

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

DAIANE CARLA DOS SANTOS

**EFEITOS *IN VITRO* DA ASSOCIAÇÃO ENTRE MIRISTICINA
E QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGEM TUMORAL DE
OVÁRIO RESISTENTE A MÚLTIPLOS FÁRMACOS**

Bragança Paulista
2022

DAIANE CARLA DOS SANTOS – R.A. 001202015070

**EFEITOS *IN VITRO* DA ASSOCIAÇÃO ENTRE MIRISTICINA
E QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGEM TUMORAL DE
OVÁRIO RESISTENTE A MÚLTIPLOS FÁRMACOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Giovanna B. Longato

Bragança Paulista
2022

WP 322
S234e

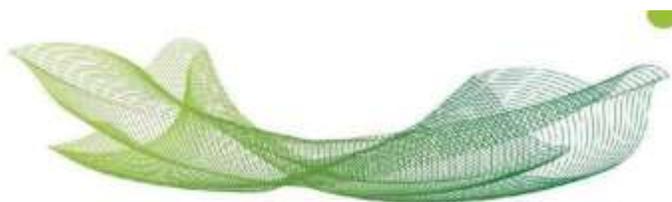
Santos, Daiane Carla dos

Efeitos *in vitro* da associação entre miristicina e quimioterápicos em linhagem tumoral de ovário resistente a múltiplos fármacos / Daiane Carla dos Santos. – Bragança Paulista, 2022.

38 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Giovanna Barbarini Longato.

1. Miristicina. 2. Câncer de ovário. 3. Resistência a múltiplos fármacos (MDR). 4. Quimioterápicos. I. Longato, Giovanna Barbarini. II. Título.



Educando
para a paz

SANTOS, Daiane Carla dos. “Efeitos in vitro da associação entre miristicina e quimioterápicos em linhagem tumoral de ovário resistente a múltiplos fármacos”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 29 de julho de 2022 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani - Presidente
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Humberto Moreira Spindola
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Thais Petrochelli Banzato (por
videoconferência)
Universidade Nove de Julho

Dedicatória

À Minha mãe, Clarisse, pelo amor incondicional, Pela presença em todos os momentos, Por todo incentivo e apoio, Dedico-lhe este trabalho.

*Ao meu filho Heitor, pelo amor, pelo encorajamento, pela paciência e compreensão.
Dedico-lhe este trabalho*

*Ao meu namorado Adilson, pelo amor, pelo encorajamento, Por me fazer acreditar que posso ir além do que penso ser capaz.
Dedico-lhe este trabalho.*

*Ao meus amigos, por acreditarem na minha capacidade, estarem ao meu lado e por toda torcida.
Dedico-lhes este trabalho.*

Epígrafe

“Só sei que nada sei”

Sócrates

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus;

Ao Programa de Pós-Graduação em *Stricto Sensu* em ciências da Saúde da Universidade São Francisco - USF;

À Profa. Dra. Giovanna Barbarini Longato por toda a orientação;

Às minhas amigas Carolina e Elisa pelo conhecimento compartilhado, pela colaboração nos experimentos, por todo suporte e rede de apoio;

Aos professores membros das qualificações e da banca de Mestrado pela disponibilidade e pelas sugestões que enriqueceram esta dissertação;

À Andrea, secretária do programa de Pós-Graduação em *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco - USF, pela competência, profissionalismo e também pela atenção dispensada a mim e a todos os alunos deste programa;

