumor de Crocker é um tumor indiferenciado que se desenvolveu em ratos albinos machos e foi encontrado em 1914. Esse tipo de linhagem celular ATCC (*American Type Culture Collection*), vem sendo mantida há muito tempo e por ser considerado um modelo válido para avaliar os efeitos de antitumorais de moléculas em fase de testes clínicos. As células ascíticas são transplantadas por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, crescem

rapidamente e alcançam um percentual de 90% a 100% dos animais com elas inoculados (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2005; KAUR et al., 2011).

O tumor foi inicialmente chamado de carcinoma por se apresentar na axila direita de um camundongo albino, como uma massa sólida. Inicialmente, foi classificado como carcinoma mamário e, a partir de múltiplas transplantações subcutâneas os estudos foram delineados para observar suas características morfológicas através do comportamento; observou-se que eram característicos de um sarcoma passando então, a ser chamado de Sarcoma 180 (FERREIRA et al., 2013; CRUZADO et al., 2017).

3.3 Quimioprevenção

A alta incidência de câncer inclui protocolos efetivos no tratamento da doença. As cirurgias associadas às quimioterapias, radioterápicos e uso de anticorpos monoclonais tem melhorado os resultados dos tratamentos de alguns tipos de câncer, por outro lado, eles não são efetivos em todos os tipos da doença e geram altos custos para os cofres públicos (CRAGG, NEWMAN, 2005; BUTLER, 2008; COSTA–LOTUFO et al., 2010).

A quimioterapia é um tratamento sistêmico com fármacos que atuam contra o câncer impedindo a reprodução celular e levando as células malignas à morte. Os quimioterápicos convencionais geralmente são de origem sintética. Esse tipo de medicamento mesmo sendo específico para as células cancerígenas atinge também as células normais, e seus efeitos colaterais são muito graves, limitando e inativando a qualidade de vida dos pacientes e para atividades normais do dia a dia (DEVITA et al., 2008; GURUNG et al., 2010).

A quimioterapia teve início na década de 1940 com o primeiro uso sendo baseado na ação do gás de mostarda e nitrogênio além de drogas antifolatas. Após isso, a busca e descoberta de drogas mais eficientes nos tratamentos contra o câncer ficou mais acelerada em todo o mundo (BUTLER, 2008; GIUSEPPE, 2018).

A partir do ano de 1950, as drogas anticâncer foram produzidas a partir de plantas medicinais com compostos alcaloides: alcaloide vinca vimblastina (Velban) e vincristina (oncovin), além do isolamento de filotoxinas citotóxicas. A adição mais recente de agentes anticâncer derivados de plantas medicinais são os taxanos (BUTLER, 2008). O Paclitaxel também conhecido como Taxol e o docetaxel são as

drogas semissintéticas mais utilizadas nos tratamentos contra o câncer (VARMA et al., 2009; CRAGG, 2012; YANG et al., 2020).

Estudos da quimioprevenção com agentes naturais são uma promessa futura com expectativas no avanço e controle do câncer (BAPTSTELLA et al., 2021). A ação quimiopreventiva em modelo roedor com produtos apícolas e substâncias derivadas de plantas medicinais apresentou bons resultados (KATIYAR et al., 2010; COSTA-LOTUFO et al., 2015). A administração oral do chá verde, rico em polifenóis, gerou expectativa positiva ao suprimir o aparecimento dos tumores experimentalmente induzidos em modelos animais (KATIYAR, 2010).

Por fim, estudos epidemiológicos são exímios em afirmar que o aumento da ingestão de chás, vinho tinto, frutas e vegetais na dieta de um indivíduo podem estar associado a um menor risco em desenvolver doenças degenerativas como câncer (WALI et al., 2019, DUTTA et al., 2019), justificando a atuação biológica dos produtos naturais como um agente profilático. Assim, é possível presumir que os produtos naturais, análogos ou combinações destes poderão ser utilizados no futuro como agentes quimiopreventivos (ALHAZZAZI et al., 2011).

Nas últimas décadas os estudos avançaram com o objetivo de descobrir novas substâncias com ação quimioprotetora, com potencial clínico, atividade multialvo e baixa toxicidade. Por este motivo, fármacos antitumorais vêm sendo testados para a comprovação da eficácia clínica de suas substâncias tornando possível tratar o câncer sem afetar as células normais, minimizando os efeitos agressores ao organismo (MIKSTACKA et al., 2008; VARMA, 2009; CAVALCANTE et al., 2011; BELCARO et al., 2014; LI et al., 2015).

3.4 Tratamento convencional e alternativo

3.4.1 Radioterapia

A radioterapia foi criada a partir de um método que utiliza radiações ionizantes localizadas para o tratamento contra a estrutura tumoral. A emissão destas radiações forma feixes de elétrons que ao entrarem em contato com as células tumorais liberam uma grande quantidade de energia ionizante. Esta energia atua interferindo na capacidade metabólica da célula e consequentemente na sua taxa de proliferação através de mecanismos que promovem a morte celular a partir da desnaturação da

cadeia de DNA e de diversas outras moléculas essenciais para o metabolismo celular (INCA, 2019; IQBAL et al., 2021).

O tratamento com a radioterapia visa atingir uma área específica, podendo ser direcionada a um determinado local ou ampla, ocorrendo em outra região tecidual. Desta forma, alguns fatores importantes devem ser pontuados durante a escolha do tipo de radiação e do tempo de duração de sua administração. Estes são: a tolerância dos tecidos normais durante a aplicação da radiação, a sensibilidade das células tumorais a radiação, o local de sua ocorrência e a sua oxigenação. Por isso, a utilização de doses diárias fracionadas promove equilíbrio entre a taxa de morte das células tumorais (regressão tumoral) e tolerância dos tecidos normais ao tratamento (LIERMANN et al., 2022).

As radiações ionizantes utilizadas para o tratamento podem ser originadas por meio de fonte elétrica ou por isótopos radioativos. As fontes elétricas geram radiação X e elétrons que são aplicados como tratamentos externos, devido à distância da área de atuação em que a radiação é emitida. Já os radioisótopos, que geralmente são formados a partir de elementos químicos (césio, cobalto etc.) que frequentemente produzem radiação gama. Estes elementos são introduzidos nas cavidades e interstício a partir de diversas aplicações terapêuticas como fios, placas, tubos e agulhas (INCA, 2019).

O tratamento por radioterapia é comumente bem tolerado pelos pacientes que fazem uso desta terapêutica, produzindo efeitos adversos geralmente reversíveis. As desvantagens estão relacionadas à sensibilidade das células tumorais ao tratamento que influencia diretamente na adequação da dose terapêutica e tolerância das células normais, bem como no prognóstico de cura do câncer. Avanços tecnológicos nos campos do diagnóstico associados a terapia alvo visam promover a radioterapia como um processo de tratamento individual que aumente as chances de cura dos pacientes oncológicos (ALLEN et al., 2017; LIERMANN et al., 2022).

3.4.2 Quimioterapia Antiplástica

O tratamento quimioterápico está relacionado a utilização de fármacos que atuam interferindo no metabolismo celular e alterando os mecanismos de proliferação das células. Dentre as principais classes de quimioterápicos aplicados nos tratamentos contra o câncer estão os inibidores da mitose, os antibióticos antitumorais, alquilantes

e os antimetabólitos. Estas intervenções geralmente afetam diretamente o ciclo celular em sua fase de divisão, mais precisamente interferindo na síntese ou replicação dos ácidos nucleicos e impedindo a migração cromossômica durante a metáfase (MILLER et al., 2016; BRESSAN et al., 2021).

Geralmente é necessário utilizar classes combinadas de quimioterápicos para obter um resultado mais efetivo no tratamento. Isto ocorre devido a existência de medicamentos que atuam em células que estão em processo de divisão celular (ciclo não-específico), os que atuam especificamente em uma fase do ciclo de divisão celular (fase-específico) e os que atuam unicamente em células que estão em divisão celular (ciclo-específico). Estas associações com diferentes classes de quimioterápicos proporcionam uma maior eficácia nas doses terapêuticas dos tratamentos e reduzem a resistência dos pacientes aos quimioterápicos (INCA, 2019).

Mesmo sendo um tratamento eficaz, a quimioterapia não apresenta seletividade pelas células tumorais, atingindo também as células normais do paciente. O que pode ser considerado como vantagem deste tratamento para as células normais é que elas apresentam uma frequência metabólica quantitativa de proliferação celular inferior às células tumorais. Porém, tecidos que apresentam taxas proliferativas altas, como a medula óssea e epitélios do sistema digestivo, são os mais acometidos pelos efeitos citotóxicos destes fármacos quimioterápicos. Desta forma, se faz necessário administração do tratamento em intervalos cíclicos que permitam reversão destes efeitos citotóxicos nas células normais (BRESSAN et al., 2021).

3.4.3 Cirurgia

O processo de tratamento a partir da cirurgia é utilizada há mais de um século como uma das principais formas de tratamento do câncer. Esta neoplasia é considerada uma doença sistêmica, mas quando diagnosticada no início ou quando o tumor ainda se apresenta em uma área restrita de um tecido ou órgão (tumores sólidos), sua ressecção pode levar a cura do paciente ou prolongamento de sua vida (DOMINGOS et al., 2021).

Conforme avança a tecnologia das técnicas cirúrgicas, a evolução nas últimas décadas teve papel fundamental em uma melhora considerável no planejamento dos procedimentos em geral, como também, um avanço na preparação dos pacientes relacionada às modificações morfológicas e fisiológicas que ocorrerão decorrentes do

tratamento. Desta forma, a recomendação para o tratamento cirúrgico de um câncer deve levar em consideração os aspectos gerais da saúde do paciente e o tipo de câncer a ser tratado. Paradoxalmente, estudos têm demonstrado que o trauma e a resposta inflamatória parecem gerar o aparecimento de focos metastáticos (INCA, 2019). Essa resposta adversa parece estar relacionada com a liberação massiva de fatores de crescimento inflamatórios, que estimulam a proliferação celular, bem como de citocinas pró-angiogênicas, necessárias para o processo de reparo (DOMINGOS et al., 2021).

A técnica cirúrgica pode ser dividida em curativa, redutora e paliativa. A técnica curativa é utilizada em estágios iniciais da doença, onde o tumor pode ser removido por completo. A técnica redutora deve ser empregada como adjuvante a outras formas de tratamento (quimioterapia e radioterapia) aumentando as perspectivas de efetividade destes tratamentos. A redução do volume do tumor deve respeitar as condições fisiológicas e funcionais do órgão e tecidos adjacentes. A técnica paliativa é utilizada quando a opção de cura é muito baixa ou inexistente, este método se apoia no controle dos sintomas promovidos por tumores em estágios avançados, o que pode reduzir os riscos de metástase (INCA, 2019).

3.4.4 Quimioterapia Adjuvante

A busca pelo entendimento e aplicação de novos tipos de tratamento contra o câncer é crescente e muitas inovações tecnológicas vem sendo evidenciadas neste contexto. Ações terapêuticas baseadas em moléculas específicas contra as células tumorais promovem perspectivas e proporcionam avanços significativos no tratamento do câncer. Entre as novas terapêuticas frequentemente divulgadas na literatura destaca-se a terapia alvo associada à nanotecnologia. Tendo em vista que essa nova perspectiva de combate ao câncer está relacionada a tratamentos adjuvantes, o alto investimento em novos medicamentos sintéticos vem sendo substituído pelo aproveitamento de medicamentos já existentes no mercado. Estes são submetidos a alterações estruturais em suas moléculas e são testados contra o câncer. Por este motivo a busca por fármacos que derivam de fontes naturais se tornam uma alternativa viável para promoção de novas terapêuticas contra o câncer (VANNEMAN; DRANOFF, 2012; SIMÕES et al., 2015).

Os tratamentos adjuvantes estão sendo cada vez mais procurados pelos pacientes. Entre as terapias adjuvantes, destacam-se os produtos derivados de elementos naturais. Independentemente do tipo de tratamento aplicado, os produtos naturais e seus derivados tornam-se subsídios essenciais na investigação de novas terapêuticas contra o câncer. Dentre as diversas fontes naturais existentes, as plantas medicinais estão em evidência por apresentarem a maior diversidade de princípios ativos que podem ser utilizados para a formulação de novos fármacos. Os fitoterápicos e fitofármacos estão sendo utilizados para tratar cerca de 87% das enfermidades humanas, entre estas as bacterianas, distúrbios da coagulação, parasitárias, imunopatias e cânceres (NEWMAN et al., 2003; MABOU TAGNE et al., 2018).

3.5 Produtos naturais

Os produtos naturais estão disponíveis em abundância na natureza. A biodiversidade desses produtos favorece e possibilita a descoberta de substâncias biológicas de cunho terapêutico (DZOBO, 2022). Esse tipo de produto, principalmente as plantas, tem sido utilizado por diferentes povos desde a antiguidade. Seu uso como fonte de cura e tratamento de doenças era comum em países como a China, Egito e Grécia (DZOBO, 2022).

Na prática, a difusão de conhecimento empírico detido pelos povos ao longo do tempo sobre a ação biológica das plantas fortalece a importância de estudos na área medicinal (SELOGATWE, et al., 2021). As plantas e outros organismos naturais são valorizados pela habilidade em aliviar a dor e curar outras enfermidades (KUMAR et al., 2014; CHAVAN et al., 2015). O alívio da dor e a perspectiva de cura causados através da ingestão de preparados como xaropes e infusões com esses produtos era, provavelmente, uma das primeiras formas de utilização de fármacos naturais no tratamento de doenças (SAKARKAR, DESHMUKH 2011).

Segundo a OMS as ervas medicinais ainda são utilizadas como fonte de saúde primária por 80% das pessoas que moram em comunidades rurais, para auxílio no tratamento de doenças e a tradição no uso desses produtos vem da eficácia durante o tratamento (CHAVAN et al., 2015; MASULLO et al., 2015).

Os estudos que avaliam os compostos majoritários e a ação biológica dessas substâncias indicam resultados que podem incentivar o desenvolvimento e a produção de novos fármacos (SAKARKAR, DESHMUKH 2011; WALI et al., 2019; DUTTA et al., 2019). Outros estudos informam que os produtos de fontes naturais e seus derivados

correspondem a 50% das drogas utilizadas para tratamento clínico (CRAGG et al., 2009; MISHRA et al., 2011; KUMAR et al., 2014).

Os compostos derivados desses produtos como os flavonoides, iridóides e taninos (PLUMEL, 1991; MOUSINHO et al., 2011; NEWMAN et al., 2012) têm sido testados clinicamente, com o objetivo de oferecer alternativas quimiofarmacológicas, onde agentes antitumorais são o alvo principal de investigações terapêuticas no tratamento e controle da doença (CURTI et al., 2014; KUMAR et al., 2014; MASULLO et al., 2015; CHAVAN et al., 2015).

3.5.1 Produtos Naturais no tratamento do câncer

Embora a introdução de novos fármacos na terapêutica contra o câncer e da aplicação de tecnologias na detecção da doença, as dificuldades no tratamento permanecem. A medicina ainda não dispõe de terapia eficiente e adequada, para agir na eliminação de certos tumores, como os sólidos (VAN DEN BOOGAARD et al., 2022). Além disso, os quimioterápicos sintéticos e a radiação afetam e enfraquecem outros órgãos, destruindo as células saudáveis causando efeitos danosos ao paciente (GUO 2012; VALLI et al., 2012; ZHENG et al., 2021; VAN DEN BOOGAARD et al., 2022).

Nesse contexto, é necessário introduzir no âmbito clínico e hospitalar, novas terapêuticas para o crescente número de pacientes com doenças malignas, que favoreçam no tratamento e controle das doenças neoplásicas (VENTURINI, 2012; COSTA-LOTUFO, et al., 2015). Os agentes de compostos químicos de produtos naturais podem oferecer novas perspectivas de cura futuras (NEWMAN, CRAGG 2007; CHAVAN et al., 2010; MASULLO et al., 2015; SOARES et al., 2016).

As substâncias extraídas de plantas medicinais e outros organismos têm sido testados na terapia antineoplásica com expectativa de cura futura. Quase todas as partes de plantas e os subprodutos contêm ingredientes bioativos com propriedades farmacológicas e respostas terapêuticas. Algumas plantas têm apresentado efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos (LI et al., 2009; MEHTA et al., 2010; CHAVAN et al., 2015; KASI et al., 2016).

Há relatos de mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais sendo testados clinicamente no tratamento de doenças infecciosas, degenerativas ou contra o câncer (KASI et al., 2016; NAVA-TAPIA et al., 2022). Os

derivados desses produtos como flavonoides, terpenos, alcaloides são responsáveis pelas ações adjuvantes, os que mais apresentaram atividade positiva no tratamento contra o câncer tem propriedades farmacológicas que incluem efeitos citotóxicos e quimiopreventivo (CURTI et al., 2014).

Os estudos demonstram que mais de 60% dos pacientes com câncer usam ervas como terapia e mais de 50% dos medicamentos de uso clínico deriva de substâncias naturais (KAUR et al., 2011; KASI et al., 2016). Produtos como frutas e vegetais são estudados como agentes quimioterapêuticos por apresentarem ação antioxidante e antitumoral devido aos compostos polifenólicos, flavonóides, e terpenoides neles contidos (ZHANG et al., 2008; DASHORA; BHAGAT 2011; ZAHAN et al., 2013; HUANG et al., 2018).

Todavia, os tratamentos quimioterápicos ainda são um dos elementares modelos de tratamentos usado no controle das neoplasias, como profilático e contra possíveis metástases, embora as drogas utilizadas apresentem altas taxas de toxicidade na qual tem o potencial de agredir as células sadias (NEWMAN, CRAGG 2020). Os atuais quimioterápicos aplicados no tratamento do câncer foram selecionados por apresentar capacidade de controlar a proliferação de células neoplásicas ainda que atinjam células saudáveis. Dada importância de medicamentos seletivos, estudos identificaram fármacos com atividade específica contra mecanismos metabólicos da célula tumoral e inibição da neovascularização tumoral para induzir a célula a apoptose (COSTA-LOTUFO et al., 2010; MASULO et al., 2015).

3.6 Substâncias Naturais e Câncer

A utilização de produtos naturais para o tratamento de doenças é considerada uma das aplicações terapêuticas mais tradicionais e consolidadas do mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), moléculas com princípios ativos podem ser encontradas em produtos naturais que se tornam importantes para os avanços farmacológicos e criação de novas substâncias, podendo ser úteis de forma direta como agente terapêutico ou como precursores para síntese de bioprodutos (BRASIL, 2009).

Pesquisas recentes demonstram que o uso de produtos naturais para finalidades curativas e preventivas vem aumentando (ZENI et al., 2017; A'ATTIYYAH et al., 2017). Alguns fatores como aspectos culturais, econômicos ou sociais contribuem

para o aumento das buscas por substratos naturais com efeito terapêutico, a utilização destes produtos está difundida em grandes centros comerciais e regiões interioranas (ZENI et al., 2017).

Em 2006, o Ministério da Saúde aprovou através da portaria N° 971, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no sistema único de saúde, ela reconhece a utilização de extratos naturais como um recurso terapêutico para a cura e tratamento de diversas doenças, através da aplicabilidade de diferentes formas farmacêuticas estimulando o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a inclusão social (BRASIL, 2009).

Não obstante, estudos na linha de produtos naturais demonstram que substratos de diferentes biológicas podem ser efetivos para o tratamento antineoplásico e apresentam agentes potenciais para o desenvolvimento de bioprodutos efetivos (LUSTOSA et al., 2008; NUNES et al., 2013; SAÚDE-GUIMARÃES et al., 2014; FROZZA et al., 2017).

A prática da utilização de compostos advindos da natureza para cura do câncer é milenar. Os índios foram os pioneiros na cultura que até tempos modernos se propaga. Em tempos passados, índios americanos com o propósito curativo para o câncer de pele e verrugas veneras, faziam uso da mandrágora americana, isto devido a presença de um composto nomeado de podofilotoxina posteriormente descoberto. Consolidada a prática da utilização de produtos naturais, em 1958 foi evidenciada a presença de vinblastina e vincristina em *Catharanthus roseus*, também conhecida por vinca de Madagascar, estes compostos apresentaram potente atividade citotóxica e antitumoral, fazendo com que estes contribuíssem significativamente para o tratamento antineoplásico e a disseminação da prática da utilização de produtos naturais para esta finalidade (MANN, 2002).

3.7 *Opuntia ficus-indica*

A *Opuntia ficus-indica* (OFI) é uma espécie de cacto nativo das regiões desérticas do México e distribuído em muitas áreas do mundo, este fato ocorre devido a facilidade de manutenção e seus benefícios agrônômicos e ecológicos, além de suas extensas atividades funcionais, nutricionais e biológicas. Diversas partes deste espécime, incluindo a polpa, casca, frutas e sementes apresentam potenciais

terapêuticos evidenciados na literatura e são seguras para uso humano (TILAHUN; WELEGERIMA. 2018; SALEHI et al., 2019; SILVA et al., 2021).