A todos os amigos que de alguma forma colaboraram no pleno desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Câncer é um conjunto de mais de 100 tipos de doenças diferentes e é considerada uma das principais causas de morte no mundo. O tratamento do câncer consiste na quimioterapia, cirurgia, radioterapia e imunoterapia. Uma gama de fármacos utilizada na terapêutica do tratamento do câncer é proveniente de fontes naturais; no entanto, os tratamentos tradicionais vem enfrentando um grande desafio relacionado à resistência a múltiplos fármacos (*multidrug resistance* - MDR), mecanismo que resulta na diminuição intracelular dos agentes quimioterapêuticos, refletindo em redução da eficácia do tratamento. Essa resistência se dá pelo aumento da expressão de algumas proteínas transportadoras, como por exemplo, a glicoproteína-P (P-gp), fazendo com que o fármaco seja transportado para o meio extracelular e permanecendo de forma rápida no interior na célula tumoral. Abordagens promissoras no mecanismo de reversão da MDR têm sido encontradas para bloqueadores de canais de cálcio, os quais são capazes de se ligar na P-gp e bloquear sua atividade. Um destes fármacos é o apiol que foi recentemente estudado pelo nosso grupo de pesquisa. O apiol, em associação a quimioterápicos, demonstrou potencializar o efeito dos mesmos e os dados *in silico* revelaram potencial ação bloqueadora da P-gp. Composto estruturalmente muito similar ao apiol é a miristicina, diferindo deste apenas na perda de um grupo metóxi. A miristicina é um composto natural, isolada da noz-moscada e apresenta atividade antiproliferativa relatada em literatura; entretanto, não se tem relatos sobre a atividade de associação desta molécula com quimioterápicos, nem de reversão da MDR. Considerando o exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da associação entre a miristicina e quimioterápicos sobre a linhagem tumoral de ovário NCI/ADR-RES que apresenta fenótipo de resistência a múltiplos fármacos por superexpressar a P-gp. Através dos resultados obtidos pelo ensaio viabilidade celular por MTT, foi observado que a miristicina não apresentou atividade citotóxica para esta linhagem, visto que seu IC₅₀ foi >1 mM. Os quimioterápicos cisplatina e docetaxel, quando tratados isoladamente, apresentaram IC₅₀ de 215,60 e 15,04 µM, respectivamente. Quando a miristicina foi associada aos quimioterápicos, esta potencializou os efeitos citotóxicos dos mesmos, resultado evidenciado pela diminuição dos valores de IC₅₀ obtidos. Na concentração de 1 mM, ela reduziu os valores de IC₅₀ obtidos para cisplatina e docetaxel em 32,88% e 75,46%, respectivamente, culminando em efeito sinérgico. Acredita-se que esta potencialização dos efeitos quimioterapêuticos se deva, a princípio, ao bloqueio da bomba de efluxo relacionada a MDR. Estudos para elucidação deste mecanismo específico estão sendo realizados por nosso grupo de pesquisa. Nossa hipótese é que ao bloquear a extrusão dos quimioterápicos, estes adentram as células livremente e realizam suas funções, parando o ciclo celular. Considerando o grande impasse no tratamento quimioterapêutico do câncer que é a MDR adquirida pelas células tumorais, investigar alvos eficazes para contornar esta resistência continua a ser um desafio importante que precisa ser resolvido. Sendo assim, este estudo incentiva a continuação da investigação da miristicina como potencial reversora da MDR.

Palavras-chave: produto natural. câncer de ovário. resistência a múltiplos fármacos (MDR). quimioterápicos.

ABSTRACT

Cancer is a set of more than 100 different types of diseases and is considered one of the leading causes of death in the world. Cancer treatment consists of chemotherapy, surgery, radiation therapy and immunotherapy. A range of drugs used in cancer treatment comes from natural sources; however, traditional treatments are facing a major challenge related to multidrug resistance (MDR), a mechanism that results in the intracellular decrease of chemotherapeutic agents, reflecting in a reduction in the effectiveness of the treatment. This resistance is due to the increased expression of some transport proteins, such as P-glycoprotein (P-gp), causing the drug to be transported to the extracellular medium and quickly remaining inside the tumor cell. Promising approaches in the MDR reversal mechanism have been found for calcium channel blockers, which are able to bind to P-gp and block its activity. One of these drugs is apiol and was recently studied by our research group. Apiol, in association with chemotherapeutics, demonstrated to potentiate their effect and the *in silico* data revealed a potential blocking action of P-gp. A compound structurally very similar to apiol is myristicin, differing from it only in the loss of a methoxy group. Myristicin is a natural compound, isolated from nutmeg and has antiproliferative activity reported in the literature; however, there are no reports on the association activity of this molecule with chemotherapeutics, nor on the reversion of MDR. Considering the above, the present study aimed to evaluate the effect of the association between myristicin and chemotherapeutic agents on the NCI/ADR-RES ovarian tumor cell line that has a multidrug resistance phenotype by overexpressing P-gp. Through the results obtained by the cell viability assay by MTT, it was observed that myristicin did not present cytotoxic activity for this strain, since its IC₅₀ was >1 mM. The chemotherapy drugs cisplatin and docetaxel, when treated alone, presented IC₅₀ of 215.60 and 15.04 μ M, respectively. When myristicin was associated with chemotherapy, it potentiated their cytotoxic effects, a result evidenced by the decrease in IC₅₀ values obtained. At a concentration of 1 mM, it reduced the IC₅₀ values obtained for cisplatin and docetaxel by 32.88% and 75.46%, respectively, culminating in a synergistic effect. It is believed that this potentiation of chemotherapeutic effects is primarily due to the blockage of the MDR-related efflux pump. Studies to elucidate this specific mechanism are being carried out by our research group. Our hypothesis is that by blocking the extrusion of chemotherapeutic agents, they freely enter cells and perform their functions, stopping the cell cycle. Considering the great impasse in the chemotherapeutic treatment of cancer that is MDR acquired by tumor cells, investigating effective targets to circumvent this resistance remains an important challenge that needs to be solved. Therefore, this study encourages the continuation of the investigation of myristicin as a potential reversal of MDR.

Keywords: *biological products. ovary cancer. multidrug resistance. chemotherapeutics.*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- AA8 – Linhagem de ovário de hamster chinês
- ATCC – Coleção americana de culturas celulares (*American Type Culture Collection*)
- BCL – Linfoma de células B de camundongo
- Caco-2 – Linhagem tumoral de adenocarcinoma de cólon humano
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- EM9 – Linhagem de ovário de hamster chinês
- HCCLM3 – Linhagem de tumor hepático humano
- Huh-7 – Linhagem de tumor hepático humano
- IC50 – Concentração que inibe 50% da viabilidade celular
- INCA – Instituto Nacional de Câncer
- KB – Linhagem de carcinoma epidérmio oral humano
- K-562 – Linhagem tumoral de leucemia mielóide crônica humano
- MCF-7 – Linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama humano
- MDR – Resistência a Múltiplas Drogas (*multidrug resistance*)
- MTT - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
- NCI/ADR-RES – Linhagem tumoral de ovário humano resistente a múltiplos fármacos
- NCI-H460 – Linhagem tumoral de pulmão humano
- P-gp – Glicoproteína P
- PS – antibiótico Penicilina/streptomicina
- RPMI – meio de cultura
- RT-PCR - reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (*real time- polimerase chain reaction*)
- SFB – soro fetal bovino
- SK-N-SH – Linhagem de neuroblastoma humano
- VRP – Verapamil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativas do Câncer no Brasil	14
Figura 2 – Fórmula estrutural dos compostos apiol (a) e miristicina (b).....	18
Figura 3 - Representação gráfica dos mecanismos das vias anti-inflamatória, antiproliferativa e antioxidante induzidas pela miristicina.....	20
Figura 4 – Arividade citotóxica do composto miristicina.....	26
Figura 5 – Atividade citotóxica do composto miristicina em associação ao quimioterápico cisplatina.....	27
Figura 6 – Atividade citotóxica do composto miristicina em associação ao quimioterápico docetaxel.....	27
Figura 7 – Isonograma representando a interação sinérgica entre miristicina e os quimioterápicos.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de IC₅₀ (μM) obtidos pelo ensaio de MTT para miristicina e quimioterápico cisplatina e para a associação entre eles após 48 horas de tratamento da linhagem NCI/ADR-RES.....25

Tabela 2 - Valores de IC₅₀ (μM) obtidos pelo ensaio de MTT para miristicina e quimioterápico docetaxel e para a associação entre eles após 48 horas de tratamento da linhagem NCI/ADR-RES.....25

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	Câncer	13
1.2	Câncer de Ovário.....	14
1.3	Quimioterapia baseada em produtos naturais.....	15
1.4	Resistência a Múltiplas Drogas (MDR)	16
1.5	Reversores da MDR	17
1.6	Miristicina	18
2.	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Obtenção do composto	22
3.2	Cultivo celular	22
3.3	Ensaio de citotoxicidade da miristicina e dos quimioterápicos cisplatina e docetaxel.....	22
3.4	Ensaio da associação entre miristicina e quimioterápicos cisplatina e docetaxel.....	23
3.5	Análise estatística.....	24
4.	RESULTADOS	25
5.	DISCUSSÃO.....	29
6.	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS.....	33
	ANEXO.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O termo câncer se refere a doenças que surgem através do acúmulo de mutações em células somáticas nos genes que regulam e restringem a multiplicação, sobrevivência, reparação, movimento e invasão das células (SODIR; GERARDI, 2011). Uma das características do câncer é o crescimento desordenado de células com capacidade de invadir tecidos e órgãos; alguns tipos de células tumorais também podem se espalhar para outras partes do corpo em um processo chamado metástase (FERLAY et al., 2018).