A atividade antioxidante obtida da polpa da *Opuntia ficus-indica* foi investigada por SALEHI et al. (2019), que a partir do método colorimétrico de captura de radicais livres, DPPH, evidenciou que devido ao alto teor de compostos fenólicos e o extrato apresentou 82% de captura dos radicais livres em uma concentração de 400 µg/mL, demonstrando forte atividade antioxidante proveniente de compostos presentes no espécime. Além disso, outro estudo realizado por ARUWA et al. (2019), elucidou que além da atividade antioxidante, o fruto da OFI também apresentou atividade bactericida frente a testes com cepas de bactérias Gram negativas e Gram positivas.

Outras propriedades biológicas como potencial efeito ansiolítico e anestésico foram estudados na pesquisa realizada por AKKOL et al. (2020). No trabalho, os autores confirmam a redução da atividade neural após administração do extrato do fruto da OFI, a partir de ensaios como o teste de tração, teste da lareira e teste do labirinto. Em outro sentido, foi possível observar expressiva atividade anti-inflamatória promovida pelo extrato hidroalcolólico do fruto da OFI e corrobora ao extensivo potencial biológico devido ao arsenal de compostos bioativos e facilidade de aquisição (OTALORA et al., 2019).

Entre os metabolitos secundários que frequentemente apresentam atividade antitumoral, destaca-se a betanina (CHEN et al., 2021). A substância é descrita como o principal componente responsável pelo pigmento vermelho da beterraba e do fruto da OFI (OTALORA et al., 2019). Este composto vem sendo utilizado em estudos que demonstram atividade antitumoral sobre células do glioblastoma e do adenocarcinoma mamário (NOWACKI et al., 2015; SALIMI et al., 2021). Além disso, a betanina promoveu um aumento no processo de apoptose contra linhagens de células K562 responsável pela leucemia mieloide crônica humana, células U87MG de glioma humano e células SCC131 e SCC4 de carcinoma epidermoide oral humano (SREEKANTH et al., 2007; SALIMI et al., 2021; ZOU et al., 2022).

3.7.1 Composição Química

O cládudo da *Opuntia*, que são formados por ramos de caule modificados contém clorofila e grande quantidade de água armazenada internamente e funcionam como folhas na sua função fotossintética, contém D-glucose, D-galactose, Larabinose, D-xilose, L-ramnose e ácidos D-galacturónico e glucurónico (SEPULVEDA et al., 2013; EL-MOSTAFA et al., 2014). Açúcares de hexoses estão presentes entre 8-85% (m/m) e pentoses em 0,98% (m/m) (KAUR et al., 2012). No fruto da OFI importantes compostos bioativos são encontrados, tais como betalaínas, polifenóis e carotenóides (EL-MOSTAFA et al., 2014). Além disso, o fruto representa uma fonte de ácido ascórbico, maleico, malónico, succínico, tartárico e oxálico. Também contém quantidades expressivas de vitaminas C, B1, B6 vitamina E, vitamina A (EL-RAZEK; HASSAN, 2011) e minerais como: cálcio, magnésio, sódio e potássio, fósforo e ferro (CHITEVA; WAIRAGU, 2013).

3.7.2 Aplicações Medicinais

O grande número de nutrientes e compostos ativos e suas propriedades multifuncionais faz da planta do gênero *Opuntia* uma candidata ideal para a promoção da saúde. Um estudo realizado por AHMAD et al. (1996) demonstraram que a administração de extrato do cládudo (*Opuntia streptacantha*) em ratos, cavalos, e seres humanos inibe a replicação intracelular de um certo número de DNA e RNA-vírus, tais como vírus herpes simplex tipo 2, vírus de herpes equino, vírus da pseudo-raiva, vírus da influenza, e de HIV-1. O extrato etanólico do cládudo da *Opuntia ficus-indica* foi avaliada para determinar os mecanismos de atividade antioxidante, assim como, demonstrou uma inibição dependente da oxidação do ácido linoleico em um sistema de ensaio com tiocianato. Além disso, o extrato mostrou atividade para eliminação de radicais livres de dose-dependente, incluindo os radicais DPPH, superóxido, e radicais hidroxila, utilizando diferentes sistemas de ensaio. Finalmente, o extrato de *Opuntia* foi caracterizado como contendo uma elevada quantidade de compostos fenólicos (180,3 mg/g), que podem ser os compostos ativos responsáveis pelas propriedades antioxidantes (LEE et al., 2002).

Estudos sugerem que extratos obtidos a partir da fruta da *Opuntia ficus-indica* inibe a proliferação de linhas de células com câncer de colo de útero in vitro, e suprime o crescimento de tumores de câncer do ovário em ratos in vivo (ZOU et al., 2005). A

administração intraperitoneal de solução do extrato do cacto em ratos não afetou o peso corporal do animal, o que indicou que cacto não têm um efeito tóxico significativo em animais. A inibição do crescimento das células cultivadas de câncer foi associada com um aumento das células apoptóticas e a paragem do ciclo celular na fase G1 (para muitas células, esta fase é o maior período de crescimento celular durante a sua vida útil). A inibição do crescimento parece dependente da via p53, que é a principal supressor de tumor. Anexina IV aumentou e o VEGF diminuiu no tecido do tumor obtido a partir de animais que receberam a solução de cactos (ZOU et al., 2005).

LIANG et al. (2008) estudaram a possibilidade de polissacáridos extraídos do fruto de *Opuntia* na inibição da proliferação de células tumorais da cervix, ovário e bexiga e suprimindo o câncer de ovário em ratos portadores de S180. O índice timo foi significativamente maior nos grupos de polissacarídeos de dose média e alta do que o grupo controle. Estudos *in vitro*, diminuíram a viabilidade de células cancerígenas da próstata, cólon, mama, e de células hepáticas cancerígenas, utilizando extratos de nove frutos pertencentes ao género *Opuntia* sem afetar a viabilidade de fibroblastos normais. As diferenças nos efeitos anticancerígenos entre os extratos testados foram atribuídas às variações no seu teor de fitoquímicos, como flavonóides e betaninas, compostos conhecidos por prevenir o estresse oxidativo e câncer (CHAVEZ-SANTOSCOY et al., 2009).

As betaninas são pigmentos nitrogenados solúveis em água utilizadas como fonte de corantes naturais alimentares com excelentes propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, anticancerígenas (HARLEV et al., 2013) e antimicrobianas (BREWER, 2011; OSORIO-ESQUIVEL et al., 2011; REIS et al., 2012; HARLEV et al., 2013; SPÓRNA-KUCAB et al., 2013). SREEKANTH et al. (2007) avaliaram os efeitos antiproliferativos na linha celular humana de leucemia mieloide crónica (K562), utilizando pigmentos de betanina isolados a partir dos frutos de OFI. Os resultados mostram que as doses a o tempo de dependência diminuem a proliferação de células K562 tratadas com betanina com uma IC50 de 40 uM. Uma análise de eletroforese em agarose do DNA genômica de células tratadas com betanina, apresentaram um padrão de fragmentação típica de células apoptóticas. Citometria de fluxo e as células tratadas com betanina (40 mM) mostrou 28,4% de células na fase G0/G1. Estes estudos demonstram que a betanina induz a apoptose em células K562 através da via intrínseca e é mediada pela libertação de citocromo c das mitocôndrias para o citosol, e PARP.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção do extrato de *Opuntia ficus-indica* enriquecido de betanina (SistP)

Este trabalho constitui parte de um projeto de pesquisa “guarda-chuva” maior, intitulado “Purificação de bioativos de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) utilizando sistemas aquosos bifásicos para aplicações contra câncer”. Dessa forma, os procedimentos de coleta, identificação botânica e processo de extração e purificação do material vegetal, assim como caracterização fitoquímica do extrato e análise de suas propriedades antioxidantes e quantificação de compostos fenólicos, já foram realizados em um estudo anterior (SANTOS et al., 2017).

Para esta pesquisa foi utilizado o Sistema Purificado rico em betanina (SistP) (0.0324 mg/g de betanina 0.2485 mg/g de fenólicos totais).

4.2 Cultura celular e teste citotóxico

As células HCT-116, SNB19 E PC3 doadas pelo Laboratório de Pesquisa em Oncologia Clínica e Experimental (LAPOCE) foram cultivadas em cultura em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram cultivadas em monocamada e mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

Para determinação do efeito citotóxico dos extratos de *Opuntia ficus-indica* frente a linhagens de células tumorais, foi utilizado o método do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT). É um método rápido, sensível e barato, descrito primeiramente por MOSMANN (1983), usado principalmente para mensurar proliferação celular e para triagem de novas drogas anticâncer (AMARAL et al., 2015).

Para todos os experimentos, em placa com 96 poços, as linhagens de células tumorais foram plaqueadas (100 µL/poço) nas concentrações de 0,7 x 10⁵ células/mL de HCT-116 (câncer de cólon) e 0,1 x 10⁶ células/mL de PC3 (câncer de próstata) e 0,1 x 10⁶ células/mL de SNB19 (glioblastoma). Após 24 h, os extratos foram dissolvidos em 0,3% de dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados a cada poço em concentração única de 30 µg/mL. O experimento foi realizado em três momentos independentes em triplicata, utilizando a doxorrubicina 0,25 µg/mL e o DMSO 0,3% como controle positivo e negativo, respectivamente. As placas foram incubadas por 72 h em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C (AMARAL et al., 2015).

Após incubação, as amostras foram centrifugadas (15 g/15 min) a 4 °C e os sobrenadantes removidos. Foram adicionados 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL), e as placas foram incubadas por 3 h. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (30 g/10 min) a 4 °C, os sobrenadantes descartados e os precipitados ressuspensos em 150 µL de DMSO estéril puro. Para a quantificação de formazan por células viáveis, a absorbância foi lida usando leitor multiplaca (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter Inc., Packard, ON, Canada) a 595 nm. Todos os valores foram convertidos para percentual de inibição de crescimento celular (% Ipc) por meio da equação 1:

Equação 1: % Ipc = $100 - [(T / CN) \times 100]$.

Sendo:

T = absorbância do extrato da *Opuntia ficus-indica*

CN = absorbância do controle negativo.

Os resultados foram analisados utilizando uma escala de % Ipc da seguinte forma: amostras com baixa atividade tem Ipc 50%, moderada atividade tem Ipc entre 50% e 75% e elevada atividade tem Ipc 75% para cada linhagem celular testada (MAHMOUD et al., 2011).

4.3 Obtenção das Células Tumorais do Sarcoma 180

Para avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, foram utilizadas células tumorais da linhagem sarcoma 180 cultivadas no Laboratório de Pesquisa em Oncologia Clínica e Experimental (LAPOCE), do Campus Lagarto da Universidade Federal de Sergipe (UFS) (AMARAL et al., 2015).

4.4 Manutenção das células tumorais do Sarcoma 180

Para a manutenção das células do Sarcoma 180, o animal doador (camundongo Swiss macho, com a forma ascítica do tumor) foi cuidadosamente anestesiado via intraperitoneal com 0,1 mL/100 g de peso com uma solução composta por 1 mL de cetamina (80 mg/kg) e 1 mL de xilazina (10 mg/kg). Após assepsia da região abdominal com álcool iodado, foram aspirados 0,5 mL do líquido ascítico

(células tumorais ascíticas) da cavidade abdominal do animal para que as células viáveis fossem selecionadas pelo método de exclusão azul de tripan.

4.5 Viabilidade celular pelo método de exclusão azul de Tripan

Para a suspensão das células retiradas do animal doador, foi acrescentado ao volume coletado 5,0 mL de ringer lactato e 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL), para assim possibilitar a realização e contagem das células viáveis. Posteriormente, as células tumorais viáveis foram removidas e avaliadas. Para a contagem das células tumorais viáveis, foi usado o corante Azul de Tripan em câmara de Neubauer e a leitura foi realizada por meio de microscopia óptica (Microscópio CX31 Olympus). À concentração de células viáveis foi ajustada com solução de ringer lactato para $5 \times 10^7/0,5$ mL de ringer lactato - gentamicina de líquido ascítico contendo células tumorais do Sarcoma 180, as quais foram posteriormente inoculadas na região axilar dos animais experimentais de forma subcutânea (ANDRADE et al., 2016).

4.6 Animais

Foram utilizados 30 camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, adultos jovens, com massa corpórea de 28 ± 5 g, que foram divididos $n=6$, seguindo modelo experimental de Bezerra et al. (2006) e Zhao et al. (2014). Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Tiradentes, acomodados em caixas de polipropileno com grades metálicas adequadas e camas de maravalha trocadas diariamente. A temperatura (22 ± 3 °C) e umidade relativa (30 % a 70 %) do local foram reguladas de acordo com as exigências do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Também foi mantida a iluminação artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade, água *ad libitum* e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil).

4.6.1 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Tiradentes – Aracaju/SE para aprovação de estudos com animais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedeceram aos princípios éticos no uso de animais, elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sobre a utilização de animais em atividades educacionais e em

experimentos que envolvam espécies definidas na Lei 11.794/2008. A pesquisa foi aprovada sob o parecer protocolar de nº: 011021.

4.7.2 Formação de grupos experimentais

Os animais foram separados em grupos de acordo com a **Tabela 1**. Em seguida foram devidamente marcados para procedimentos experimentais. Em todos os animais foram inoculadas células S-180 na região subcutânea axilar direita (Figura 3).

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado nos animais transplantados com sarcoma 180. O fármaco 5 – Fluorouracil foi utilizado como quimioterápico padrão.

Grupos (n=6)	Tratamento
CTR	Solução salina
5-FU	25 mg/Kg/dia de 5 – Fluorouracil
SistP 3	3 mg/Kg/dia SistP
SistP10	10 mg/Kg/dia SistP
SistP 30	30 mg/Kg/dia SistP

4.6.3 Período de experimentação com os animais

Aproximadamente 24 h após a inoculação dos animais com células do tumor Sarcoma 180, o tratamento foi iniciado utilizando o SistP (3, 10 e 30 mg/Kg), 5-FU (25 mg/Kg) e solução Salina (1 mL), conforme preconizado na **Tabela 1**, durante sete dias consecutivos. No oitavo dia, os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico (0,5 mL de xilazina a 2% /100 g e 0,5 mL de cetamina a 10%/100 g). Os tumores cutâneos desenvolvidos, assim como o fígado, baço e rins dos animais foram removidos e fixados em formol tamponado a 10% (pH 7,4) por 48 h para análise posterior.

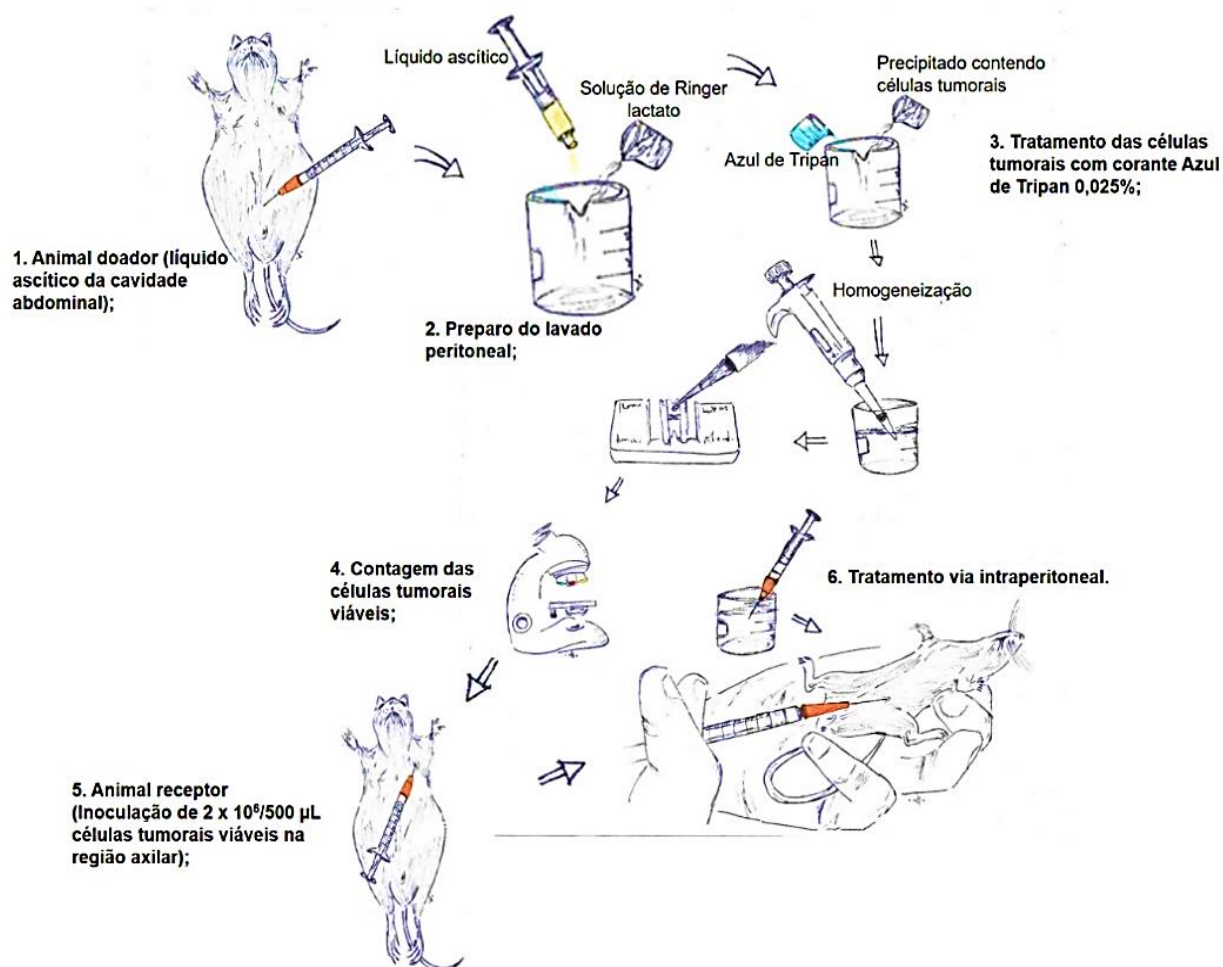


Figura 3. Esquema ilustrativo das etapas do estudo da atividade antitumoral *in vivo* em modelo Sarcoma 180. Fonte: Ilustração de Andréa Santos, 2017.

4.8 Análise da segurança no uso do extrato

Durante todo o período experimental, os camundongos foram pesados e suas massas registradas. Adicionalmente foram coletadas amostras sanguíneas no fim do período de tratamento (dia 8) para análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, descritos a seguir (ARAUJO et al., 2016).

4.8.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos

No oitavo dia foram coletadas amostras sanguíneas (0,5 mL) por meio do plexo orbital sob efeito anestésico, e foram utilizados capilares internamente revestidos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), evitando assim a coagulação da amostra

até o tubo coletor, preservando a integridade do material. Os parâmetros hematológicos avaliados foram contagem de leucócitos totais e a diferencial (linfócitos, neutrófilos e monócitos). O exame hematológico foi realizado no Laboratório Central da Universidade Tiradentes através de automação com o aparelho Pentra 80. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através de esfregaço sanguíneo previamente elaborado com as amostras frescas, através de uma gota do sangue total em lâmina de vidro, com borda fosca e identificada. Após esfregaço pronto, as lâminas estendidas foram coradas com corantes panóticos, e foi realizada a contagem diferencial em 100 células utilizando o microscópio (CX 31 Olympus) e contador manual de células sanguíneas, (modelo Digitimer Estilo, Global Trade Cravinhos/SP).

4.8.2 Análise dos parâmetros bioquímicos

Foram coletadas amostras de 0,5 mL que foram transferidas para tubos coletores pediátricos não heparinizados. Os parâmetros bioquímicos mensurados foram aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), para avaliação de função hepática, bem como a ureia e creatinina, para avaliar as funções renais, utilizando-se kits comerciais Labtest respectivos para cada análise. A determinação das dosagens foi realizada por aparelho semi-automatizado Bioplus 200 e automatizado Labmax 240 sendo realizados no Laboratório Central da Universidade Tiradentes.

4.8.3 Avaliação macroscópica dos órgãos excisados

Baço, fígado e rins foram removidos e a sua massa relativa foi calculada pela equação 2. Os órgãos também foram avaliados quanto as suas características macroscópicas de acordo com as variações na coloração, presença de áreas de necrose, hemorragia, supuração, consistência do tecido e/ou fibrose.

Equação 2: $MR = (Mo \times 100) / Ma$.

Onde MR = massa relativa (ponderal) do órgão

Mo = massa absoluta do órgão

Ma = massa absoluta do animal

4.8.4 Avaliação histopatológica dos órgãos excisados

As amostras de órgãos e dos tumores removidos foram armazenadas em solução de formaldeído 10% tamponado. Decorridas 24 h foram submetidos ao processamento histológico. Para análise histopatológica dos órgãos foram consideradas as alterações renais, alterações degenerativas tubulares, alterações hepáticas e alterações esplênicas. As alterações histopatológicas consideradas nos órgãos estão dispostas no **Apêndice 1**.