O câncer continua entre as doenças mais graves, embora suas opções de tratamento estejam bem estabelecidas. Existem muitos tipos de tratamento para o câncer, dependendo do tipo e em que estágio está. A quimioterapia é frequentemente usada para tratar o câncer e esquemas bem elaborados para administração de medicamentos tem sido eficazes no tratamento do câncer e proporcionado menos efeitos adversos (KIM et al., 2016). Em alguns casos, o plano de tratamento pode usar uma combinação de métodos para ter o máximo de eficácia terapêutica (WANG; LEI; HAN, 2018).

A última estimativa publicada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), prevista para o triênio 2020-2022, apontou que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer a cada ano (FIGURA 1). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2019).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Côlon e reto	20.520	9,1%			Côlon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para cada ano do triênio 2020-2022 por sexo, exceto pele não melanoma. Câncer. Fonte: INCA, 2019.

1.2 Câncer de Ovário

De acordo com o INCA, o câncer de ovário é a segunda neoplasia ginecológica mais comum no Brasil, atrás apenas do câncer do colo do útero. A quase totalidade das neoplasias ovarianas (80%), sendo 95% derivada das células epiteliais (que revestem o ovário). O restante provém de células germinativas (que podem dar origem a outros órgãos e tecidos) e células estromais (que produzema maior parte dos hormônios femininos) (INCA, 2021).

Um dos maiores problemas para elucidar a patogênese do câncer de ovário é que ele é uma doença heterogênea composta por diferentes tipos de tumores com características e comportamentos clínico-patológicos amplamente diferentes (KURMAN; SHIH, 2010).

O tratamento padrão para câncer epitelial de ovário avançado consiste em cirurgia e quimioterapia. Embora o câncer de ovário seja sensível aos regimes de quimioterapia como cisplatina e docetaxel, dentre outros, os efeitos são de curta duração e a resistência aos medicamentos pode ser facilmente desenvolvida, o que é um grande desafio clínico para reduzir a mortalidade por câncer de ovário. Devido à composição genética, um grande número de tumores tende a desenvolver resistência à quimioterapia durante a terapia preliminar ou mesmo no início. Portanto, é significativo encontrar métodos eficazes para reverter a resistência (ZHAO et al., 2019).

1.3 Quimioterapia baseada em produtos naturais

Historicamente, os produtos naturais têm desempenhado um papel fundamental na descoberta de medicamentos, especialmente para câncer e doenças infecciosas (WU et al., 2021). Os dados mostram que ainda são poucos os programas de descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais nas empresas farmacêuticas, embora sejam uma fonte promissora de novos medicamentos. Mesmo assim, os medicamentos produzidos a partir de substâncias naturais são numerosos, pois representam cerca de 70% de todos os medicamentos aprovados para uso terapêutico nas últimas quatro décadas. Os compostos naturais têm sido uma das principais fontes de produção de medicamentos desde o início dos tempos, dando origem a medicamentos de diferentes classes terapêuticas. Portanto, como a principal fonte de novos medicamentos são os produtos naturais, é necessário realizar pesquisas para descobrir novos tratamentos a partir de fontes pouco exploradas (SENEME et al., 2021).

O isolamento de metabólitos secundários de ocorrência natural como inibidores da carcinogênese de plantas comestíveis oferece um alto potencial para a obtenção de agentes quimiopreventivos que podem ser úteis na redução da incidência de câncer em humanos. Os óleos essenciais são um grupo particularmente interessante de produtos. Eles ocorrem amplamente em alimentos consumidos por humanos (ZHENG et al., 1992).

A maioria dos quimioterápicos antineoplásicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto benignas. Os antineoplásicos agem diretamente na célula, atuando nas diversas fases do ciclo celular. Devido a essa característica é que se opta por usar, mais freqüentemente, a poliquimioterapia, na qual mais de dois tipos de medicamentos de classificações farmacológicas diferentes são aplicados, buscando-se um efeito mais abrangente sobre as células tumorais. É importante, sempre que possível, a associação de medicamentos com diferentes toxicidades, que permitam aumentar o efeito antitumoral sem elevar o grau de toxicidade (INCA, 2020).