4.9 Análise do efeito antitumoral

4.9.1 Determinação do efeito da administração do SistP sobre a massa ponderal e percentual de inibição do crescimento dos tumores

A massa ponderal tumoral foi expressa como a massa aferida de cada tumor por 100 g de massa corpórea dos camundongos. A taxa de inibição do crescimento tumoral (%) foi calculada pela seguinte equação 3:

Equação 3: $PI \% = [(A - B) / A - 1] \times 100$

Onde: PI – Percentual de inibição da massa tumoral;

A – Média da massa ponderal do tumor do controle negativo;

B – Massa ponderal do tumor do grupo tratados com SistP.

4.9.2 Avaliação histopatológica descritiva dos tumores excisados

Duas secções histológicas (5 µm de espessura) coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) foram obtidas de cada caso para análise das características histopatológicas dos tumores excisados dos diferentes grupos experimentais.

As variáveis microscópicas foram avaliadas descritivamente como: padrão de crescimento tumoral, considerando os limites marginais tumorais (bordas bem definidas e regulares ou infiltrativas e irregulares); relação estabelecida entre a massas tumorais e os tecidos hipodérmicos, como musculo estriado esquelético e adiposo (promovendo compressão e expansão ou promovendo infiltração dissociação e destruição), morfologia das células tumorais, considerando especialmente a atipia citológica; e presença de sinais morfológicos de agressividade, como invasão intravascular tumoral (embolização) e invasão perineural.

A gradação da necrose coagulativa tumoral e da atividade mitótica foi realizada por metodologias quantitativas e semiquantitativas, respectivamente, como descrito a seguir.

Para análise do percentual de necrose coagulativa em relação a secção de tecido tumoral, foi utilizado o sistema de gradação histológica de necrose de sarcomas de tecidos moles proposto por Hew et al. (1994). Desta forma, os percentuais de necrose em cada um dos tumores foram categorizados em Grau 1 (< 50% de necrose), grau 2 (50-80% de necrose) e grau 3 (> 80% de necrose). Cada escore de necrose em cada caso foi estimado a partir da análise das duas secções histológicas obtidas de cada tumor; apenas um escore foi estabelecido para cada um dos cinco casos em cada grupo. O padrão de análise morfológica das áreas de necrose está apresentado na **Figura 4**.

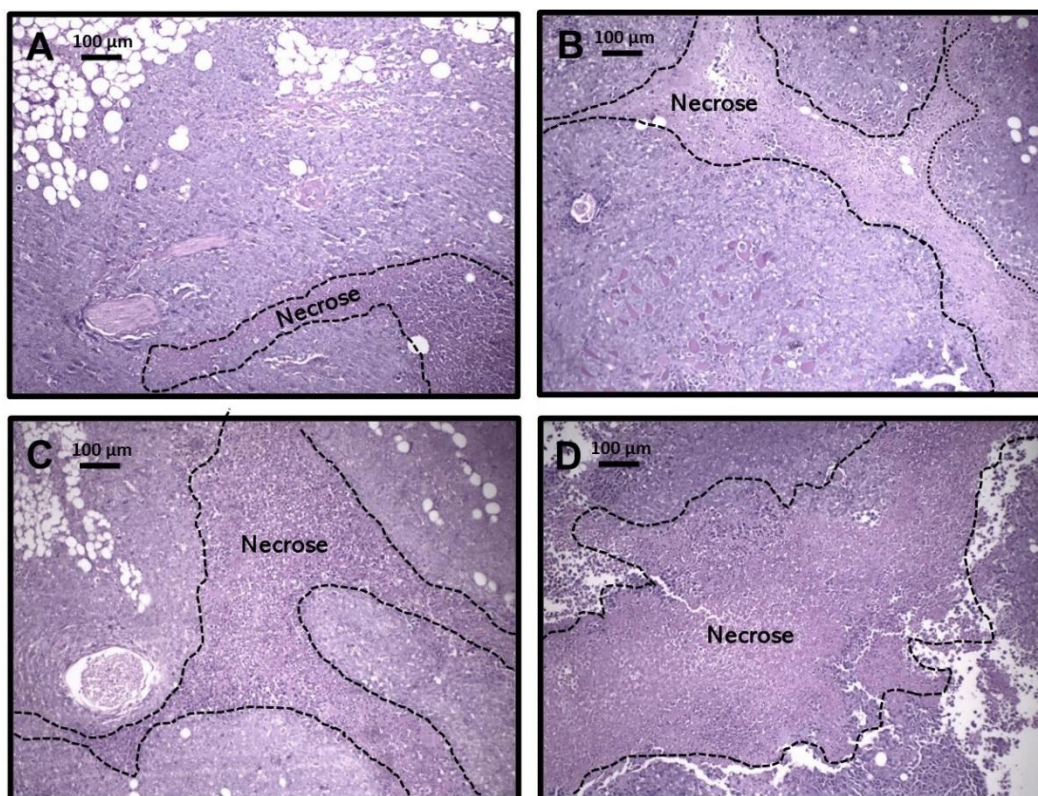


Figura 4. Características morfológicas que determinam a gradação histológica semiquantitativa (escores percentuais) das áreas de necrose. **(A)** Necrose coagulativa formando trabéculas ora pequenas e delgadas, **(B)** ora mais espessas, representando menos de 50% da área tumoral total, correspondendo ao **Grau I**. **(C)** Necrose formando trabéculas bastante espessas interconectadas, representando entre 50 e 80% da área tumoral, correspondendo ao **Grau II**. **(D)** Necrose formando blocos sólidos irregulares perfazendo mais de 80% da área tumoral, correspondendo ao **Grau III** (Hew et al., 1994). Fonte: fotomicrografias próprias.

Para determinação do índice mitótico, foi selecionada a melhor das duas secções histológicas de cada tumor (com maior nitidez e menor superposição celular, assim como menos artefatos). Foram então selecionados 10 campos histológicos (magnificação de 400 x) por casualização sistemática. Desta forma, para cada campo selecionado, seguiam-se dois campos desprezados, sempre da esquerda para a direita e de cima para baixo, até que o total de 10 campos selecionados fossem devidamente registrados, fotomicrografados e arquivados em formato jpeg. Posteriormente, as figuras mitóticas foram identificadas nos 10 campos histológicos de cada caso, contadas, somadas e o valor final devidamente registrado. A identificação das figuras de mitose, típicas e atípicas, foi efetuada conforme critérios morfológicos descritos por Lashen et al. (2022), apresentados na **Figura 5**.

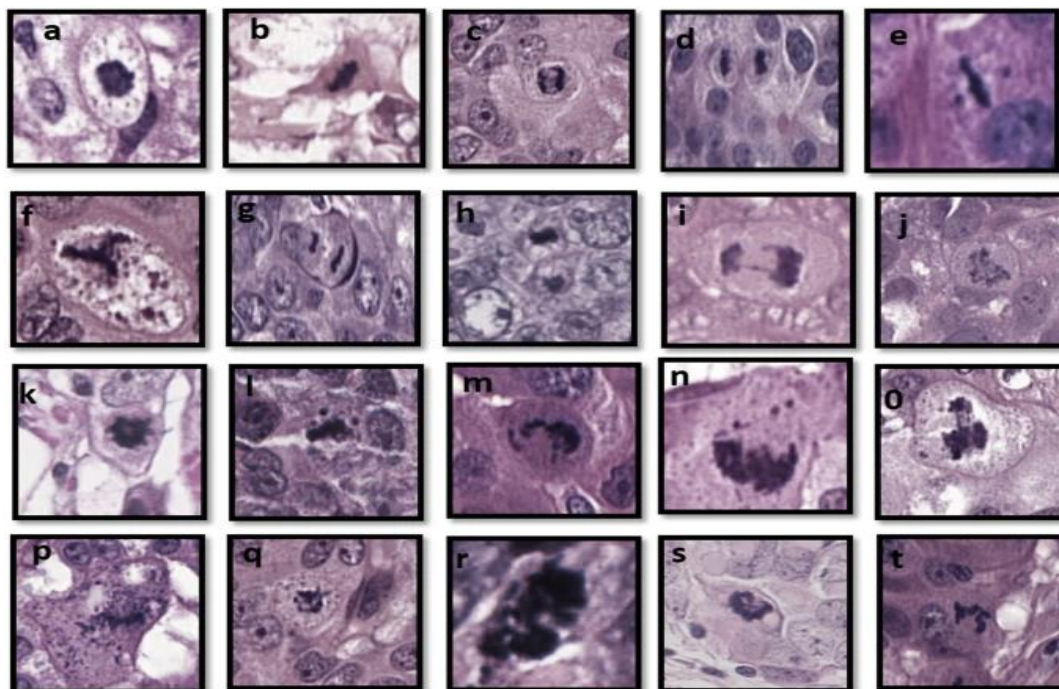


Figura 5. Características morfológicas de mitoses típicas (1000×): **(a)** prófase mostra estrutura hiper cromática redonda com aparência pilosa, **(b)** metáfase mostra estrutura curvilínea com citoplasma levemente eosinofílico, **(c)** anáfase mostra 2 massas de cromatina uniformes afastados, **(d)** telófase mostra 2 células uniformes completamente separadas. Características morfológicas de mitoses atípicas (1000×): **(e)** mitose atípica lag mostra 2 cromossomos soltos em cada lado da placa metafásica; **(f)** mitose atípica tripolar mostra três polos com contorno piloso e citoplasma eosinofílico levemente granular; **(g)** assimetria polar mostra 2 cromátides afastadas desiguais em tamanho, tamanho aumentado e citoplasma levemente eosinofílico ou **(h)** duas células separadas não uniformemente; **(i)** ponte anáfase mostra um cordão de cromatina que se estende de um pólo da anáfase aos outros pólos conectados; **(j)** mitose dispersa mostra múltiplos cromossomos não aglutinados com citoplasma levemente eosinofílico e de tamanho aumentado; **(k)** mitose atípica em anel mostra estrutura em forma de anel com contorno piloso; **(l)** mitose atípica lag mostra um cromossomo não ligado em um lado da placa metafásica; **(m–t)** outras formas de mitoses atípicas mostrando assimetria das massas de cromatina dentro das células (critérios e imagens extraídos de Lashen et al., 2022).

4.10 Detecção *in situ* de fragmentação de DNA em células tumorais usando o ensaio Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)

A técnica TUNEL foi realizada usando um kit de detecção de morte celular *in situ* (POD, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA) (Woodside et al., 2003). Resumidamente, cinco cortes histológicos de cada amostra foram desparafinizados em xilol, reidratados em álcool (99, 95 e 70%) e lavados com água deionizada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ a 2% (10 min em temperatura ambiente). A seguir, os cortes foram incubados com solução da enzima TdT (37°C, 1 h) e então incubados com anti-digoxigenina peroxidase (50 µL, 30 min). A reação foi revelada com diaminobenzidina (30 min, DAB, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EUA). A contracoloração dos núcleos foi realizada com hematoxilina de Meyer a 2% e montada para exame. Após cada etapa, os cortes foram sempre lavados em tampão PBS. Células TUNEL-positivas foram identificadas por seus núcleos corados de marrom. Áreas tumorais necróticas ou com infiltrado inflamatório intenso foram excluídas dos procedimentos de contagem.

4.11 Determinação da expressão imuno-histoquímica dos antígenos Ki67, Caspase-3 ativa (clivada) e Bax

Cortes histológicos (3 µm de espessura) foram distribuídos em lâminas previamente limpas e desengorduradas, preparadas e silanizadas. Em seguida, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica com citrato de sódio em temperatura elevada (100°C, 20 min). Após a lavagem das lâminas, as peroxidases endógenas foram bloqueadas com peróxido de hidrogênio 30% (10 min, a 25°C). Posteriormente, as lâminas foram incubadas (temperatura ambiente) com os anticorpos primários anti-Ki67 (1:100, SIGMA-Aldrich), anti-caspase 3 ativa (1:1000, SIGMA-Aldrich) e anti-Bax (1:2000, Pharmingen) por 30 min. O procedimento foi seguido por lavagem das lâminas (três lavagens com 1x TRIS) e coloração, visualizada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO)., Hematoxilina de Meyer (1 min) foi usada para coloração de contraste das lâminas, seguida de desidratação em etanol, limpeza em xilol e montagem com Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

4.12 Procedimentos de análise quantitativa de células positivas para TUNEL, Ki67, Caspase-3 Ativa e Bax

Dez campos histológicos (ampliação $\times 400$; área $0,0625 \text{ mm}^2$) por corte histológico foram selecionados por randomização sistemática. Assim, para cada campo selecionado, seguiram-se dois campos descartados, sempre da esquerda para a direita e de cima para baixo, até que um total de 10 campos selecionados fossem devidamente registrados e fotomicrografados. As imagens brutas foram exportadas e salvas no formato .tiff para análise posterior. A porcentagem de células positivas marcadas para esses antígenos foi determinada pela porcentagem média de células cujos núcleos (TUNEL e Ki67) ou citoplasma (Caspase-3 Ativa e Bax) coraram pela DAB (marrom), independente da intensidade, por 100 células contadas em cada corte histológico.

4.13 Análise estatística

As variáveis quantitativas e semiquantitativas foram submetidas a testes de normalidade e homocedasticidade de distribuição de valores. Para teste de normalidade, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, enquanto para análise de homocedasticidade foram aplicados o teste de Bartlett. Dados com distribuição normal e com homocedasticidade foram expressos sob a forma de média $\pm$ erro padrão da média e comparados entre si utilizando o teste ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Dados não contínuos e que não obedeceram a estes pressupostos (distribuição normal e/ou homocedasticidade) foram expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimos e máximos, e comparados entre si pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Diferenças entre as médias ou medianas foram consideradas significativas quando os valores de p foram menores que 0,05. Em todos os casos, o programa estatístico utilizado para as análises foi o *Graphpad Prism* (versão 5.0, San Diego, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, o potencial citotóxico do SistP e do extrato de *Opuntia ficus-indica* (EOFi) foi testado frente a três diferentes linhagens celulares tumorais, glioblastoma (SNB19), câncer de cólon (HCT-116) e próstata (PC3), utilizando-se a análise da viabilidade celular por meio do ensaio colorimétrico de MTT. A escolha dessas linhagens foi baseada no fato de que estas representam linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas de elevada frequência no Brasil (INCA, 2018).

Observa-se que na **Figura 6**, a atividade citotóxica contra linhagens de glioblastoma (SNB19) do EOFi foi ligeiramente abaixo de 50% ($49,5 \pm 1,2\%$), enquanto para as linhagens PC3 e HCT-116 este percentual médio foi de $55,0 \pm 3,7\%$ e $60,5 \pm 6,1\%$, respectivamente. O sistema purificado rico em betanina (SistP), por sua vez, apresentou atividade citotóxica de $93,7 \pm 1,8\%$ para a linhagem SNB19, $82,1 \pm 2,8\%$ para a PC3 e $84,2 \pm 3,0\%$ para a HCT-116. Além disso, a atividade citotóxica do sistema purificado rico em betanina (SistP) se mostrou significativamente maior que a do extrato bruto convencional (EOFi) para todas as linhagens testadas ($p < 0,001$).

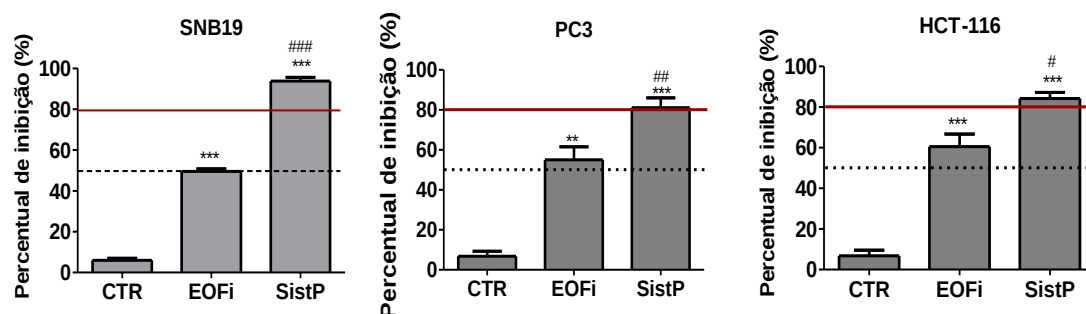


Figura 6. Análise da atividade citotóxica por meio da determinação do percentual de inibição da viabilidade celular promovida pelo Extrato bruto de *Opuntia ficus-indica* (EOFi) e extrato purificado rico em betanina (SistP) sobre linhagens de células tumorais derivadas do glioblastoma (SNB19), adenocarcinoma de próstata (PC3) e adenocarcinoma de cólon (HCT-116) humanos. CTR representa o grupo controle com omissão do EOFi e SistP. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças entre EOFi e SistP estão expressas Tukey). (-----) Limite percentual de 50% acima do qual a atividade citotóxica é considerada moderada; (——) Limite percentual de 75% acima do qual a atividade citotóxica é considerada forte. Diferenças significativas em relação a CTR: *** $P < 0,001$ e em relação ao EOFi: ### $p < 0,001$.

Para que um composto químico natural seja considerado como candidato potencial ao desenvolvimento de futuras drogas com atividade antineoplásica, é necessário determinar o grau de citotoxicidade do produto em ensaios *in vitro* contra linhagens celulares tumorais malignas (DA SILVA et al., 2016). Desta forma, produtos

que promovem inibição da viabilidade em percentuais iguais ou maiores que 75% são considerados altamente citotóxicos, enquanto inibições entre 50 - 75% são classificados como moderadamente citotóxicos e abaixo de 50% são considerado de baixa citotoxicidade (MAHMOUD et al. 2011). A análise dos dados obtidos no presente estudo sugere que o Sistema Purificado rico em betanina (SistP) exibiu atividade citotóxica elevada contra todas as linhagens tumorais testadas. Suportando esses achados, estudo prévio utilizando 200 µg/mL de betanina demonstrou inibir a proliferação de linhagem celular derivada de hepatoma humano (HepG2) (Lee et al., 2014), atestando o potencial citotóxico deste composto químico. Por outro lado, o extrato base não enriquecido (EOFi) exibiu atividade apenas moderada, sugerindo que o processo de concentração e purificação da betanina promoveu aumento importante da citotoxicidade do produto.

Outro dado relevante é que a concentração dos compostos testados nesse ensaio de triagem de atividade citotóxica foi de 30 µg/mL. A opção por esta concentração foi embasada nas normativas do programa pré-clínico de triagem de drogas citotóxicas dos Estados Unidos - Instituto Nacional do Câncer, que determina que apenas extratos com valores de IC₅₀ abaixo de 30 µg/mL em ensaios com linhagens de células tumorais são considerados promissores para o desenvolvimento de drogas anticâncer (AMARAL et al., 2020). Depreende-se, portanto que, em razão da elevada citotoxicidade em concentração de 30 µg/mL, o SistP representa um candidato promissor para ensaios antitumorais posteriores em modelos biológicos mais complexos, como aqueles desenvolvidos a partir da transplantação direta de células tumorais viáveis em roedores, destacando-se, dentre eles o sarcoma 180.

Uma vez confirmada a forte atividade citotóxica do SistP, este sistema foi considerado adequado para o estudo da atividade antitumoral *in vivo* em modelo murino. O modelo biológico adotado no presente estudo foi o de sarcoma 180 (S-180), que representa um modelo eficiente e robusto (DAS THAKUR et al., 2014). O modelo S-180 é usado desde a década de 50 como estratégia de triagem de potenciais drogas com atividade antitumoral e entre suas principais vantagens práticas, que determinaram a opção por sua utilização, são a facilidade de execução do protocolo de implantação tumoral, a ocorrência de crescimento tumoral em 90% a 100% dos animais após transplantação intradérmica de células neoplásicas, e evolução tumoral rápida, reduzindo o tempo de experimento (REILLY et al., 1963).

Na avaliação macroscópica dos tumores (**Figura 7A**) foi observado que a massa tumoral ponderal média dos grupos tratados com a formulação SistP 30 ($0,33 \pm$

0,04 g/100 g) e com o quimioterápico 5-FU ($0,21 \pm 0,05$ g/100 g) foi significativamente menor que a do grupo tratado apenas com solução Salina ($0,68 \pm 0,10$ g/100 g; $p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente), SistP 3 ($0,80 \pm 0,09$ g/100 g; $p < 0,001$) e SistP 10 ($0,81 \pm 0,05$ g/100 g; $p < 0,001$). Contudo, não foi observada diferença significativa entre as massas ponderais médias dos tumores dos grupos SistP 3, SistP 10 e Salina ($p > 0,05$). Quando da análise do índice de inibição do crescimento tumoral em relação à média do grupo tratado com solução salina (controle negativo) (**Figura 7B**), fica evidente que o percentual de inibição promovido pelo SistP 30 ($54,5 \pm 7,9\%$) foi estatisticamente semelhante àquele induzido pelo 5-FU, quimioterápico utilizado como controle positivo ($68,0 \pm 7,2\%$; $p > 0,05$). Apesar de os percentuais médios de inibição obtidos em SistP 3 ($-18,0 \pm 13,56\%$) e SistP 10 ($-19,7 \pm 7,9\%$) terem sido negativos, não é possível sugerir potencial estimulação do crescimento tumoral, já que a massa ponderal média dos tumores entre esses grupos e o grupo Salina foi estatisticamente semelhante.

A inibição do crescimento tumoral ponderal e o percentual médio de inibição desse crescimento em relação a um grupo não tratado, ou tratado com uma substância sabidamente inerte, como a solução salina, representam os mais relevantes indicadores de potencial antitumoral quando da utilização de modelos experimentais *in vivo*. Estes parâmetros clínicos/macrosscópicos vêm sendo regularmente usados em vários estudos para determinar a atividade antitumoral contra o crescimento do Sarcoma 180 em roedores (Das Thakur et al., 2014; Andrade et al., 2016; Bastos et al., 2018; Amaral et al., 2020; Rezende et al., 2021; Bhattacharya et al., 2022). Portanto, com base nos resultados obtidos, é possível sugerir que, na dose de 30 mg/kg, o sistema purificado rico em betaninas apresenta atividade tumoral *in vivo* comparável àquela promovida por um quimioterápico padrão.

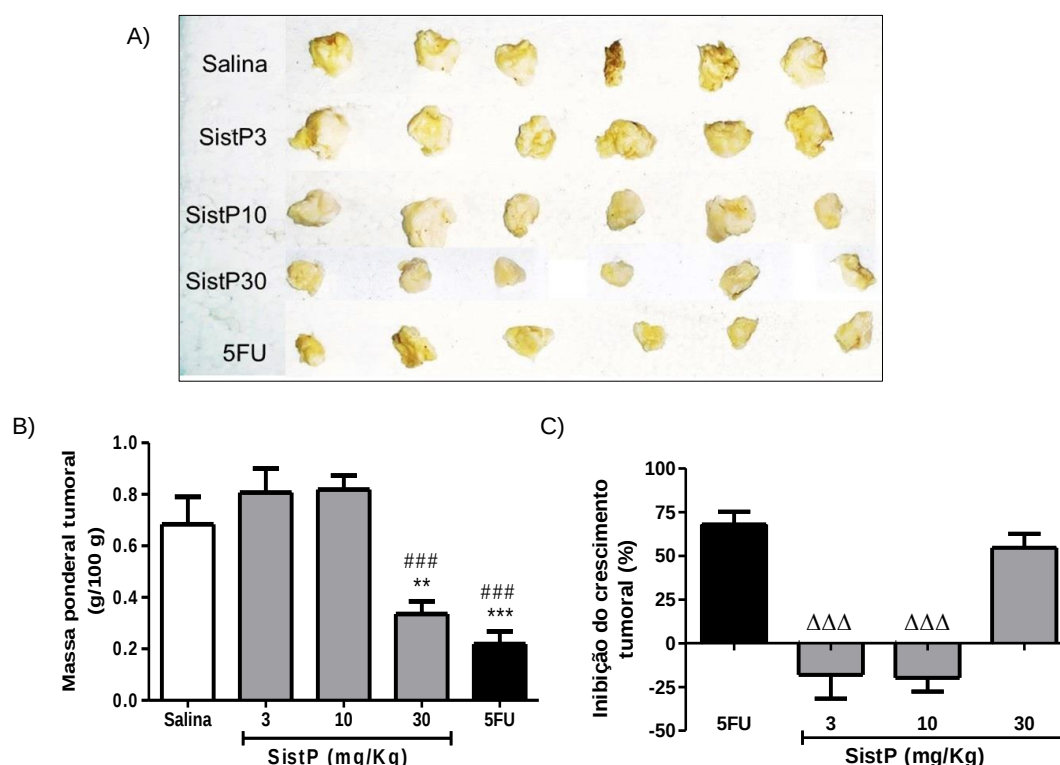


Figura 7. (A) Análise macroscópicas dos tumores excisados dos animais dos grupos submetidos a modelo experimental murino de transplantação de sarcoma 180 tratados com veículo (Salina) e o extrato purificado rico em betanina (SistP) nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg e 5-fluorouracil (5-FU) na dose de 25 mg/kg. **(B)** Determinação da massa ponderal tumoral (g/100g) e **(C)** do Percentual médio de inibição do crescimento tumoral dos grupos experimentais em relação à massa média dos tumores dos animais do grupo Salina (controle negativo). Dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças significativas em relação ao grupo Salina está expresso como $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$; diferenças significativas em relação aos grupos SistP 3 e SistP 10 estão expressas como $###p < 0,001$; diferenças significativas simultaneamente em relação aos grupos 5-FU e SistP 30 estão expressas como $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ (ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey).

Estudos apontam que as propriedades das betalaínas, classe de compostos que engloba as betaninas como agentes antitumorais têm sido estudadas em modelos animais desde 1996 (KAPADIA et al., 1996). Foi destacado por Kapadia et al, (1996) o poder quimiopreventivo desses compostos, mostrando como os tumores induzidos na pele de camundongos foram afetados pela administração oral de extratos ricos em betalaínas. Além disso, a atividade antitumoral do extrato de beterraba vermelha, rico em betanina, também foi evidenciada por Lechner & Stoner, (2019). Neste mesmo sentido, o estudo realizado por Kapadia et al, (2003) apresentou que a dieta de camundongos com 0,0025% de betanina por 1 semana após a indução de tumores de pele ou fígado é eficaz na inibição do crescimento e redução da incidência e multiplicidade de tumores. Estes dados corroboram os achados obtidos no presente

estudo, sugerindo que o extrato purificado rico em betanina, obtido no presente estudo exibe atividade antitumoral.

Apesar de ainda não ter sido completamente elucidado, o mecanismo de atividade antitumoral das betaninas foi investigado por Sreekanth et al, (2007) em linhagem de células K562 de leucemia mieloide crônica humana. O tratamento com 40 μ M de betanina promoveu regulação negativa da expressão da proteína Bcl-2 (responsável por controlar a permeabilidade das membranas mitocondriais) e consequente liberação de citocromo C mitocondrial no citosol, além de clivagem da poli ADP-ribose polimerase (PARP), enzima essencial para o reparo de quebras no DNA via reparo por excisão de base. Esses resultados apontam um potencial efeito pro-apoptótico não apenas induzido diretamente pelo citocromo C liberado no citosol (iniciação da cascata apoptótica pela via mitocondrial), mas também indireto, por impossibilitar o reparo de DNA lesado, e consequente ativação da apoptose pela via da proteína p53. Corroborando esses achados, o tratamento com betanina (100 μ g/mL adicionados à água *ad libitum*) inibiu a tumorigênese pulmonar induzida por carbamato de vinil e benzo(a)pireno em ratos através da apoptose, sugerida devido ao aumento da expressão das caspases 3, 7 e 9 (enzimas envolvidas na ativação da apoptose) (ZHANG et al., 2013). Contudo, estudos posteriores são necessários a fim de determinar com maior precisão os mecanismos bioquímicos e moleculares que estão por trás da atividade antitumoral observada no presente estudo.

Os tumores excisados dos animais dos diferentes grupos experimentais foram submetidos à análise histopatológica. De modo geral, os tumores formados nos grupos Salina e SistP 3 e 10 exibiram padrão de crescimento semelhante, bastante irregular, com margens mal definidas apresentando ninhos, ilhas, cordões e trabéculas de células tumorais se insinuando no tecido conjuntivo, muscular estriado esquelético e adiposo hipodérmicos peritumorais. De permeio, foram observadas extensas áreas eosinofílicas amorfas, dispostas em grandes blocos irregulares, contendo, em seu interior, restos nucleares de células inflamatórias, interpretadas como necrose coagulativa. Essas áreas foram abundantemente encontradas em meio ao parênquima tumoral, perfazendo mais de 50% do tecido neoplásico. Áreas de invasão da bainha perineural de fibras nervosas periféricas foram comumente observadas, mas a invasão do endoneuro não foi verificada. A embolização de células tumorais nos espaços intravasculares não foi visualizada em nenhum dos espécimes analisados.

Individualmente as células tumorais exibiram morfologia poligonal, citoplasma amplo e fortemente eosinofílico e núcleos volumosos, predominantemente hipercromáticos e pleomórficos, mas eventualmente exibindo cromatina mais dispersa e nucléolo evidente, ora centrais ora levemente excêntricos. A atividade mitótica foi facilmente observada, expressa por figuras de mitose nas quatro fases do ciclo celular. As figuras mitóticas atípicas, apesar de presentes, foram consideravelmente menos frequentes. Fotomicrografias mostrando as principais características histopatológicas dos tumores dos grupos Salina, SistP 3 e SistP 10 são apresentadas na **Figura 8**.

O grupo SistP 30, tratado com a maior dosagem testada do sistema purificado rico em betanina, por sua vez, apresentou algumas características distintas dos grupos anteriores. Neste, os tumores exibiram padrão de crescimento mais regular, notadamente menos infiltrativo na maior parte do tumor, formando blocos sólidos separados por septos fibrosos em quantidade e espessura variáveis. Muitas vezes as células tumorais promoveram expansão em vez de permeação de fibras musculares e do tecido adiposo adjacente, apresentando limites mais bem definidos nas margens tumorais. As áreas de necrose coagulativa estavam predominantemente dispostas em trabéculas de espessura variável que irradiavam do centro para as margens tumorais, mas que perfaziam não mais que 30% da massa tumoral. As figuras mitóticas, ainda que menos frequentes que nos grupos anteriores, foram facilmente identificadas, enquanto as áreas de invasão foram igualmente comuns. Invasão intravascular e embolização de células tumorais não foram observadas. Fotomicrografias mostrando as principais características histopatológicas dos tumores do grupo SistP 30 são apresentadas na **Figura 9**.

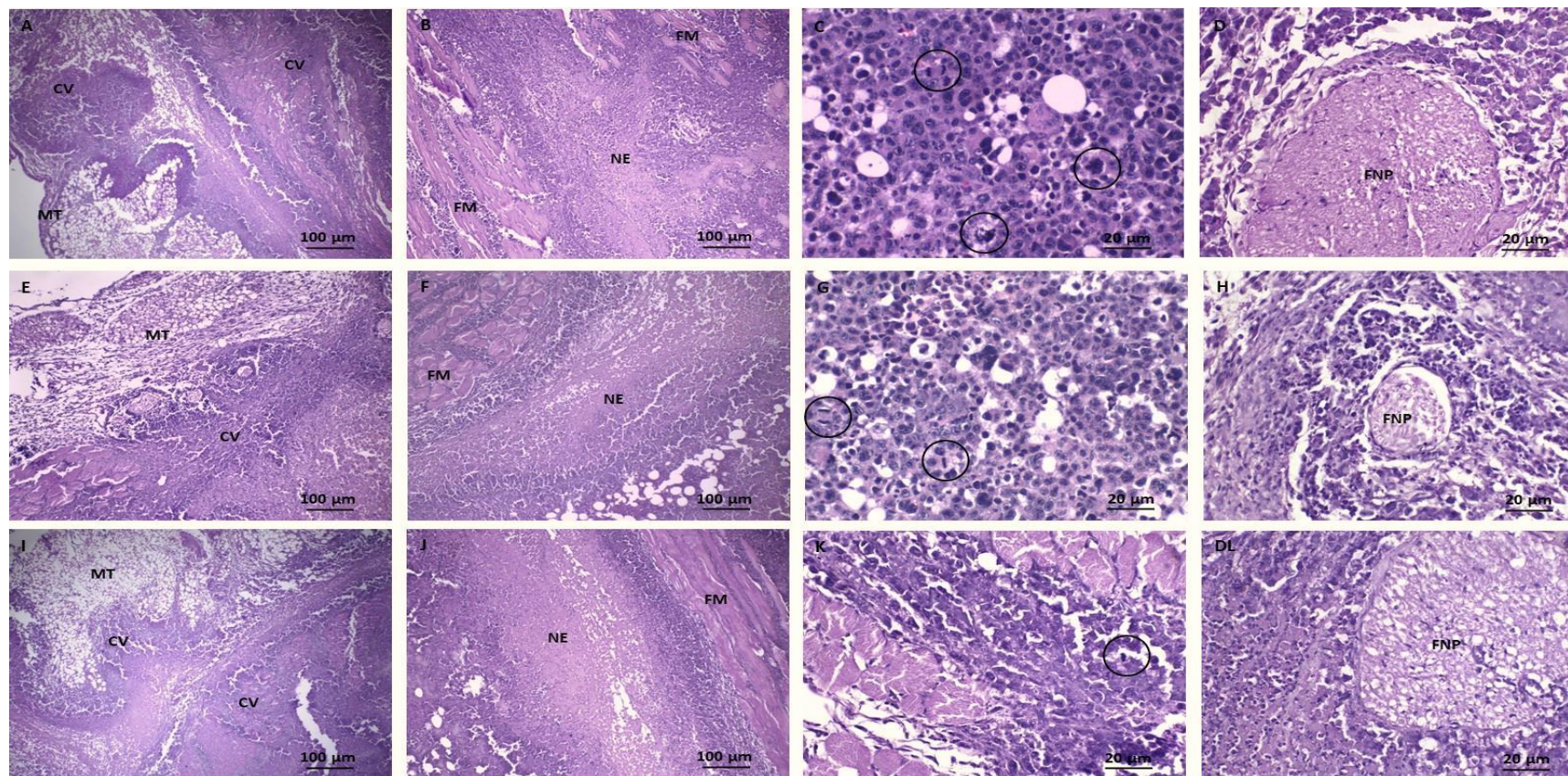


Figura 8. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE representativas dos principais achados histopatológicos observados nos grupos Salina (A, B, C e D), SistP 3 (E, F, G e H) e SistP 10 (I, J, K e L). Os tumores exibiram padrão de crescimento bastante irregular, com grupos de células tumorais viáveis (CV) invadindo os limites já pouco definidos das margens tumorais (MT). As células tumorais exibindo padrão de crescimento infiltrativo, permeando, dissociando e destruindo fibras musculares (FM). As áreas de necrose coagulativa (NE) perfazem mais de 50% da massa tumoral. Individualmente as células tumorais exibem citoplasma amplo e eosinofílico e núcleos volumosos, hipercromáticos e pleomórficos; as figuras mitóticas (círculos) são frequentes. Áreas de invasão perineural de fibras nervosas periféricas (FNP) são comuns.

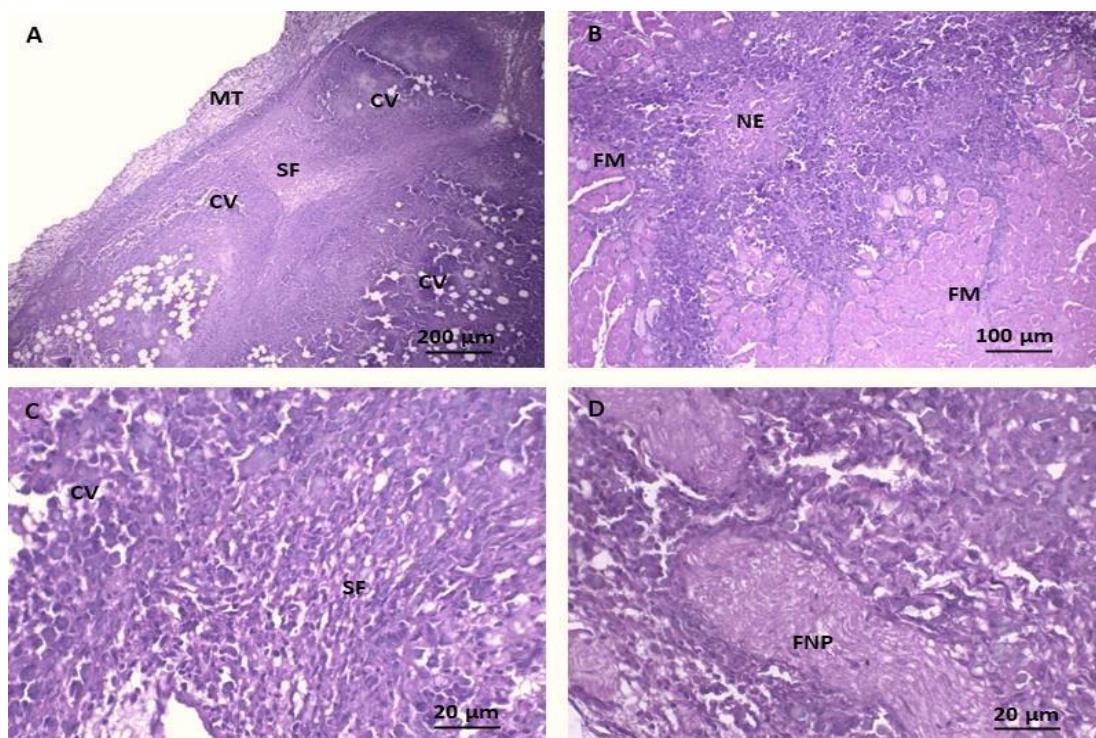


Figura 9. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE representativas dos principais achados histopatológicos observados no grupo SistP 30. (A) As células tumorais (CV) exibem padrão de crescimento mais regular, formando blocos sólidos separados por septos fibrosos (SF) e mostrando limites relativamente bem definidos nas margens tumorais (MT). (B) Tumores exibindo padrão de crescimento claramente menos infiltrativo, promovendo expansão em vez de permeação de fibras musculares (FM); as áreas de necrose coagulativa (NE) são dispostas em trabéculas e perfazem menos de 30% da massa tumoral. (C) Maior detalhe das células tumorais (CV) e dos septos fibrosos (SF). (D) Áreas de invasão da bainha perineural de fibras nervosas periféricas (FNP) ainda são comuns.

O grupo 5-FU foi aquele que apresentou as características mais distintas. As células tumorais viáveis (CV) exibiram padrão de crescimento marginal bastante regular, mostrando limites bem definidos nas margens tumorais. Na maior parte do tumor as células neoplásicas promoveram compressão e expansão de fibras musculares e tecido adiposo hipodérmicos, e as áreas de necrose coagulativa eram menos visíveis e estavam dispostas em trabéculas delgadas, perfazendo menos de 30% da massa tumoral. Figuras mitóticas estavam presentes, mas eram raras. De especial interesse foi que, assim como a embolização tumoral, indícios morfológicos de invasão perineural também não foram encontrados. Fotomicrografias mostrando as principais características histopatológicas dos tumores do grupo 5-FU são apresentadas na **Figura 10**.

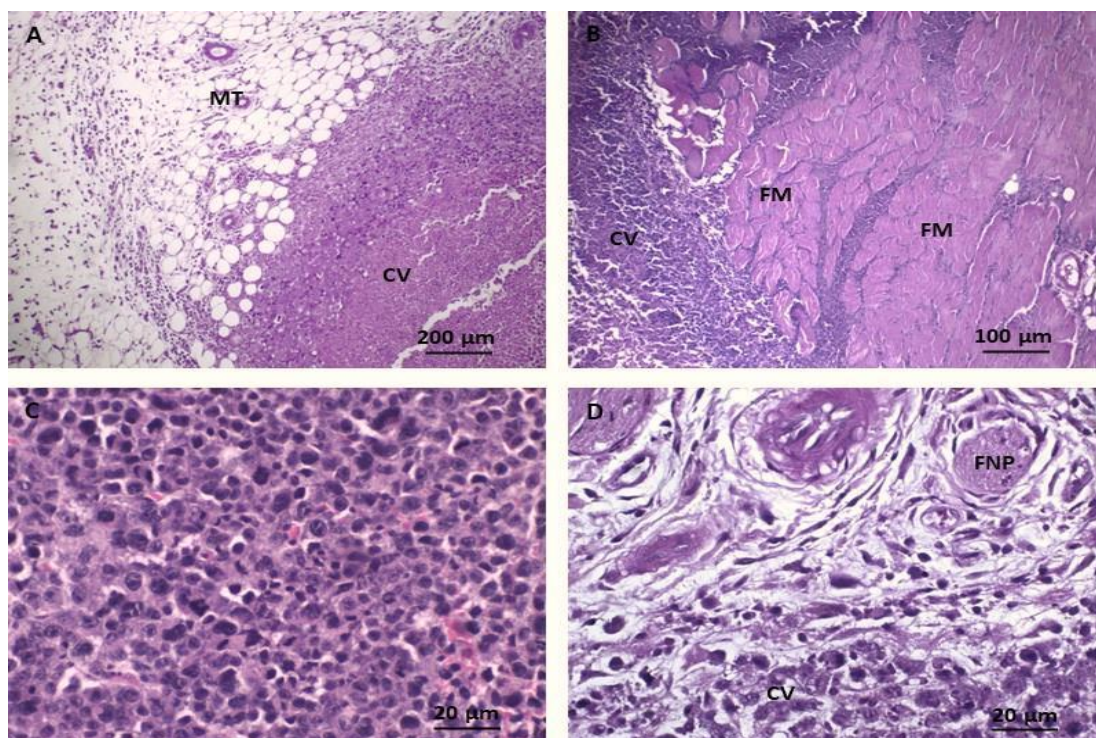


Figura 10. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE representativas dos principais achados histopatológicos observados no grupo **5-FU**. (A) As células tumorais (CV) exibem padrão de crescimento mais regular, mostrando limites relativamente bem definidos nas margens tumorais (MT). (B) Células tumorais exibindo padrão de crescimento claramente menos infiltrativo, na maior parte do tumor promovendo expansão em vez de permeação de fibras musculares (FM); as áreas de necrose coagulativa (NE) são dispostas em trabéculas e perfazem menos de 30% da massa tumoral. (C) Maior detalhe das células tumorais. (D) As fibras nervosas periféricas (FNP) se mostram livres de invasão, denotando menor potencial infiltrativo tumoral.