A busca por medicamentos anticancerígenos tem aumentado com vistas a se encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço da doença. Baseadas em avanços significativos na biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo da enfermidade, como

inibição da polimerização da tubulina, atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares. Os quimioterápicos provenientes de fontes naturais mais utilizados em tratamentos de câncer são derivados de fontes vegetais, como exemplo os alcaloides vinca extraídos da *Catharanthus roseus*, a camptotecina isolada da *Camptotheca acuminata*, podofilotoxina isolada da *Podophyllum peltatum* e taxol® extraído de espécies do gênero *Taxus* (BRANDAO et al., 2010).

1.4 Resistência a Múltiplas Drogas (MDR)

Um dos maiores obstáculos para o sucesso da quimioterapia no tratamento de alguns tipos de neoplasias é o desenvolvimento, por parte das células tumorais, do fenômeno de resistência aos fármacos utilizados, não havendo resposta ao tratamento. A resistência a múltiplas drogas (MDR) é um caso de resistência adquirida, observada em células tumorais, *in vivo* e *in vitro*, que consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos, tanto àquele que foi utilizado inicialmente, quanto a outros empregados como alternativa (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

Embora a maioria dos tumores ovarianos responda inicialmente à quimioterapia, os tumores geralmente surgem como resultado da expansão de clones com resistência inata ou adquirida, que depois se desenvolvem em tumores recorrentes (HE et al., 2018). Certas células tumorais adquirem um fenótipo resistente à quimioterapia, resultando em dificuldades no tratamento (KIM et al., 2016). Dados estatísticos mostram que mais de 90% da mortalidade de pacientes com câncer é atribuída à resistência aos medicamentos (BUKOSWI; KCIUK; KONTEK, 2020).

A resistência a múltiplas drogas tornou-se o maior obstáculo para o sucesso das quimioterapias do câncer (WU et al., 2014). Os mecanismos de MDR podem ser divididos em sete categorias: (1) aumento do efluxo de drogas por transportadores de membrana, com transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) como os principais transportadores; (2) redução da absorção de drogas por transportadores de influxo, como transportadores de soluto; (3) aumento do metabolismo da droga, incluindo a eliminação pelas enzimas glutatona S-transferase e citocromo P450; (4) bloqueio das vias de sinalização apoptótica devido à alteração no nível de expressão de proteínas da família do linfoma de células B (BCL) ou mutações na via p53; (5) elevação da adaptabilidade por regulação epigenética e regulação de miRNA; (6) mutação em alvos de drogas ou ativação por feedback de outros alvos e vias de sinalização; e (7)

quimiorresistência induzida por mudanças no microambiente, como resposta de hipóxia e regulação de células-tronco cancerígena (LI et al., 2017).

Em se tratando da primeira categoria, a mais bem estudada, tem-se que os transportadores ABC são reconhecidos como os principais culpados no desenvolvimento do MDR. Terapias continuam a ser desenvolvidas com o objetivo de bloquear ou inativar os transportadores ABC para aumentar a concentração de drogas anticancerígenas dentro das células (LI et al., 2017). Estas proteínas pertencem a uma grande superfamília, até agora, 48 transportadores ABC foram identificados em humanos e 12 deles foram reconhecidos como transportadores de drogas. Seu mecanismo de efluxo envolve a ligação da proteína ao ATP e requer energia derivada da hidrólise do ATP ao ADP na presença da enzima adenosina-trifosfatase (APTase) (SRIVALLI; LAKSHMI, 2012). Dentre elas, destacam-se a glicoproteína P (P-gp/ ABCB1 ou MDR1), a proteína 1 de resistência a múltiplas drogas (MRP1 / ABCC1) e a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP / ABCG2) (MA et al., 2017). O transportador ABCG2 é expresso principalmente em câncer de mama, câncer de cólon, câncer gástrico, câncer de pulmão de pequenas células e câncer de ovário (LI et al., 2016).