A análise quantitativa dos escores referentes ao percentual de áreas de necrose nos tumores analisados dos diferentes grupos experimentais, apresentada na **Tabela 2**, revelou que os grupos SistP 30 e 5-FU exibiram medianas significativamente menores que os demais grupos ($p < 0,05$). Contudo, não houve diferença entre 5-FU e SistP 30 ($p > 0,05$), assim como também não houve entre Salina, SistP 3 e SistP 10 ($p > 0,05$).

A análise quantitativa do número médio de figuras de mitose (independentemente da sua fase cíclica ou tipicidade) a cada 10 campos histológicos nos diferentes grupos experimentais revelou uma ampla variação na atividade mitótica entre os grupos. Contudo, conforme demonstrado na **Tabela 3**, apenas o grupo 5-FU apresentou um quantitativo de figuras mitóticas significativamente menor que o grupo

Salina ($p < 0,05$). Não houve diferença, contudo, entre os grupos SistP 3, 10 e 30 nem entre si, nem entre eles e os grupos Salina ou 5-FU ($p > 0,05$).

Tabela 2. Distribuição descritiva dos escores relativos ao percentual de necrose coagulativa nos tumores examinados dos animais grupos experimentais.

Grupos	Mínimo	Terceiro quartil	Mediana	Primeiro quartil	Máximo
Salina	2,000	2,000	3,000	3,000	3,000
SistP 3	2,000	2,500	3,000	3,000	3,000
SistP 10	1,000	1,500	3,000	3,000	3,000
SistP 30	1,000	1,000	1,000*	2,000	2,000
5-FU	1,000	1,000	1,000*	1,500	2,000

Teste de Kruskal-Wallis, com aplicação em seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Dunn (* diferença estatisticamente significativa em comparação com Salina, SistP 3 e SistP 10; $p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa entre os demais grupos ($p > 0,05$)

Tabela 3. Distribuição do número de mitoses para cada 10 campos histológicos analisados (magnificação de 400 x) nos tumores examinados dos animais grupos experimentais.

Grupos	Mínimo	Terceiro quartil	Mediana	Primeiro quartil	Máximo
Salina	4,000	4,500	7,000	10,00	11,00
SistP 3	2,000	2,500	5,000	8,000	10,00
SistP 10	2,000	2,500	5,000	7,500	9,000
SistP 30	1,000	2,000	5,000	6,000	7,000
5-FU	1,000	1,000	2,000*	4,000	5,000

Teste de Kruskal-Wallis, com aplicação em seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Dunn (* diferença estatisticamente significativa em comparação com Salina; $p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa entre os demais grupos ($p > 0,05$)

Desde a década de 80 está bem estabelecido que certas características histopatológicas das neoplasias malignas podem, em maior ou menor grau, ser relacionadas a seu comportamento biológico; dentre elas, podem ser destacadas a atividade mitótica, a formação de áreas de necrose, a embolização tumoral (invasão intravascular) e a invasão perineural (TROJAN et al., 1984). O índice mitótico fornece informações importantes sobre o quantitativo de células no ciclo celular (fração proliferativa tumoral), enquanto a formação de áreas de necrose tem sido associada a uma proliferação celular de tal intensidade e celeridade que excede a velocidade de neovascularização necessária para prover nutrição às células tumorais; assim esses dois aspectos morfológicos teriam estreita relação com o potencial proliferativo tumoral

(RUDOLPH et al., 1998; SATO et al., 2005). Por outra ótica, a identificação de êmbolos tumorais dentro de canais vasculares e de filetes de células neoplásicas infiltrando a bainha perineural de nervos periféricos representam importantes sinais morfológicos de maior capacidade de invasão e disseminação tumoral, incluindo potencial metastático (NEUVILLE et al., 2014).

No presente estudo, os tumores removidos dos animais que compunham os grupos Salina, SistP 3 e SistP 10 apresentaram características histopatológicas bastante semelhantes. Esses dados sugerem que não houve qualquer influência do tratamento com o sistema purificado nas doses de 3 e 10 mg/kg sobre o perfil morfológico das neoplasias. Dentre os aspectos que mais chamaram a atenção, se destacaram o padrão de crescimento tumoral extremamente infiltrativo, o que determinava não apenas uma maior dissociação e destruição de fibras musculares e de tecido adiposo adjacente, mas também a formação de margens tumorais pobremente delimitadas. Além disso, a invasão perineural foi um achado extremamente frequente. Tais características vêm sendo classicamente interpretadas como indicativas de comportamento clínico agressivo (TROJAN et al., 1984; RUDOLPH et al., 1998; NEUVILLE et al., 2014). Por outro lado, a identificação de bordas tumorais bem delimitadas e definidas e padrão mais compressivo (em vez de infiltrativo) de crescimento neoplásico e de interrelação com os tecidos hipodérmicos adjacentes, além de frequência notadamente menor de invasão perineural, observados nos grupos SistP 30 e 5-FU foram, portanto, sugestivos de menor potencial de agressividade clínica nos tumores tratados com o quimioterápico padrão e com a dose mais alta do sistema purificado (30 mg/kg).

Adicionalmente, o percentual significativamente menor de áreas de necrose coagulativa identificadas nesses mesmos grupos (5-FU e SistP 30), em comparação aos demais, vem corroborar os achados histopatológicos anteriores, posto ser a formação de necrose um importante sinal morfológico de agressividade tumoral (SHI et al., 2017; WU et al., 2021; LASHEN et al., 2022). De fato, a formação de áreas necróticas em neoplasias malignas tem sido associada a elevado potencial proliferativo. Desta forma, essa necrose pode ser resultado da hipóxia e privação de nutrientes (por exemplo, glicose) devido ao suprimento insuficiente de sangue (LEE et al., 2018), ou ocorrer por estímulo direto da proliferação de células tumorais, via ativação da cascata do sistema complemento (MAURER et al., 2015).

Assim para analisar qual das duas teorias estaria mais relacionada ao padrão de necrose anteriormente descrito nos diferentes grupos experimentais, foi realizada uma análise quantitativa de figuras mitóticas, típicas ou atípicas, nos tumores. De fato, o grupo 5-FU apresentou índices mitóticos significativamente menores que o grupo Salina. Uma vez que a atividade mitótica se constitui em um importante indicador do balanço proliferativo tumoral (RUDOLPH et al., 1998; SATO et al., 2005), esse resultado corrobora os dados anteriores obtidos na análise da massa ponderal média tumoral e na análise morfológica semiquantitativa do percentual de necrose tumoral. Além disso, está bem estabelecido que o 5-FU é um antimetabolito citotóxico que atua na fase S do ciclo celular inibindo a enzima timidilato sintetase, e consequentemente, a síntese dos constituintes do DNA, o que culmina no bloqueio da replicação celular e impede a entrada da célula na fase de mitose (JIN et al., 2020). Esses dados, portanto, dão suporte a identificação de menor índice mitótico no grupo tratado com esse quimioterápico.

Surpreendentemente, apesar do índice mitótico em SistP 30 ter sido aparentemente mais baixo que em Salina, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Uma provável explicação para esse aparente paradoxo é que, o índice proliferativo tumoral é mais bem determinado pela identificação de células que estão no ciclo celular. Contudo, a mitose (fase M) representa apenas uma das quatro fases do ciclo, que ainda conta com as fases G1 (célula copia organelas, e produz os componentes moleculares necessários as etapas posteriores), S (célula sintetiza uma cópia completa do DNA e dos centríolos) e G2 (célula produz proteínas e organelas, e reorganiza seu conteúdo em preparação para a mitose), que antecedem a fase de mitose propriamente dita (LASHEN et al., 2021). Assim, é possível que exista uma grande quantidade de células ciclantes (em proliferação) que não estejam, ainda, na fase M, de modo que a identificação unicamente das figuras mitóticas pode não expressar, necessariamente, o índice proliferativo real de uma neoplasia.

Diante do exposto, a realização de estudos analisando a expressão imunohistoquímica do antígeno Ki67, uma proteína histona expressa no núcleo de células ciclantes, independentemente da fase do ciclo celular, que tem sido amplamente utilizado como principal marcador *in situ* de proliferação (MENON et al., 2019), pode representar uma boa estratégia de investigar a veracidade dessa teoria.

Por uma segunda óptica, mas não menos importante, o crescimento tumoral depende do balanço entre proliferação e morte celular; assim, ainda que não tenha sido reduzido o índice proliferativo tumoral, a fração de crescimento de uma neoplasia pode diminuir em razão do aumento da morte celular por apoptose (WANG et al., 2013). Depreende-se disso que os compostos químicos presentes no SistP, especificamente a betanina, poderiam ter atuado não no bloqueio proliferativo das células ciclantes, mas sim induzindo aumento da morte de células tumorais por vias apoptóticas (CHEN et al., 2021).

No presente estudo, os índices de proliferação e morte dos tumores foram avaliados pela expressão imuno-histoquímica do antígeno Ki67 e detecção histoquímica da fragmentação *in situ* do DNA (TUNEL), respectivamente. O padrão de imunoexpressão do Ki67 foi predominantemente nuclear, com algumas poucas células apresentando positividade citoplasmática espúria. A positividade do TUNEL foi tipicamente nuclear. A imunoexpressão dos antígenos Caspase-3 clivada e Bax foi utilizada para investigar a ativação da apoptose por via mitocondrial em células tumorais. Ambos apresentaram padrão de expressão citoplasmático (**Figura 11**).

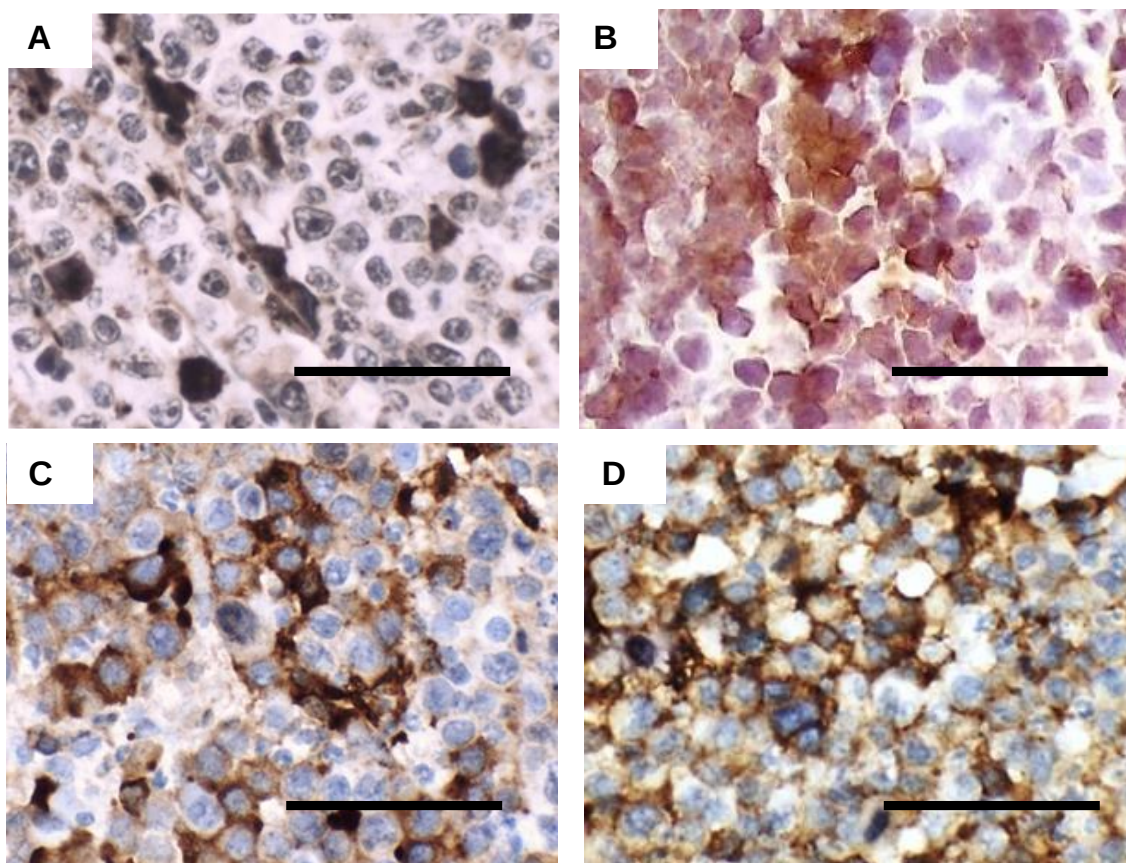


Figura 11. Fotomicrografias de secções histológicas de tumores tipo Sarcoma 180 de camundongos (grupo tratado com solução salina) demonstrando o padrão de expressão dos diferentes constituintes celulares pesquisados por técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas. (A) Antígeno Ki67 e (B) extremidades livres 3'OH de DNA (TUNEL) exibindo padrão de marcação tipicamente nuclear. (C) Antígenos Caspase-3 ativa e (D) proteína Bax exibindo padrão citoplasmático de imunomarcação (Bar = 250 μ m).

Nesse trabalho, o índice proliferativo dos tumores foi avaliado por meio da expressão imuno-histoquímica do antígeno Ki67, uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas não em células quiescentes (G0) (MENON et al., 2019). Além disso, a meia-vida muito curta do Ki67 (aproximadamente uma hora após a mitose) garante que o antígeno não será mais expresso em células que saíram do ciclo celular, fornecendo informações valiosas sobre a taxa proliferativa do tumor (LI et al., 2015). Conforme demonstrado na **Figura 12 A**, o número de células proliferativas positivas para Ki67 no grupo 5-FU ($10,1 \pm 2,5\%$) foi significativamente menor do que no grupo Salina ($25,5 \pm 10,3\%$; $p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre esses grupos e SistP 3 ($22,6 \pm 3,8\%$), SistP 10 ($24,3 \pm 4,7\%$) e SistP 30 ($16,6 \pm 2,9\%$).

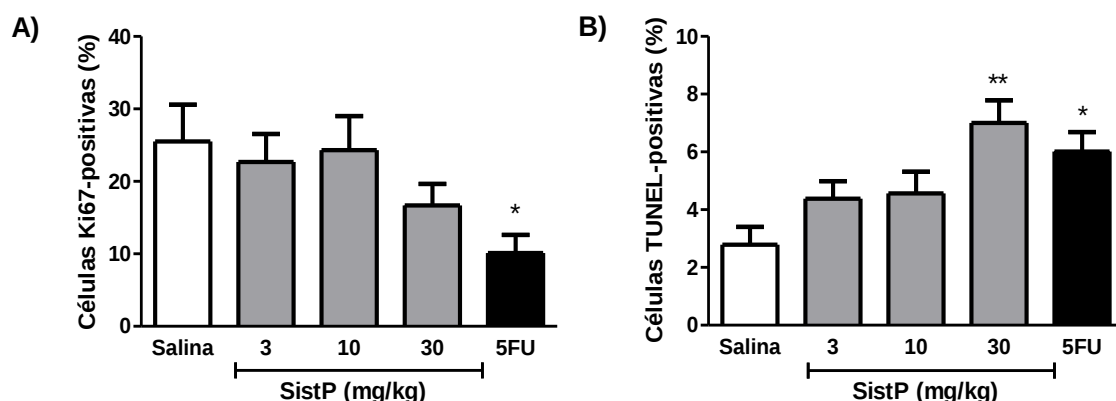


Figura 12. Análise quantitativa da (A) expressão imuno-histoquímica da proteína histona Ki67 e (B) detecção histoquímica de extremidade 3'OH livre de fragmentos de DNA (TUNEL) em células de sarcoma 180 murino submetidos a diferentes tratamentos experimentais. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças significativas em comparação com o grupo Salina estão expressas como * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (Teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey).

A imunoexpressão de Ki67 significativamente reduzida observada no sarcoma 180 de camundongos tratados com 5-FU está de acordo com outros relatos (REZENDE et al., 2021; ALVES et al., 2023), o que reflete a inibição da enzima timidilato sintetase e, conseqüentemente, a síntese de constituintes do DNA (JIN et al., 2020). No entanto, de acordo com os dados obtidos na análise do índice mitótico, o tratamento com SistP, mesmo na dose mais elevada (30 mg/kg), não teve impacto significativo na expressão de Ki67 das células tumorais. Esses dados sugerem que o efeito antitumoral do extrato estaria mais provavelmente relacionado a um aumento da morte celular do que a uma redução da proliferação celular.

Para se compreender melhor os mecanismos envolvidos na potencial indução de apoptose observada nesse estudo, foram investigados marcadores *in situ* de rotas apoptóticas, como a técnica do TUNEL (KYRYLKOVA et al., 2012) e a expressão imunohistoquímica de caspases (FAN et al., 2005; BOICE et al., 2020), necessárias para confirmar sua validade. No presente estudo, a porcentagem média de células TUNEL-positivas (**Figura 12 B**) nos grupos SistP 30 ($7,0 \pm 0,8\%$) e 5-FU ($6,0 \pm 0,7\%$) foi significativamente maior do que no grupo Salina ($2,8 \pm 1,6\%$; $p < 0,05$). No entanto, não foi observada diferença significativa no índice de morte celular nos grupos SistP 3 ($4,4 \pm 0,6\%$), SistP 10 ($4,5 \pm 0,7\%$) e Salina ($2,8 \pm 0,6\%$) em comparação com nenhum dos outros grupos ($p > 0,05$).

Neste trabalho, o TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) foi utilizado para avaliar o índice de morte celular de células tumorais. O

TUNEL detecta a fragmentação do DNA por meio da marcação da extremidade 3'OH terminal de fragmentos de cadeia simples ("cortes") de ácidos nucleicos (CHUN et al., 2001). No presente estudo, foi observado aumento de células tumorais positivas para TUNEL em resposta ao tratamento com SistP a 30 mg/kg, sugerindo indução de morte celular. Além disso, a fragmentação *in situ* do DNA é uma marca registrada da apoptose celular (MAJTNEROVÁ et al., 2018; KETELUT-CARNEIRO et al., 2022), o que parece apontar para um possível envolvimento da ativação da via da apoptose na atividade antitumoral do extrato. Apoiando esses dados, estudos anteriores mostraram que a exposição à betanina induz aumento da apoptose em leucemia mieloide crônica humana K562 e (SREEKANTH et al., 2007), linhagens celulares de glioma humano U87MG (SALIMI et al., 2021), bem como em SCC131 e células SCC4 de carcinoma de células escamosas oral humano (ZOU et al., 2022). Além disso, o tratamento com extrato de beterraba vermelha enriquecido com betanina (*Beta vulgaris* L.) aumentou a apoptose e a morte celular autofágica em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 (NOWACKI et al., 2015).

Para confirmar a participação de fenômenos apoptóticos mediando a ação antitumoral do SistP observada no presente estudo, foi analisada a imunexpressão de antígenos associados a apoptose celular (**Figura 13 A/B**).

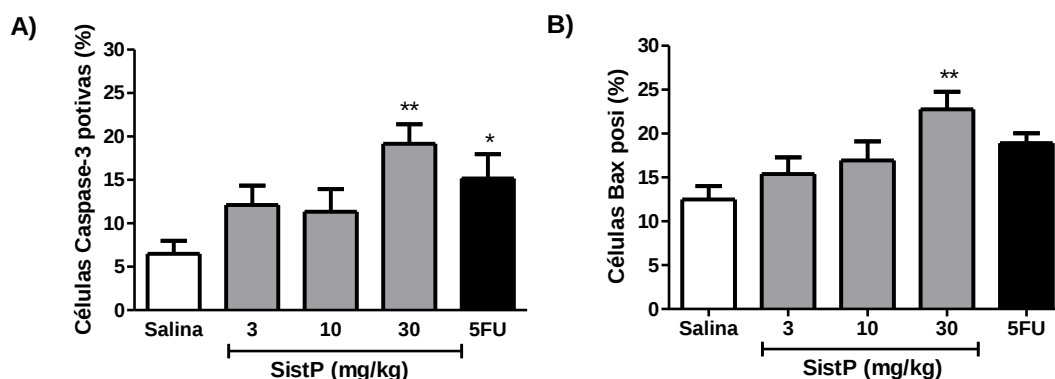


Figura 13. Análise quantitativa da expressão imuno-histoquímica da (A) enzima executora da apoptose Caspase-3 ativa e (B) proteína indutora de permeabilidade mitocondrial Bax em células de sarcoma 180 murino submetidos a diferentes tratamentos experimentais. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças significativas em comparação com o grupo Salina estão expressas como * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (Teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey).