A resistência a quimioterápicos promovida pela P-gp é a forma de resistência mais estudada *in vitro*, *in vivo* e na clínica e, conseqüentemente, um grande número de fármacos e compostos recentemente sintetizados são investigados pelas suas habilidades em afetar o fenômeno (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010). A resistência aos medicamentos limita significativamente a eficácia em longo prazo para pacientes com câncer. Portanto, compreender os mecanismos que contribuem para a resistência à quimioterapia e investigar alvos eficazes para melhorar a resistência continuam a ser desafios importantes que precisam ser resolvidos (FENG et al., 2019; YEE; RISINGER, 2021).

1.5 Reversores da MDR

O verapamil (VRP) é um bloqueador da P-gp de primeira geração e foi descoberto que aumenta o acúmulo intracelular de muitos medicamentos anticâncer, incluindo doxorrubicina em várias linhagens de células cancerígenas. Outros estudos descobriram que a atividade inibidora da P-gp é compartilhada por muitos outros bloqueadores dos canais de cálcio, como diltiazem, bepridil, nicardipina, nifedipina, felodipina e isradipina (HOSSAM et al., 2015). Entretanto,

como limitação evidencia-se a toxicidade, devido às elevadas concentrações séricas atingidas com a dose que é necessária para inibir a P-gp (BOSTIAN; LOMOVSKAYA, 2006; LOMOVSKAYA, et al., 2007).

Recentemente uma molécula descrita em literatura como potencial bloqueadora de canal de cálcio foi avaliada pelo nosso grupo frente à sua capacidade de reverter a MDR e de potencializar a ação de quimioterápicos já amplamente utilizados na clínica. Esta substância de origem natural, denominada apiol, é um fenilpropanóide encontrado principalmente na salsa (*Apiaceae*) e em espécies das famílias *Lauraceae* e *Piperaceae*. Os resultados obtidos pelo nosso grupo mostraram que o apiol por si só não apresenta efeito citostático significativo em linhagens de células tumorais resistentes. Entretanto, a sua associação aos quimioterápicos vincristina e doxorrubicina apresentou um efeito sinérgico, ou seja, a ação citostática dos medicamentos foi potencializada pelo apiol. O ensaio *in silico* realizado demonstrou que este mecanismo estaria relacionado à afinidade da molécula ao sítio ativo da P-gp, antagonizando a sua ação de promover efluxo da droga para o meioextracelular (LIMA et al., 2020).

1.6 Miristicina

Composto estruturalmente muito similar ao apiol é a miristicina, diferindo deste apenas na perda de um grupo metóxi (FIGURA 2). A miristicina (1-alil-3,4-metilenodioxibenzeno) é uma substância ativa da família dos alquilbenzenos, encontrada principalmente na noz moscada (*Myristica fragans*) (BRIXIUS, 2018), mas também presente na salsa (*Petroselinum crispum*), na pimenta do reino (*Piper nigrum*), na cenoura (família *Umbelliferae*) e em plantas da família *Apiaceae*.

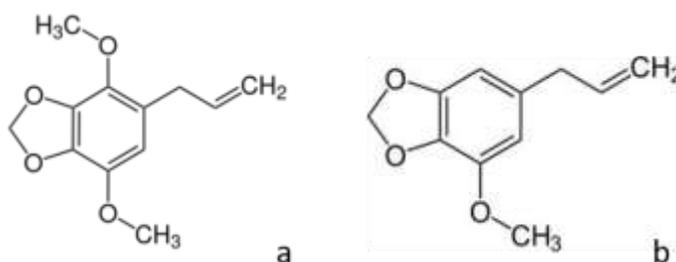


Figura 2. Fórmula estrutural dos compostos apiol (a) e miristicina (b). Fonte: Sigma-aldrich.

Na medicina tradicional, a miristicina tem sido usada para tratar cólera, cólicas estomacais, náuseas, diarreia e ansiedade (BAO; QI, 2021). Acredita-se que a miristicina seja a principal responsável pelos benefícios descritos com o uso da noz-moscada, bem como por seus efeitos tóxicos, uma vez que é o maior composto presente nesta especiaria (JAISWAL et al., 2009).

Nosso grupo de pesquisa fez recentemente um levantamento bibliográfico acerca do potencial terapêutico da miristicina. Trata-se de uma molécula promissora, com diversas propriedades biológicas, como antimicrobiana, inseticida, larvicida e psicoativa; além de terapêuticas, dentre as quais se destacam (FIGURA 3): antioxidante, por provocar aumento da concentração das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase e pela diminuição dos níveis de peroxidação lipídica; anti-inflamatória pela inibição de citocinas e mediadores responsáveis pela quimiotaxia do processo inflamatório; e antiproliferativa, visto que induz apoptose por causar alterações no potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo-C, ativação de caspase-3, clivagem de PARP, fragmentação de DNA e redução da expressão do gene bcl-2 responsável pela manutenção do equilíbrio entre proliferação e morte celular programada (SENEME et al., 2021).

A atividade antiproliferativa da miristicina é relatada em diversas linhagens tumorais, a saber: células KB (carcinoma epidérmico oral humano), K-562 (leucemia mielóide crônica humana) NCI-H460 (tumor pulmonar humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) (STEFANO; PITONZO; SCHILLACI, 2011), SK- N-SH (neuroblastoma humano) (LEE et al., 2005), Caco-2 (adenocarcinoma de cólon humano) (PIRAS et al., 2012) e AA8 e EM9 (ovário de hamster chinês) (RENGASAMY et al., 2018). Os resultados obtidos mostraram que, de forma geral, a viabilidade das células de todas as linhagens foi afetada pela miristicina, variando de 20 a 100% de acordo com a concentração e método utilizados pelos autores (ZHENG et al., 1992; KONYUSHKIN et al., 2010).

Este composto também inibiu a proliferação celular e induziu apoptose em células tumorais hepáticas Huh-7 e HCCLM3; suprimiu a migração celular e a capacidade de invasão e aumentou a expressão de E-caderina e diminuiu a expressão de N-caderina, inibindo assim a transição epitelial-mesenquimal (EMT). Os resultados indicaram que a miristicina diminuiu a expressão das proteínas fosforiladas (p)-mTOR e p-AKT. A miristicina exerce um efeito terapêutico eficiente no carcinoma hepático ao suprimir a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, sendo

promissora como um novo potencial fármaco para o tratamento do carcinoma hepático (BAO; QI, 2021).

Considerando a semelhança estrutural com o apiol e os efeitos terapêuticos descritos em literatura para a molécula miristicina, esta se tornou um alvo interessante de estudo. Apesar de sua atividade antiproliferativa ser bem descrita em literatura, não há dados acerca da sua atividade citotóxica em linhagens tumorais resistentes, nem sobre sua potencial ação sinérgica com quimioterápicos, o que torna o presente estudo inédito.