Foi observado que a imunexpressão da caspase-3 ativa se mostrou significativamente aumentada nos grupos SistP 30 ($19,2 \pm 2,2\%$; $p < 0,01$) e 5-FU ($15,1 \pm 2,8\%$; $p < 0,05$) em comparação com Salina ($6,5 \pm 1,4\%$), mas não houve diferença significativa entre eles e os grupos SistP 3 ($12,1 \pm 2,2\%$) e SistP 10 ($11,3 \pm 2,6\%$) ($p > 0,05$). Além disso, o grupo SistP 30 apresentou percentual significativamente aumentado de células Bax-positivas ($22,7 \pm 2,0\%$) em comparação com Salina ($12,5 \pm 1,5\%$; $p < 0,01$). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre eles e os grupos SistP 3 ($15,4 \pm 1,9\%$), SistP 10 ($16,9 \pm 2,1\%$) e 5-FU ($18,8 \pm 1,7\%$) ($p > 0,05$).

O mecanismo de ação da maioria das drogas anticancerígenas que causam apoptose em células tumorais envolve a ativação da via apoptótica intrínseca pela modulação da permeabilidade mitocondrial (PISTRITTO et al., 2016). O aumento da permeabilidade mitocondrial e a liberação do citocromo C mitocondrial são essenciais para ativar a cascata enzimática das caspases no citoplasma e promover as alterações morfológicas necessárias para a formação de corpos apoptóticos, como a clivagem do citoesqueleto e a fragmentação do DNA (ASHKENAZI et al., 2017). Bax e Bak são as proteínas diretamente responsáveis pelo aumento da permeabilidade mitocondrial. Uma vez ativados, Bax e Bak formam poros dentro da membrana externa mitocondrial e liberam citocromo C e outros fatores apoptogênicos da mitocôndria para o citoplasma (VOSS et al., 2020). No presente trabalho, a imunexpressão de Bax foi significativamente aumentada em resposta ao tratamento com SistP na dose de 30 mg/kg, assim como a caspase-3 ativa, o que sugere a ativação da via mitocondrial de apoptose. Apoiando esta hipótese, o aumento da expressão de Bax e caspase-3 foi previamente usado para confirmar o envolvimento da via mitocondrial da apoptose no efeito antitumoral do extrato de cevada fermentado em um modelo de tumor de transplante de células ht-29 humanas em camundongos (YAO et al., 2017). Analisados em conjunto, os dados obtidos da análise de Ki67, TUNEL, caspase-3 ativa e Bax em tumores tratados com SistP 30 mg/kg sugerem que a atividade antitumoral do extrato provavelmente se deve à indução de apoptose pela via mitocondrial.

Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o extrato purificado da *O. ficus-indica* rico em betanina apresenta elevada atividade citotóxica contra células tumorais malignas, bem como forte ação antitumoral em modelo experimental murino de sarcoma 180. Também foram observadas evidências de que esta atividade antitumoral se daria por ativação da via mitocondrial da apoptose em células neoplásicas.

Por outro lado, um dos maiores desafios para o sucesso da quimioterapia antitumoral consiste na minimização de seus efeitos colaterais e/ou adversos, que comumente comprometem a qualidade de vida dos pacientes com câncer (TAO et al., 2020). A perda de massa corpórea, queda de cabelos, imunossupressão, sinais e sintomas gastrointestinais, e distúrbios hepáticos e renais estão entre as principais queixas dos pacientes sob quimioterapia (BEAVER et al., 2016). Por esta razão, o efeito do sistema purificado à base do extrato de *O. ficus-indica* rico em betaninas sobre massa corpórea, leucócitos periféricos, baço e indicadores bioquímicos e morfológicos de função hepática e renal foi analisado no presente estudo.

O efeito dos diferentes tratamentos sobre a massa corpórea dos animais está apresentado na Figura 14. Apesar da massa média dos animais de cada grupo ter oscilado ao longo do período experimental (Figura 11A), apenas em 5-FU o ganho médio de massa ($0,82 \pm 1,8\%$) foi significativamente menor que em Salina ($14,1 \pm 2,9\%$; $P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre o ganho de massa observado nos grupos SistP 3 ($17,8 \pm 2,6\%$), SistP 10 ($16,2 \pm 3,8\%$) e SistP 30 ($15,8 \pm 1,3\%$) em relação ao grupo salina ($p > 0,05$).

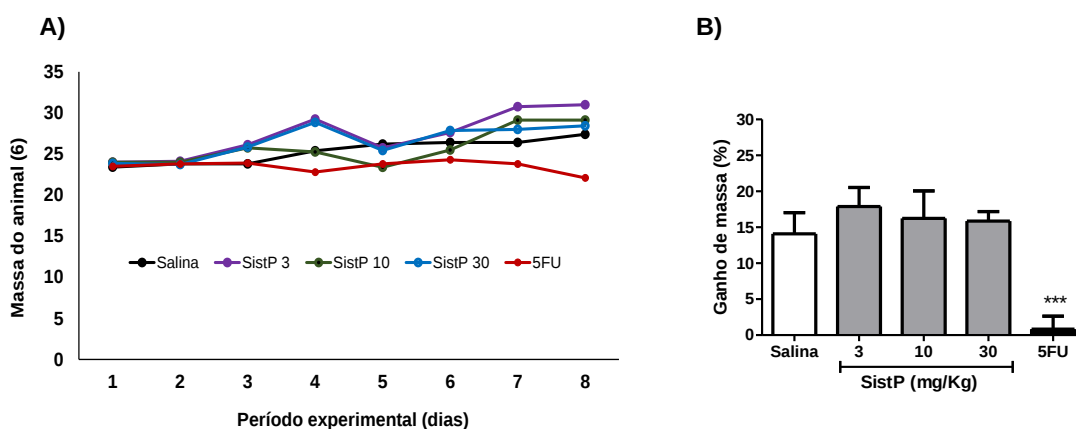


Figura 14. (A) Variação diária da massa média nos animais dos grupos submetidos a modelo experimental murino de transplantação de sarcoma 180 tratados com veículo (Salina) e Sistema Purificado de *O. ficus-indica* rico em betaninas (SistP) nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg e 5-FU na dose de 25 mg/kg ao longo dos oito dias de período experimental. **(B)** Ganho percentual médio de massa corpórea nos animais dos diferentes grupos experimentais após os oito dias de período experimental. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferença significativa simultaneamente observada em comparação com os grupos Salina, SistP 3, SistP 10 e SistP 30 estão expressas como *** $p < 0,001$ (Anova e Teste de comparações múltiplas de Tukey).

Para avaliar o efeito dos agentes antitumorais testados no presente estudo sobre o sistema imunohematológico, foi realizada a análise da série vermelha (eritrocitária, **Tabela 4**) e branca (leucocitária, **Tabela 5**) nos animais experimentais. Não houve qualquer alteração significativa ($p>0,05$) nos valores referentes a série vermelha nas amostras analisadas, mas foi observada significativa leucopenia total nos animais tratados com 5-FU. A análise das contagens leucocitárias diferenciais indicam que esta condição leucopênica parece estar associada a neutropenia importante, determinando consequentemente uma condição de “pseudolinfocitose”. O tratamento com SistP não promoveu qualquer indício de supressão imunohematológica, independentemente da dose testada (ARAUJO et al., 2016).

O potencial efeito deletério do extrato purificado rico em betanina obtido a partir do extrato bruto de *O. ficus-indica* sobre as funções hepáticas e renais dos animais experimentais foi avaliado por meio das dosagens bioquímicas de AST e ALT (marcadores hepáticos) e ureia e creatinina (marcadores renais) (Tabela 6). Apenas o grupo 5-FU apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) da enzima aspartato aminotransferase (AST). Esse aumento, contudo, se apresentou muito próximo do limite máximo de referência descritos por Araújo et al (2016) e parece sugerir apenas indícios de discreta hepatopatia induzida pelo quimioterápico.

Tabela 4. Efeito da administração do extrato purificado de *Opuntia ficus-indica* rico em betanina sobre a série vermelha do sangue periférico de animais submetidos a transplantação de células tumorais do Sarcoma 180.

Grupo	Hemácias totais ($\times 10^6$ células/mm ³)	Hematócrito (%)	Volume corpuscular médio (VCM) (fL)	Hemoglobina total (g/dL)	Hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg)	Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (%)
Salina	7,4 $\pm$ 2,8	43,0 $\pm$ 17,1	54,4 $\pm$ 1,7	14,2 $\pm$ 5,7	12,2 $\pm$ 1,2	32,9 $\pm$ 0,5
SistP 3 (3 mg/kg)	6,5 $\pm$ 2,0	36,5 $\pm$ 11,9	56,1 $\pm$ 1,5	12,1 $\pm$ 3,8	18,5 $\pm$ 0,7	33,2 $\pm$ 0,9
SistP 10 (10 mg/kg)	8,4 $\pm$ 0,7	48,2 $\pm$ 4,3	56,8 $\pm$ 1,6	16,2 $\pm$ 1,3	19,1 $\pm$ 0,6	33,7 $\pm$ 0,7
SistP 30 (30 mg/kg)	9,2 $\pm$ 1,9	52,7 $\pm$ 11,8	57,0 $\pm$ 1,6	17,3 $\pm$ 3,6	18,8 $\pm$ 0,4	33,0 $\pm$ 0,5
5-FU (25 mg/kg)	6,0 $\pm$ 1,6	46,1 $\pm$ 8,3	56,9 $\pm$ 1,3	12,7 $\pm$ 3,9	19,3 $\pm$ 1,3	33,3 $\pm$ 0,5

Tabela 5. Efeito da administração do extrato purificado de *O. ficus-indica* rico em betanina sobre a série branca do sangue periférico de animais submetidos a transplantação de células tumorais do Sarcoma 180.

Grupo	Leucócitos totais ($\times 10^3$ células/mm ³)	Contagem Diferencial de Leucócitos (%)		
		Linfócitos	Monócitos	Neutrófilo
Salina	3,6 $\pm$ 2,2	56,4 $\pm$ 23,2	8,4 $\pm$ 1,6	35,1 $\pm$ 22,6
SistP 3 (3 mg/kg)	3,4 $\pm$ 2,7	54,5 $\pm$ 12,9	12,5 $\pm$ 3,1	29,3 $\pm$ 10,9
SistP 10 (10 mg/kg)	4,6 $\pm$ 2,7	49,3 $\pm$ 17,8	9,9 $\pm$ 3,4	40,7 $\pm$ 14,7
SistP 30 (30 mg/kg)	4,3 $\pm$ 1,8	58,4 $\pm$ 16,6	9,2 $\pm$ 2,4	32,4 $\pm$ 14,5
5-FU (25 mg/kg)	0,6 $\pm$ 0,3***	87,6 $\pm$ 14,8***	1,0 $\pm$ 1,6***	10,5 $\pm$ 6,5***

*** Significativamente diferente dos demais grupos (p < 0,001; ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey).

Tabela 6. Efeito da administração do SistP em diferentes concentrações nos parâmetros bioquímicos.

GRUPO	ALT (U/L)	AST (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Salina	105,4 ± 7,25	123,5 ± 4,05 ^a	43,8 ± 3,55	0,32 ± 0,01
SistP 3 (3 mg/kg)	104,9 ± 8,12	122,7 ± 10,04 ^a	44,7 ± 3,72	0,34 ± 0,02
SistP 10 (10 mg/kg)	104,9 ± 7,21	123,4 ± 11,74 ^a	43,9 ± 3,72	0,33 ± 0,01
SistP 30 (30 mg/kg)	104,1 ± 9,55	123,1 ± 10,28 ^a	42,1 ± 4,44	0,32 ± 0,01
5-FU (25 mg/kg)	110,2 ± 14,8	203,4 ± 14,80 ^b	43,52 ± 3,20	0,33 ± 0,05
VALORES DE REFERÊNCIA (min – máx)	95,4 ± 25,1 (64,0 – 167,0)	112,9 ± 31,5 (57,0 – 199,0)	44,9 ± 7,8 (33,0 – 59,0)	0,3 ± 0,1 (0,2 – 0,4)

Os dados são apresentados como média ± Erro Padrão da Média de 40 animais. Letras diferentes na mesma coluna representam valores médios significativamente diferentes ($p < 0,05$ – teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey). Valores de referência para camundongos Swiss (ARAÚJO et al., 2016).

A possibilidade de indução de efeito deletério sobre indicadores de *status* imunológico e de função hepática e renal foi também analisada por meio da avaliação da massa ponderal média do baço, fígado e rins, respectivamente, dos animais experimentais. Como pode ser observado na **Figura 15**, não houve diferença significativa na massa ponderal média do fígado e rins entre os grupos analisados ($p > 0,05$). Estes dados estão em consonância com aqueles obtidos na análise bioquímica dos marcadores AST, ALT, ureia e creatinina anteriormente citados no presente estudo. A ausência de alterações substanciais na massa ou aparência macroscópica desses órgãos, assim como nos seus indicadores bioquímicos de função, sugere que não houve efeitos toxicológicos nesses órgãos, pelo menos em curto prazo de administração e análise (BASTOS et al., 2018; ANDRADE et al., 2018; AMARAL et al., 2020; REZENDE et al., 2020).

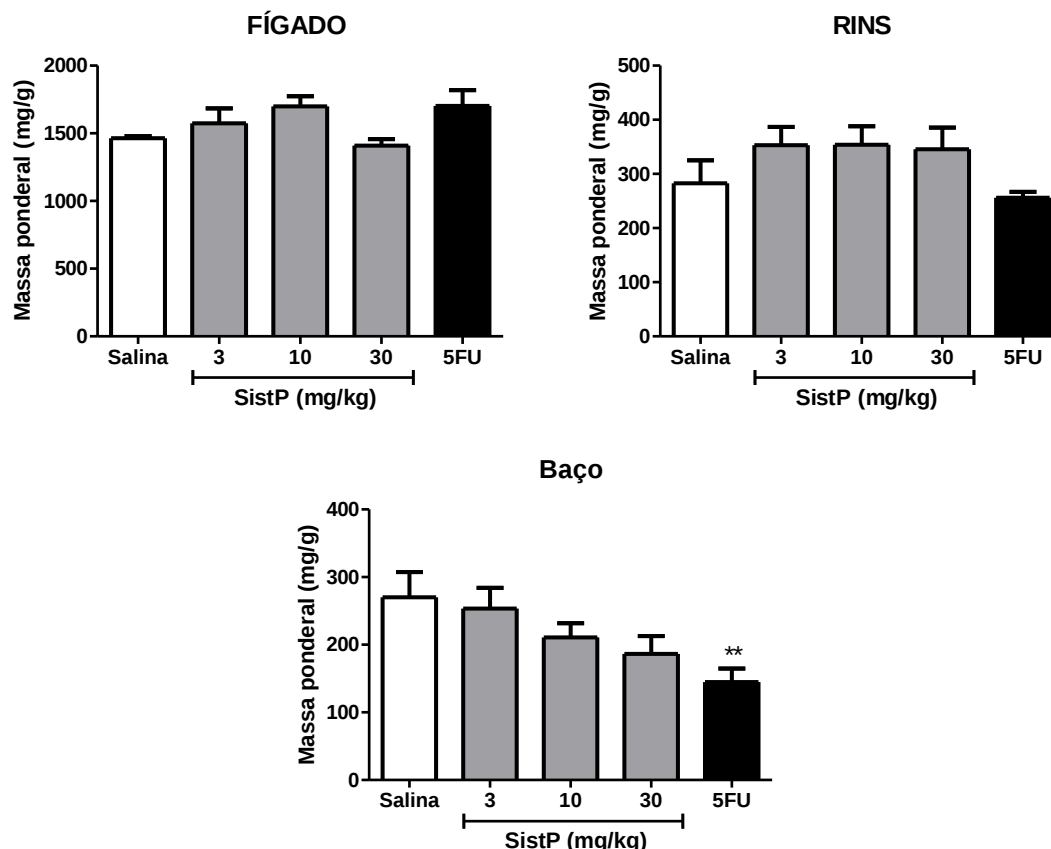


Figura 15. Determinação da massa ponderal média do fígado, rins e baço nos animais dos grupos submetidos a modelo experimental murino de transplantação de sarcoma 180 tratados com veículo (Salina) e extrato purificado de *O. ficus-indica* rico em betanina (SistP) nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg e 5-fluorouracil (5-FU) na dose de 25 mg/kg ao longo dos oito dias de período. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferença significativa simultaneamente observada em comparação com os grupos Salina estão expressas como * $p < 0,05$ (Anova e Teste de comparações múltiplas de Tukey).

Por outro lado, a **Figura 15** mostra que o 5-FU induziu uma redução significativa da massa ponderal esplênica ($144,9 \pm 19,8$ mg/g) em comparação com o grupo Salina ($270,3 \pm 37,1$ mg/g; $p < 0,05$). Esses dados também corroboram aqueles obtidos na análise hematológica da série branca (leucocitária), e são sugestivos de indução de imunossupressão (KE et al., 2016). Não houve diferença significativa, contudo, nas massas ponderais esplênicas dos grupos SistP 3 ($253,6 \pm 30,6$ mg/g), SistP 10 ($210,7 \pm 20,9$ mg/g) e SistP 30 ($186,6 \pm 26,3$ mg/g), e nem entre elas e os grupos salina e 5-FU ($p > 0,05$).

Assim como anteriormente relatado por El-Sayyad et al., (2009), o tratamento com 5-FU promoveu, no presente estudo, efeitos colaterais como perda de massa

corpórea, mielossupressão severa e indícios de hepatopatia. Estes efeitos deletérios induzidos por esse quimioterápico também foram observados em modelo murino de sarcoma 180 por Bastos et al. (2018), Andrade et al (2018), Amaral et al. (2020) e Rezende et al. (2021), suportando os achados de toxicidade desse composto. No entanto, nenhuma das doses testadas do sistema purificado rico em betanina obtido do extrato de *O. ficus-indica* promoveu alterações expressivas imunohematológicas ou nos indicadores bioquímicos de função renal e hepática. Esses dados sugerem certa segurança no uso do sistema na dose terapêutica identificada no presente trabalho.

Porém, não se deve perder de vista que o tempo de tratamento com o 5-FU e SistP foi relativamente curto, o que pode ter influenciado nos dados bioquímicos aqui analisados (OLIVEIRA et al. 2011; PASSONI et al., 2013). Ainda assim, a ausência de toxicidade do sistema purificado testado no presente estudo parece ser corroborada por investigações prévias realizadas por Halmi et al. (2013), demonstrando que a suplementação dietética diária de coelhos com 2 g/kg de extrato aquoso de cladódios de *O. ficus-indica* por três meses consecutivos não promoveu qualquer indício de efeito toxicológico nos animais experimentais. Adicionalmente, a suplementação da água oferecida a ratos Wistar com 25% de solução obtida a partir de folhas de *O. ficus-indica* por três meses também não mostrou sinais clínicos ou morfofuncionais de toxicidade (Hfaiedh et al., 2008).

De especial interesse foi o fato de que o tratamento com SistP na dose de 30 mg/kg promoveu atividade antitumoral significativa e comparável ao quimioterápico convencional (5-FU), mas não apresentou efeito toxicológico expressivo, sobre os indicadores hematológicos e bioquímicos. Estes dados parecem sugerir que a dose de 30 mg/kg do SistP pode ser tão efetiva quanto o quimioterápico convencional, utilizado como controle positivo no presente estudo, no combate à progressão tumoral do sarcoma 180, mas substancialmente menos agressivo às células e tecidos normais do organismo. Diante destes dados, é possível inferir que esta dose poderia funcionar como ponto de partida para estudos posteriores visando o desenvolvimento de formulações passíveis de serem testadas em ensaios de atividade antitumoral e/ou quimiopreventiva em outros sistemas biológicos mais complexos e, quiçá, em humanos.

7. CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos, e dentro das condições experimentais estudadas no presente trabalho, é possível concluir que:

- ✓ O extrato purificado de *O. ficus-indica* rico em betanina (SistP, 30 µg/mL) apresentou forte citotoxicidade (>75%) contra as células tumorais HCT-116, SNB19 e PC3.
- ✓ O extrato purificado de *O. ficus-indica* rico em betanina (SistP, 30 mg/kg) promoveu inibição do crescimento tumoral de maneira comparável ao quimioterápico padrão 5 fluorouracil.
- ✓ Os sarcomas 180 desenvolvidos em animais tratados com extrato purificado de *O. ficus-indica* rico em betanina (SistP, 30 mg/kg) exibiram características histológicas sugestivas de menor agressividade tumoral (crescimento mais expansivo que infiltrativo e menor quantidade de áreas de necrose).
- ✓ A atividade antitumoral desempenhada pelo extrato purificado de *O. ficus-indica* rico em betanina (SistP, 30 mg/kg) parece estar associada a ativação da apoptose em células tumorais pela via mitocondrial.
- ✓ A administração do extrato purificado de *O. ficus-indica* rico em betanina (SistP) não promoveu alterações hematológicas, anatomopatológicas ou bioquímicas sugestivas de efeitos toxicológicos sobre o sistema imunológico ou sobre a função hepática e renal dos animais experimentais em qualquer uma das doses testadas.

8. REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.; DAVIES, J.; RANDALL, S.; SKINNER, G.R.B. Antiviral properties of extract of opuntia streptacantha. *Antiviral Research* 1996; 30(2-3):75-85.
- AKKOL, E. K.; ILHAN, M., KARPUZ, B., GENÇ, Y., & SOBARZO-SÁNCHEZ, E. (2020). Sedative and anxiolytic activities of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill.: An experimental assessment in mice. *Molecules*, 25(8), 1844.
- ALHAZZAZI, T.Y.; KAMARAJAN, P.; JOO, N.; HUANG, J.Y.; VERDIN, E.; D'SILVA, N.J.; KAPILA, Y.L. Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer. *Cancer*. 2011; 117:1670–1678
- ALLEN, C.; HER, S.; JAFFRAY, D.A. Radiotherapy for Cancer: Present and Future. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2017; 109: 1-2.
- AMARAL, R.G.; dos SANTOS, S.A; ANDRADE, L.N.; SEVERINO, P.; CARVALHO, A.A. Natural Products as Treatment against Cancer: A Historical and Current Vision. *Clinics in Oncology* 2019; 4(5):1562.
- AMAYA-CRUZ, D.M.; PÉREZ-RAMÍREZ, I.F.; DELGADO-GARCÍA, J.; ONDRAGÓN-JACOBO, C.; DECTOR-ESPINOZA, A. *et al.* An integral profile of bioactive compounds and functional properties of prickly pear (*Opuntia ficus indica* L.) peel with different tonalities. *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2018.11.031
- ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Research*. 2008; 25(9):2097–116.
- ARAÚJO FILHO, J.A.D.; CARVALHO, F.C.D.; GARCIA, R.; SOUSA, R.A.D. 2002. Efeitos da Manipulação da Vegetação Lenhosa sobre a Produção e Compartimentalização da Fitomassa Pastável de uma Caatinga Sucessional. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2002; (31):11-19.
- ARLEV, E.; NEVO, E.; MIRSKY, N.; OFIR, R. Antidiabetic Attributes of Desert and Steppic Plants: A Review. *Planta Medica* 2013; 79(6):425-36.
- ARNOLD, M.; RUTHERFORD, M.J.; BARDOT, A.; FERLAY, J.; ANDERSSON, T.M.; MYKLEBUST, T. Å.; BRAY, F. (2019). Progresso na sobrevivência, mortalidade e incidência do câncer em sete países de alta renda 1995–2014 (ICBP SURVMARK-2): um estudo de base populacional. *The Lancet Oncology* , 20 (11), 1493-1505.
- ARUWA, C. E.; AMOO, S.; KUDANGA, T. (2019). Phenolic compound profile and biological activities of Southern African *Opuntia ficus-indica* fruit pulp and peels. *Lwt*, 111, 337-344.
- ASENJO, J.A.; ANDREWS, B.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. *Journal of Chromatography A* 2012; 1238:1-10.

BABAEI, G.; ALIARAB, A.; ABROON, S.; RASMI, Y.; AZIZ, S.G.-G. Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; 106: 239-246.

BELCARO, G. A controlled study of a lecithinized delivery system of curcumin (Meriva (R)) to alleviate the adverse effects of cancer treatment, *Phytother. Research*. 2014; 28(3) 444–450.

BERRIDGE, M.V.; HERNEST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review* 2005; 11(5): 127–152.

BLACK, J.R.M.; MCGRANAHAN, N. Genetic and non-genetic clonal diversity in cancer evolution. *Nat Rev Cancer* 2021; 21:379-392.

BOICE, A.; BOUCHIER-HAYES L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020;1867(6):118688.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R.L.; TORRE, L.A.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018.

BRAY, F.; LORTET-TIEULENT, J.; FERLAY, J.; FORMAN, D.; AUVINEN, A. Prostate cancer incidence and mortality trends in 37 European countries: an overview. *Europ Journal Cancer*. 2010;46(17):3040-52.

BRESSAN, S.; PIERANTONI, A.; SHARIFI, S.; FACCHINI, S.; QUAGLIARIELLO, V.; BERRETTA, M. Chemotherapy-Induced Hepatotoxicity in HIV Patients. *Cells* 2021; 10:2871.

BREWER, M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2011; 10(4):221-247.

BRIGATI, A.; SPAHN, M.; JONIAU, S.; GONTERO, P.; et al. Impact of age and comorbidities on long-term survival of patients with high-risk prostate cancer treated with radical prostatectomy: a multi-institutional competing-risks analysis. *European urology*. 2013; 63(4):693-701.

BURDALL, S. E.; HANBY, A. M.; LANSDOWN, M. R.; SPERRS, V. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast cancer research*. 2003; 5(2) 89-95.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural products derived compounds in clinical trials. *Natural Products Rep*. 2008; 25(3): 475-516.

CASTILLO-FERRER, C.; BERTHENET, K.; ICHIM, G. Apoptosis – Fueling the oncogenic fire. *FEBS J* 2021; 288:4445-4463.

CASTRO-LÓPEZ, C.; VENTURA-SOBREVILLA, J. M.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, M. D.; ROJAS, R.; ASCACIO-VALDÉS, J.A.; AGUILAR, C. N., & MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C.

G. *Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. Food Chemistry* 2017; 237, 1139-1148.

CAVALCANTE, D.R.; OLIVEIRA, P.S.; GÓIS, S.M.; SOARES, A.F.; et al. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. *Journal of Otorhinolaryngology*. 2011;77(3):278-84.

CHAVAN, B. A.; HUNDIWALE, J. C. PATIL, A. V. Plant latex: an inherent spring of pharmaceuticals. 2015; 4: 04; 1781-1796.

CHAVEZ-SANTOSCOY, R.A.; GUTIERREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDÍVAR, S.O. Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and In Vitro Cancer Cell Cytotoxicity of Nine Prickly Pear (*Opuntia* spp.) Juices. *Plant Foods for Human Nutrition* 2009; 64(2): 146-152.

CHAVEZ-SANTOSCOY, R.A.; GUTIERREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDÍVAR, S.O. Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and In Vitro Cancer Cell Cytotoxicity of Nine Prickly Pear (*Opuntia* spp.) Juices. *Plant Foods for Human Nutrition* 2009; 64(2):146-12.

CHEN, L.; ZHU, Y.; HU, Z.; WU, S.; JIN, C. Beetroot as a functional food with huge health benefits: Antioxidant, antitumor, physical function, and chronic metabolomics activity. *Food Sci Nutr*. 2021 9;9(11):6406-6420.

CHITEVA, R.; WAIRAGU, N. Chemical and nutritional content of *Opuntia ficus-indica* (L.). *African Journal of Biotechnology* 2013; 12(21):3309-12.

COSTA-LOTUFO, L.V. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual Química*. 2010; 2(1):47-58

COSTA-LOTUFO, L.V. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual Química*. 2010; 2(1):47-58.

COX, T. R. (2021). The matrix in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 21(4), 217-238.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry Reviews*. 2009; 8: 313–331.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 100(1-2), 72-79.

CURTI, V.; CAPELLI, E.; BOSCHI, F.; NABAVI, S. F. Modulation of human miR-17–3p expression by methyl 3-O-methyl gallate as explanation of its in vivo protective activities. *Molecular Nutritional Food Research*. 2014; 58 (9):1776–84.

DAS THAKUR, M.; PRYER, N.K.; SINGH, M. Mouse tumour models to guide drug development and identify resistance mechanisms. *J Pathol*. 2014; 232(2):103-11.

DASHORA, N.; SODDE, V.; BHAGAT, J.; PRABHU, K. S. Antitumor activity of *Dendrophthoe falcate* against Ehrlich Ascites Carcinoma in swiss albino mice. *Pharm Crops*. 2011; 2: 1-7.

DASKIVICH, T. J.; FAN, K. H.; KOYAMA, T.; ALBERTSEN, P. C. Effect of age, Tumor risk, and comorbidity on competing risks for survival in a US population-based cohort of men with prostate cancer. *Annals of internal medicine*. 2013; 158(10):709-17.

DE ASSIS, C. M. R. B.; DE ALBUQUERQUE MELO, H. M.; DE ALBUQUERQUE MELO, E. M.; KITNER, D.; JÚNIOR, J. I. C. (2011). Oncologia geriátrica: conceitos, tendências e desafios. *Geriatrics & Gerontology*, 106.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2000; 40(3): 173-289.

DOMINGOS, H. Y. B.; MOREIRA, S. S.; ALVES, M. S.; OLIVEIRA, F. B.; DA CRUZ, C. B. L.; SILVA, M. D. S.; RETT, M. T. (2021). Cinesioterapia para melhora da qualidade de vida após cirurgia para câncer de mama. *Fisioterapia Brasil*, 22(3), 385-397.

DURANTE, M.; FORMENTI, S. C. Radiation-Induced Chromosomal Aberrations and Immunotherapy: Micronuclei, Cytosolic DNA, and Interferon-Production Pathway. *Frontiers in Oncology* 2018; 8.

DUTTA, S.; MAHALANOBISH, S.; SAHA, S.; GHOSH, S.; SIL, P. C. (2019). Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 128, 240-255.

DZOBO, K. The Role of Natural Products as Sources of Therapeutic Agents for Innovative Drug Discovery. *Comprehensive Pharmacology* 2022; 408-22.

EL-MOSTAFA, K.; EL-KHARRASSI, Y.; BADREDDINE, A.; ANDREOLETTI, P.; VAMECQ, J.; EL-KEBBAJ, M.S. et al. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules* 2014; 19(9):14879-901.

EL-RAZEK, F.H.A.; HASSAN, A.A. Nutritional Value and Hypoglycemic Effect of Prickly Cactus Pear (*Opuntia Ficus-Indica*) Fruit Juice in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2011; 5(10):356-77.

ENGEL, L. W.; YOUNG, N. A.; TRALKA, T. S.; LIPPMAN, M. E.; et al. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer research*. 1978; 38(10) 3352-3364.

FAN, T.J.; HAN, L.H.; CONG, R.S.; LIANG, J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2005 Nov;37(11):719-27. doi: 10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x. PMID: 16270150.

FARATIAN, D.; MUNRO, A.; TWELVES, C.; BARTLETT, J.M. Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with HER2 and ER status in invasive breast carcinoma. *Histopathology*. 2009;54(2):254–257.

FARIAS, S. H.; MAIA, NETO, W. L.; TOMAZ, K. P.; FIGUEIREDO, F. W. D. S.; ADAMI, F. (2021). Are the Temporal Trends of Stomach Cancer Mortality in Brazil Similar to the Low, Middle, and High-Income Countries?. *Frontiers in Public Health*, 9, 677012.

FENG, Y.; LI, F.; YAN, J.; GUO, X.; WANG, F.; SHI, H. Pan-cancer analysis and experiments with cell lines reveal that the slightly elevated expression of DLGAP5 is involved in clear cell renal cell carcinoma progression. *Life Sci* 2021; 15(287):120056.

FERLAY, J., COLOMBET, M., SOERJOMATARAM, I., PARKIN, D. M., PIÑEROS, M., ZNAOR, A., & BRAY, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 149(4), 778-789.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M., Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base. GLOBOCAN 2012. *International Agency for Research on Cancer*. 2014; 1(11).

FERREIRA, D.; ADEGA, F.; CHAVES, R. The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methylome Analysis and Anticancer Drugs Testing Additional information is available at the end of the chapter, 2013

FROZZA, C.O.S.; SANTOS, D.A.; RUFATTO, L.C.; SCARIOT, F.J.; ECHEVERRIGARAY, S. et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2017; 91: 951–963.

GHONCHEH, M.; MIRZAEI, M.; SALEHINIYA, H. Incidence and Mortality of Breast Cancer and their Relationship with the Human Development Index (HDI) in the World in 2012. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2015; 16(18):8439-43.

GIUSEPPE, B. Ab Initio and DFT Study on Cyclophosphamide: Anticancer and Immunomodulating Agents. *Australian Journal of Chemistry* 2018; 71:511-523

GOODSON 3RD, W.H.; LOWE, L.; CARPENTER, D.O.; GILBERTSON, M.; et al. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead. *Carcinogenesis*. 2015; 36(1): S254–S296.

GULLETT, N. P.; RUHUL, A. A. R.; BAYRAKTAR, S. Cancer prevention with natural compounds. *Semin Oncol*. 2010; 37(3): 258–281.

GUO, ZR. Modification of natural products for drug discovery. *Acta Pharmaceutica-Sinica* 2012; 47:144–157.

HARDONNIÈRE, K.; SAUNIER, E.; LEMARIÉ, A.; FERNIER, M.; GALLAIS, I. The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces a Warburg-like metabolic reprogramming dependent on NHE1 and associated with cell survival. *Scientific Reports*. 2016; 6: 30776.

HARLEV, E.; NEVO, E.; SOLOWEY, E.; BISHAYEE, A. Cancer Preventive and Curative Attributes of Plants of the Cactaceae Family: A Review. *Planta Med* 2013; 79(09):713-722.

HASSANIPOUR-AZGOMI, S.; MOHAMMADIAN-HAFSHEJANI, A.; MAHSHD, G.; FARHAD, T. Incidence and mortality of prostate cancer and their relationship with the Human Development Index worldwide. *Prostate Internacional*. 2016; 4:118-124.

HATTA, M.N.A.; MOHAMAD, E.A.; CHIN, S.F.; NEOH, H.M. Pathogens and Carcinogenesis: A Review. *Biology* 2021; 10:533.

HERNÁNDEZ-BECERRA, E.; AGUILERA-BARREIRO, M.L.A.; CONTRERAS-PADILLA, M.; PÉREZ-TORRERO, E.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.E. Nopal cladodes (*Opuntia Ficus Indica*): Nutritional properties and functional potential. *Journal of Functional Foods* 2022; 95.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J.A.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J. Chromatogr. A*. 2010; 1217: 2495-2511.

HERRMANN, J. Adverse cardiac effects of cancer therapies: cardiotoxicity and arrhythmia. *Nat Rev Cardiol* 2020; 17: 474-502.

HEW, L.; KANDEL, R.; DAVIS, A.; O'SULLIVAN, B.; CATTON, C.; BELL, R. Histological necrosis in soft tissue sarcoma following preoperative irradiation. *J Surg Oncol*. 1994;57(2):111-4.

HU, K.; DING, P.; WU, Y.; TIAN, W.; PAN, T.; & ZHANG, S. (2019). Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality according to sociodemographic indices: an observational study based on the global burden of disease. *open BMJ*, 9 (10), e028461.

HUANG, M.Y.; ZHANG, L.L.; DING, J.; LU, J.-J. Anticancer drug discovery from Chinese medicinal herbs. *Chin Med* 2018; 13(35).

INCA, 2015. ESTIMATIVA 2016: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro, 2019.

IQBAL, M.S.; WEST, N.; RICHMOND, N.; KOVARIK, J.; GRAY, I.; WILLIS, N. A systematic review and practical considerations of stereotactic body radiotherapy in the treatment of head and neck cancer. *Br J Radiol* 2021; 94:20200332.

JIN, G.; LI, Z.; XIAO, F.; QI, X.; SUN, X. Optimization of activity localization of quinoline derivatives: Design, synthesis, and dual evaluation of biological activity for potential antitumor and antibacterial agents. *Bioorg Chem*. 2020; 99:103837

KAMIOKA, H.; OSAKA, S.; SUZUKI, K.; RYU, J. Suppressive effects of bisphosphonate on bone resorption induced by murine sarcoma. *Nihon University Journal Medicine*. 1999; 41:121–33.

KAUR, M.; KAUR, A.; SHARMA, R. Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2012; 02(07):15-18.

KESSEL, D. Some determinants of partitioning behavior of lymphoblasts in aqueous biphasic systems. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1981; 678(2):245-249.

KHAN, I.; BAJPAI, V. K.; CHUL, S.; BAHUGUNA, A.; KANG, S. C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 2017; 12: 115–118.

KRAJKA-KUŹNIAK, V.; PALUSZCZAK, J.; SZAEFER, H., & BAER-DUBOWSKA, W. Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. *British Journal of Nutrition*. 2013; 110(12), 2138-2149.

KUMAR, S. V.; SARAVANAN, D.; KUMAR, B.; JAYAKUMAR, A. An update on prodrugs from natural products. *Asian Pac J Trop Med* 2014; 7(Suppl 1): S54-S59.

KYRYLKOVA, K.; KYRYACHENKO, S.; LEID, M.; KIOUSSI, C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*. 2012; 887:41-7.

LASHEN, A.; TOSS, M.S.; ALSALEEM, M.; GREEN, A.R.; MONGAN, N.P.; RAKHA, E. The characteristics and clinical significance of atypical mitosis in breast cancer. *Mod Pathol*. 2022; 70(2):83-98

LASHEN, A.G.; TOSS, M.S.; KATAYAMA, A.; GOGNA, R.; MONGAN, N.P.; RAKHA E.A. Assessment of proliferation in breast cancer: cell cycle or mitosis? An observational study. *Histopathology*. 2021; 79(6):1087-1098.

LEE, S.Y.; JU, M.K.; JEON, H.M.; JEONG, E.K.; LEE, Y.J.; KIM, C.H.; PARK, H.G.; HAN, S.I.; KANG, H.S. Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2018. 31; 2018: 3537-47.

LEE, H. J.; LEE, J. H.; LEE, E. O.; LEE, H. J. Substance P and beta-endorphin mediate electro-acupuncture induced analgesia in mouse cancer pain model. *Journal Experimental Clinical Cancer Research*. 2009; 28:102.

LEE, Y. L.; KIM, H. J.; LEE, M. S.; KIM, J. M.; HAN, J. S.; HONG, E. K. Oral Administration of *Agaricus blazei* (H1 Strain) Inhibited Tumor Growth in a Sarcoma 180 Inoculation Model. *Experimental Animals* 2003; 52(5):371-375.

LEONETTI, C.; SCARSELLA, M.; ZUPI, G.; ZOLI, W. Efficacy of a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug and cytotoxic drugs in human colon cancer cell lines in vitro and xenografts. *Molecular cancer therapeutics*. 2006; 5(4) 919-926.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*. 2009; 325: 161–165.

LI, L.T.; JIANG, G.; CHEN, Q.; ZHENG, J.N. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*. 2015; 11(3):1566-72.

LIANG, B.B.; LIU, H.G.; CAO, J.T. Antitumor effect of polysaccharides from cactus pear fruit in S180-bearing mice. *Chinese Journal of Cancer* 2008, 27(6), 580-584.

LIERMANN, J.; BEN-JOSEF, E.; SYED, M.; DEBUS, J.; HERFARTH, K.; NAUMANN, P. Carbon ion radiotherapy as definitive treatment in locally recurrent pancreatic cancer. *Strahlenther Onkol* 2022; 198:378-387.

LIMA, C. A.; SILVA, C. M.; KUWANO, A.Y.; RANGEL, M. R. U.; MACEDO-LIMA, A. Trends in prostate cancer incidence and mortality in a mid-sized Northeastern Brazilian city. *REV ASSOC MED BRAS*. 2013; 59: 15-20

LÓPEZ, A. M.; BERNALA, E. T.; MARTÍNEZA, J. C. A.; BRAVOA, F. S.; et al. Incidencia de tumores malignos en pacientes adultos, diagnosticados por primera vez en el hospital Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores al Servicio de los Poderes del Estado de Puebla en el año 2014. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2016; 15(2): 59-65.

MABOU TAGNE, A.; MARINO, F.; COSENTINO, M. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray as a medicinal plant: A comprehensive review of its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacotoxicology and clinical relevance. *J Ethnopharmacol*. 2018; 26(220): 94-116.

MADIA, F.; WORTH, A.; WHELAN, M.; CORVI, R. (2019). Avaliação da carcinogenicidade: Abordando os desafios do câncer e dos produtos químicos no ambiente. *Meio ambiente internacional*, 128, 417-429.

MAHDAVIFAR, N.; GHONCHEH, M.; PAKZAD, R.; MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiology, Incidence and Mortality of Bladder Cancer and their Relationship with the Development Index in the World. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2016; 17(1):381-6.

MARTINS, S. M. (2020). Morte por Câncer e Doença Cardiovascular entre Dois Brasis. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 114, 207-208.

MASULLO, M.; MONTORO, P.; MARI, A. PIZZA, C.; PIACENTE, S. Medicinal plants in the treatment of women's disorders: Analytical strategies to assure quality, safety and efficacy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*. 2015; 113, 189-211.

MATOS, T.; JOHANSSON, H.O.; QUEIROZ, J.A.; BULOW, L. Isolation of PCR DNA fragments using aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology* 2014; 122:144-148.

MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Cancer statistics: a comparison between World Health Organization (WHO) and Global Burden of Disease (GBD). *European Journal of Public Health* 2019.

MAURER, A.J.; BONNEY, P.A.; TOHO, L.C.; GLENN, C.A.; AGARWAL, S.; BATTISTE, J.D.; FUNG, K.M.; SUGHRUE, M.E. Tumor necrosis-initiated complement activation stimulates proliferation of medulloblastoma cells. *Inflamm Res*. 2015; 64(3-4):185-92.

MEHTA, R. G.; MURILLO, G.; NAITHANI, R.; PENG, X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharm Research*. 2010; 27(6):950–61.

MENA, P.; TASSOTTI, M.; ANDREU, L.; NUNCIO-JÁUREGUI, N.; LEGUA, P.; DEL RIO, D. *et al*. Phytochemical characterization of different prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) cultivars and botanical parts: UHPLC-ESI-MS n metabolomics profiles and their chemometric analysis. *Food Research International* 2018; (108): 301-308.

MENON, S.S.; GURUVAYOORAPPAN, C.; SAKTHIVEL, K.M.; RASMI, R.R. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta*. 2019 Apr; 491:39-45. doi: 10.1016/j.cca.2019.01.011. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30653951.

MIKSTACKA, R.; BAER-DUBOWSKA, W.; WIECZOREK, M.; SOBIĄK, S. Thiomethylstilbenes as inhibitors of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 activities. *Molecular Nutritional Food Research*. 2008; 52:77–83.

MILLER, K.D.; SIEGEL, R.L.; LIN, C.C.; MARIOTTO, A.B.; KRAMER, J.L.; JULIA H. ROWLAND, J.H.; STEIN, K.D.; ALTERI, R.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J. Clin*. 2016; 66: 271–289.

MILLER, M.F.; GOODSON 3RD, W.H.; MANJILI, M.H.; KLEINSTREUER, N.; et al. Low-Dose Mixture Hypothesis of Carcinogenesis Workshop: Scientific Underpinnings and Research Recommendations. *Environmental Health Perspectives*. 2017; 125(2):163-169.

MISHRA, S.; AERI, V.; GAUR, P. K.; JACHAK, S. M. Phytochemical, Therapeutic, and Ethno pharmacological Overview for a Traditionally Important Herb: *Boerhavia diffusa* Linn. *BioMed Research International*. 2014; 14: 01-20.

MOHAMED ALI, S.; LING, T.C.; MUNIANDY, S.; TAN, Y.S.; RAMAN, J.; SABARATNAM, V. (2014) Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 122 (0): 359–366.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65(1–2): 55–63.

MOUSINHO, K. C.; OLIVEIRA, C. C.; FERREIRA, J. R. O.; CARVALHO, A. A.; et al. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;137: 421– 426.

MROUJ, K.; ANDRÉS-SÁNCHEZ, N.; DUBRA, G.; SINGH, P.; SOBECKI, M.; CHAHAR, D. et al. Ki-67 regulates global gene expression and promotes sequential stages of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021; 118(10): e2026507118.

MUKHERJEE DAS, A.; GOGIA, A.; JANARDHANAN, R.; BABU-RAJENDRAN, R.; BHUDEV C. Environmental Contamination and Chronic Exposure to Endocrine-Disrupting Phthalates: An Overlooked and Emerging Determinant for Hormone-Sensitive Cancers. *J Indian Inst Sci* 2022.

NAVA-TAPIA D.A.; CAYETANO-SALAZAR, L.; HERRERA-ZÚÑIGA, L.D.; BELLO-MARTÍNEZ, J.; MENDOZA-CATALÁN, M.A.; NAVARRO-TITO, N. Brazilin: Biological activities and therapeutic potential in chronic degenerative diseases and cancer. *Pharmacol Res* 2022; 175:106023.

NAYAK, C.A.; CHETHANA, S.; RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Enhanced mass transfer during solid–liquid extraction of gamma-irradiated red beetroot. *Radiation Physics and Chemistry* 2006; 75(1):173-178.

NEUVILLE, A.; CHIBON, F.; COINDRE JM. Grading of soft tissue sarcomas: from histological to molecular assessment. *Pathology*. 2014 Feb;46(2):113-20. doi: 10.1097/PAT.0000000000000048. PMID: 24378389.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal Natural Products*. 2012.75(3):311–35.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period, 1981–2002. *J. Nat. Prod* 2003; 66(7): 1022–1037.

NOWACKI, L.; VIGNERON, P.; ROTELLINI, L.; CAZZOLA, H.; MERLIER, F.; PROST E.; RALANAIRINA, R.; GADONNA, J.P.; ROSSI, C.; VAYSSADE, M. Betanin-Enriched Red Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Extract Induces Apoptosis and Autophagic Cell Death in MCF-7 Cells. *Phytother Res*. 2015 Dec;29(12):1964-73.

OLIVEIRA, P.A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ-P, L.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2007; 79(4).

OLIVEIRA-JÚNIOR, R. J.; CHESCHINI, J. J.; HUMANES, A. C.; MORELLI, S.; et al. Caracterização citogenética de uma linhagem celular tumoral (Sarcoma 180) de *Mus musculus*, In: 51º Congresso Brasileiro de Genética; São Paulo-Brasil. 2005.

OSORIO-ESQUIVEL, O.; ALICIA ORTIZ, M.; ÁLVAREZ, V.B.; DORANTES-ÁLVAREZ, L.; GIUSTI, M.M. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International* 2011; 44(7):2160-68.

OSORIO-ESQUIVEL, O.; ALICIA ORTIZ, M.; ÁLVAREZ, V.B.; DORANTES-ÁLVAREZ, L.; GIUSTI, M.M. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International* 2011; 44(7):2160-2168.

OTÁLORA, M. C., de Jesús Barbosa, H., Perilla, J. E., Osorio, C., & Nazareno, M. A. (2019). Encapsulated betalains (*Opuntia ficus-indica*) a natural colorants. Case study: Gummy candies. *LWT*, 103, 222-227.

PERVAIZ, R.; FAISAL, F. (2020). Investigating the nexus between gynaecologic cancer and human development index. *African Journal of Reproductive Health*, 24(1), 53-61.

PLEȘAN, D. M.; GEORGESCU, C.V.; PĂTRANĂ, N.I.; PLEȘAN, C.; STOICA, D. Immunohistochemical study of p53 and Ki67 in a group of patients with mammary carcinoma. *Rom Journal Morphol Embryol*. 2010; 51(3): 459-65.

PLUMEL, M. M. Le genre *Himatanthus*(Apocinaceae).Revisión taxonomique: brandea. *Bol. Herb. Bradeanu* 1991; 5:1-20.

PORTA, C.; RIBOLDI, E.; SICA, A. Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. *Cancer Letters*. 2011; 305 :250–262.

QUEIROZ, S. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. (2001). Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, 24, 68-76.

RAHMAN, M.M.; HOSSAIN, A.S.M.S.; MOSTOFA, M.G. *et al.* Evaluation of anti-ROS and anticancer properties of *Tabebuia pallida* L. Leaves. *Clin Phytosci* 2019; (5):17.

RAI, Y.; PATHAK, R.; KUMARI, N.; SAH, D. K.; PANDEY, S.; KALRA, N. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports* 2018; 8(1): 1531.

REILLY, H.C.; FALCO, E.; MYRON, S.A.; PHILIPS, F.S.; STOCK, C.C. Sarcoma 180 screening data. *Cancer Res.* 1963;23(9 Pt 2):1731-877. PMID: 5878138.

REIS, I.A.O.; SANTOS, S.B.; SANTOS, L.A.; OLIVEIRA, N.; FREIRE, M.G.; PEREIRA, J.F.B. *et al.* Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. *Food Chemistry* 2012, 135(4):2453-2461.

REIS, I.A.O.; SANTOS, S.B.; SANTOS, L.A.; OLIVEIRA, N.; FREIRE, M.G.; PEREIRA, J.F.B. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. *Food Chemistry* 2012; 135(4):2453-61.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.A.; WORZELLA, T.J.; MINOR, L. *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2013.

ROSA, P.A.J.; AZEVEDO, A.M.; SOMMERFELD, S.; BACKER, W.; AIRES-BARROS, M.R. Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: economical and environmental sustainability. *Biotechnology Advances* 2011, 29(6):559-567.

RUDOLPH, P.; BONICHON, F.; GLOECKNER, K.; COLLIN, F.; CHASSEVENT, A.; SCHMIDT, D.; COINDRE, J.M.; PARWARESCH, R.; KLÖPPEL, G. Comparative analysis of prognostic indicators for sarcomas of the soft parts and the viscerae. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 1998; 82:246-52.

SÁENZ, C.; BERGER, H.; GARCIA, J.C.; GALLETTI, L.; CORTÁZAR, V.G.; HIGUERA, I. Utilización agroindustrial del nopal. *Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO*, 162. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2006.

SAKARKAR, D. M.; DESHMUKH, V. N. Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. *International Journal of PharmTech Research.* 2011;3(1):298–308.

SALEHI, E.; EMAM-DJOMEH, Z.; ASKARI, G.; FATHI, M. (2019). Opuntia ficus indica fruit gum: Extraction, characterization, antioxidant activity and functional properties. *Carbohydrate polymers*, 206, 565-572.

SALIMI A, BAHIRAEI T, AHDENO S, VATANPOUR S, POURAHMAD J. Evaluation of Cytotoxic Activity of Betanin Against U87MG Human Glioma Cells and Normal Human Lymphocytes and Its Anticancer Potential Through Mitochondrial Pathway. *Nutr Cancer.* 2021;73(3):450-459.

SANTOS, R. P.; SOUZA, L.M.; BALIEIRO, A. L.; SOARES, C.M. F.; LIMA, Á. S.; SOUZA, R. L. Integrated process of extraction and purification of betanin from Opuntia

figus-indica using aqueous two-phase systems based on THF and sodium salts. *Separation Science and Technology* 2017; 53(5), 734–744.

SATO, D.Y.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CATTANEO, RI.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D.D.E F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. *Homeopathy*. 2005; 94(1):26-32.

SELOGATWE, K.M.; ASONG, J.A.; STRUWIG, M.; NDOU, R.V.; AREMU, A.O. A Review of Ethnoveterinary Knowledge, Biological Activities and Secondary Metabolites of Medicinal Woody Plants Used for Managing Animal Health in South Africa. *Vet. Sci.* 2021; 8:228.

SEPULVEDA, E.; GORENA, T.; CHIFFELLE, I.; SAENZ, C.; CATALAN, E. Effect of the Cactus Cladodes Peeling in the Functional, Technological and Chemical Characteristics and Bioactive Compounds in Cactus Cladodes Powders. *Vii International Congress on Cactus Pear and Cochineal* 2013; 995:269-72.

SHI, F.; SONG, Q.; WANG, L.; GAO, Y.; CHANG, H. Diffuse lesion and necrosis tied to poorer prognosis of interdigitating dendritic cell sarcoma: cases report and a pooled analysis. *Sci Rep.* 2017 Apr 6;7(1):667.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; FUCHS, H.E.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022.

SILVA, M. A.; ALBUQUERQUE, T. G.; PEREIRA, P.; RAMALHO, R.; VICENTE, F.; OLIVEIRA, M. B. P.; & COSTA, H. S. (2021). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.: A multi-benefit potential to be exploited. *Molecules*, 26(4), 951.

SILVEIRA, F. M.; WYSOCKI, A. D.; MENDEZ, R. D. R.; PENA, S. B.; SANTOS, E. M. D.; MALAGUTI-TOFFANO, S.; SANTOS, M. A. D. (2021). Impacto do tratamento quimioterápico na qualidade de vida de pacientes oncológicos. *Acta Paulista de Enfermagem*, 34.

SIMÕES, M.C.F.; SOUSA, J.J.S.; PAIS, A.A.C.C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Lett.* 2015; v. 357, p.8-42.

SMERIGLIO, A.; BONASERA, S.; GERMANÒ, M. P.; D'ANGELO, V.; BARRECA, D.; DENARO, M.; TROMBETTA, D. (2019). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. fruit as source of betalains with antioxidant, cytoprotective, and anti-angiogenic properties. *Phytotherapy Research*, 33(5), 1526-1537.

SOUZA, J. A.; HUNT, B.; ASIRWA, F. C.; ADEBAMOWO, C. Global Health Equity: Cancer Care Outcome Disparities in High-, Middle-, and Low-Income Countries. *Journal Clinical Oncology*.2016; 34(1): 6-13.

SPANDIDOS, D. A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. *Journal of Buon*, 2007; 12 Suppl 1, 9–12p.

SPÓRNA-KUCAB, A.; IGNATOVA, S.; GARRARD, I.; WYBRANIEC, S. Versatile solvent systems for the separation of betalains from processed *Beta vulgaris* L. juice using counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B* 2013; 941:54-61.

SREEKANTH, D.; ARUNASREE, M.K.; ROY, K.R.; CHANDRAMOHA, N.; REDDY, T.; REDDY, G.V.; REDDANNA, P. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine*. 2007;14(11):739-46.

SREEKANTH, D.; ARUNASREE, M.K.; ROY, K.R.; CHANDRAMOHAN-REDDY, T.; REDDY, G.V.; REDDANNA, P. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine* 2007; 14(11):739-746.

STINTZING, F.C.; CARLE, R. 2007. Betalains – emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science & Technology* 2007; 18(10):514-525.

SUBBIAH, S.; NAM, A.; GARG, N.; BEHAL, A.; KULKARNI, P.; SALGIA, R. Small Cell Lung Cancer from Traditional to Innovative Therapeutics: Building a Comprehensive Network to Optimize Clinical and Translational Research. *Revista de Medicina Clínica* 2020; 9(8):2433.

SUNDAR, S.K.; SUDARKODI, C. Anticancer activity of l-asparaginase from *aspergillus oryzae* against hep g2 and hela cell lines. *International Journal of Recent Scientific Research* 2018; 9(3): 25328–25330

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L.; et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.

TAHIR, H.E.; XIAOBO, Z.; KOMLA, M.G.; ADAM MARIOD, A. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) as a Source of Bioactive Compounds. In: MARIOD, A. A. (Ed.). *Wild Fruits: Composition, Nutritional Value and Products*. Cham: *Springer International Publishing*, 2019. p. 333–358.

TILAHUN, Y.; WELEGERIMA, G. (2018). Pharmacological potential of cactus pear (*Opuntia ficus Indica*): A review. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 7(3), 1360-1363.

TORRE, L.A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Estatísticas globais de câncer, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2016; 5(2):87-108.

TROJANI, M.; CONTESSO, G.; COINDRE, J.M.; ROUESSE, J.; BUI, N.B.; DE MASCAREL, A.; GOUSSOT, J.F.; DAVID, M.; BONICHON, F.; LAGARDE, C. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int J Cancer*. 1984 Jan 15;33(1):37-42.

- VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; et al. Tropical biodiversity: Has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? *Quimica Nova*. 2012;35: 2278–2287.
- VAN DEN BOOGAARD, W.M.C.; KOMNINOS, D.S.J.; VERMEIJ, W.P. Chemotherapy Side-Effects: Not All DNA Damage Is Equal. *Cancers* 2022; 14:627.
- VAN TONDER, A.; JOUBERT, A.M.; CROMARTY, A.D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes* 2015; 8:47.
- VAN, S. W. C.; SOLIS, D. Y.; HEBRANT, A.; DETOURS, V.; et al. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochimica et biophysica acta*. 2009; 1795(2): 92-103.
- VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer*. 2012; 12(4): 237-251.
- VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature reviews Cancer*. 2007; 7(9): 659-672.
- VARMA, A.; SPIER, B.J.; PFAU, P.R.; SAFDAR, N.; A case of newly diagnosed metastatic pancreatic cancer presenting with associated immune thrombocytopenic purpura. *Wiscousin Medical Journal*. 2009; 108(9):459-61
- VENTURINI, G.C.; GROSSI, D.A.; RAMOS, S.B.; CRUZ, V.A.R.; et al. Estimation of genetic parameters for partial egg production periods by means of random regression models. *Genetics and Molecular Research*. 2012; 11 (3): 1819-1829.
- WALI, A. F.; MAJID, S.; RASOOL, S.; SHEHADA, S. B.; ABDULKAREEM, S. K.; FIRDOUS, A.; REHMAN, M. U. (2019). Natural products against cancer: Review on phytochemicals from marine sources in preventing cancer. *Saudi pharmaceutical journal*, 27(6), 767-777.
- WANG, R.A.; LI, Q.L.; LI, Z.S.; ZHENG, P.J.; ZHANG, H.Z.; HUANG, X.F.; CHI, S.M.; YANG.; A.G.; CUI, R. Apoptosis drives cancer cells proliferate and metastasize. *J Cell Mol Med*. 2013;17(1):205-11.
- WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WILLIAMS, G. T. & FARZANEH, F. (2012). Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer?. *Nature reviews cancer*, 12(2), 84-88.
- WU, Z.J.; XIE, Y.F.; CHANG, X.; ZHANG, L.; WU, H.Y.; LIU, J.B.; ZHANG, J.X.; SUN P. Type of Necrosis Influences Prognosis in Hepatocellular Carcinoma After the First Transarterial Chemoembolization. *Med Sci Monit*. 2021 May 10;27:e929884.
- YANG, Y.H.; MAO, J.W.; TAN, X.L. Research progress on the source, production, and anti-cancer mechanisms of paclitaxel. *Chin J Nat Med* 2020; 18(12):890-897.

ZAHAN, R.; NAHAR, L.; MOSADDIK, A.; RASHID, M. A; et al. Evaluation of Antioxidant and Antitumor Activities of *Wrightia arborea*. *Journal of Basic & Applied Sciences*. 2013; 9: 625-632.

ZHANG, Y.; SEERAM, N. P.; LEE, R.; HEBER, D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 670-675.

ZHENG, N.; WANG, Q.; LI, C.; WANG, X.; LIU, X.; WANG, X.; et al. Responsive Degradable Theranostic Agents Enable Controlled Selenium Delivery to Enhance Photothermal Radiotherapy and Reduce Side Effects. *Adv. Healthcare Mater* 2021; 10:2002024.

ZOU, X.; YU, K.; CHU, X.; YANG, L. Betanin alleviates inflammation and ameliorates apoptosis on human oral squamous cancer cells SCC131 and SCC4 through the NF- κ B/PI3K/Akt signaling pathway. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022 May 29:e23094.

ZOU, D.M.; BREWER, M.; GARCIA, F.; FEUGANG, J.M.; WANG, J.; ZANG, R.Y.; LIU, H.G.; ZOU, C.P. 2005. Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal* 2005; 4.

Apêndice 1

Avaliação histopatológica dos órgãos excisionados.

As amostras de órgãos e dos tumores removidos serão armazenadas em solução de formaldeído 10% tamponado. Decorridas 24h da fixação dos espécimes, estes serão submetidos ao processamento histológico de rotina laboratorial para obtenção das secções histológicas a serem avaliadas em microscopia óptica. Para análise histopatológica dos órgãos serão considerados os seguintes critérios:

Alterações Renais:

a) Alterações degenerativas glomerulares

1. Formação de “crescentes” (proliferação das células do folheto parietal da cápsula de Bowman, estimuladas por deposição de fibrina, que podem obliterar o espaço de Bowman).
2. Glomerulonefrite membranosa (geralmente associada a distúrbios glomerulares que causam síndrome nefrótica (com proteinúria intensa) e se apresenta como espessamento da parede dos capilares glomerulares).
3. Glomerulonefrite proliferativa (ocorre acentuada lobulação glomerular (tufos glomerulares se destacam uns dos outros à maneira de folhas de trevo), hiper celularidade (devido a proliferação de células mesangiais) e e espessamento da parede dos capilares glomerulares).
4. Depósitos amiloides glomerulares

Alterações degenerativas tubulares

1. Hipertrofia tubular
2. Atrofia tubular
3. Acúmulo de material proteináceo
- 4.

Alterações vasculares renais – Espessamento da parede e redução da luz de pequenas artérias, que ocorre devido a processos isquêmicos ou por redução expressiva da circulação sanguínea em glomérulos hialinizados.

1. Alterações inflamatórias e/ou necrose glomerular/tubular.

Alterações Hepáticas:

a) Alterações degenerativas

1. Degeneração vacuolar hidrópica
2. Degeneração vacuolar por acúmulo de glicogênio (glicogenose)
1. Degeneração vacuolar gordurosa (esteatose)
2. Colestase (acúmulo hepático de bilirrubina)
3. Acúmulo intracitoplasmático
4. Acúmulo intraductal

b) Alterações inflamatórias

1. Hepatite interlobular
2. Hepatite intralobular

c) Outras alterações hepáticas

1. Fibrose hepática (cirrose)
2. Proliferação ductal (geralmente pós-cirrótica ou inflamatória)
3. Degeneração hialina do hepatócito (degeneração citoplasmática hialina em “vidro-fosco”)
4. Megalocitose hepática (balonização citoplasmática)
5. Necrose hepática

Alterações Esplênicas:

1. Fibrose esplênica
2. Abscesso esplênico
3. Aumento do número de megacariócitos
4. Atrofia da polpa branca

Para possibilitar uma análise comparativa semiquantitativa da intensidade das alterações histopatológicas nos diferentes órgãos e grupos experimentais, estas, quando presentes, serão categorizadas em leve (distúrbio atinge menos de 10% do parênquima do órgão), moderada (distúrbio atinge entre 10 e 50% do parênquima do órgão) e intensa (distúrbio atinge mais de 50% do parênquima do órgão).