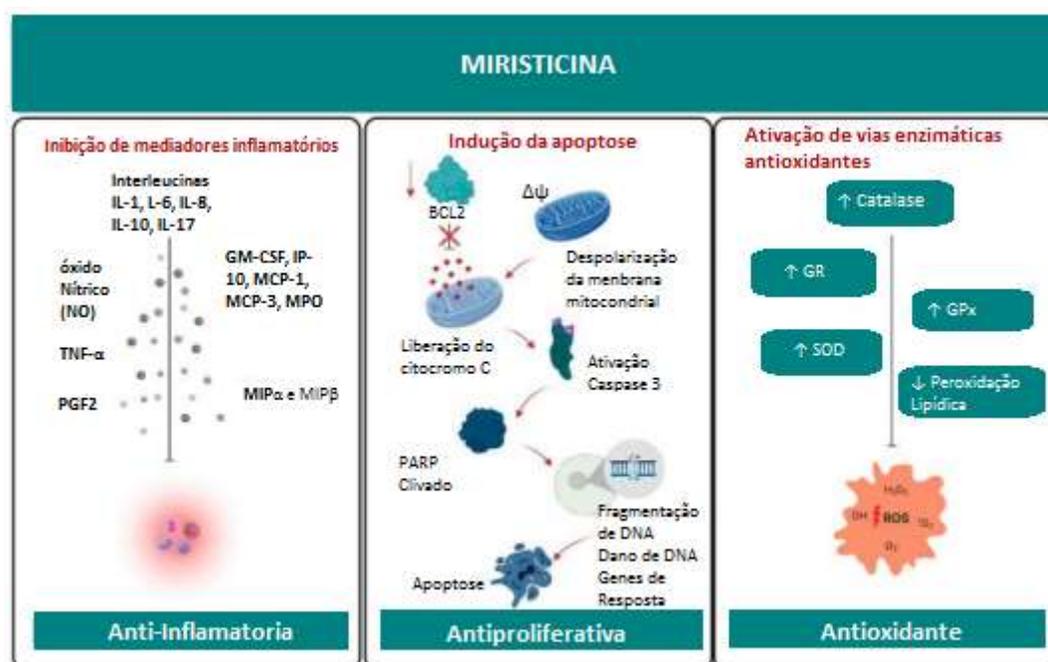


Figura 3. Representação gráfica dos mecanismos das vias anti-inflamatória, antiproliferativa e antioxidante induzidas pela miristicina. Fonte: figura adaptada , SENEME , et al., 2021.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos *in vitro* da associação entre miristicina e quimioterápicos na viabilidade de células tumorais de linhagem de ovário resistente a múltiplos fármacos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o valor de IC50 (concentração mínima necessária para inibir 50% da viabilidade celular) da miristicina e dos quimioterápicos docetaxel e cisplatina para a linhagem NCI/ADR- RES;
- Avaliar se a associação de miristicina com quimioterápicos cisplatina e docetaxel será capaz de potencializar a atividade citotóxica dos fármacos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do composto

O composto miristicina foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich - código 09237).

3.2 Cultivo celular

A atividade citotóxica *in vitro* da miristicina foi avaliada utilizando-se linhagem tumoral de ovário humano que apresenta fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES) por superexpressar, em sua membrana celular, a P-gp. Esta linhagem foi adquirida pelo banco de células ATCC (*American Type Culture Collection*).

Para o crescimento, esta linhagem foi cultivada em frasco de 75 cm² (T75) e o volume final de suspensão celular a ser congelado em criotubos mantidos no nitrogênio foi de 1x10⁶ cels/mL. O descongelamento da NCI/ADR-RES foi realizado sempre que houve a necessidade de renovação ou obtenção de células em passagem adequada (4^o- 9^o passagem) para a realização dos experimentos. Para tanto, os criotubos contendo as células foram descongelados à temperatura ambiente, seu conteúdo transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL e o volume deste completado para 10 mL com meio de cultura completo, que consiste em RPMI-1640 (Gibco) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB, Nutricell) e 1% penicilina- estreptomicina (PS, Nutricell), para inibir a ação do dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) utilizado no congelamento (20% em SFB). A suspensão foi então transferida para frascos de manutenção de 25 cm² (T25) e incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

3.3 Teste de citotoxicidade da miristicina e dos quimioterápicos cisplatina e docetaxel

Para este ensaio, foi utilizado o método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) descrito por MOSMANN (1983) que consiste em avaliar indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas.

Foram inoculadas 5 mil células em 100 µL de meio completo em cada poço da placa de 96

poços, que foi incubada por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24 horas, a miristicina foi diluída em solução estoque de DMSO na concentração de 0,1 g/mL, (100 µL/compartimento) e tratada nas concentrações de 1,6 a 1000 uM em triplicata e, na sequencia, a placa foi incubada por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Como controle positivo foram utilizados os quimioterápicos cisplatina nas concentrações de 5 a 332 µM e docetaxel nas concentrações de 0,4 a 25 µM (100 µL/compartimento), em triplicata. Estas concentrações foram baseadas em estudos prévios conduzidos pelo grupo de pesquisa.

Após 48 horas de tratamento, as células tratadas foram então coradas com MTT. Após 4 horas de incubação, o corante foi solubilizado com DMSO e os dados de absorbância foram analisados em leitor de microplacas (Promega) e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra. Através do software Origin®, foi feita a regressão não linear das curvas obtidas com as médias da porcentagem de células viáveis em comparação ao controle negativo DMSO e foi calculado o IC₅₀ (concentração que reduz 50% da viabilidade celular). Esse parâmetro é utilizado para averiguar a potência citotóxica da amostra.

3.4 Teste da associação entre miristicina e quimioterápicos cisplatina e docetaxel

Após obtenção dos valores de IC₅₀ da miristicina e dos quimioterápicos cisplatina e docetaxel, as células receberam tratamentos conjuntos entre miristicina-docetaxel e miristicina-cisplatina, durante 48h de incubação e, ao final deste tempo de tratamento, as células foram coradas com MTT e os dados de absorbância foram analisados e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra, conforme já descrito no item 3.3.

Para investigar se a associação de miristicina com quimioterápicos cisplatina e docetaxel seria capaz de potencializar a atividade citotóxica dos mesmos, o índice de redução da concentração (CRI) foi calculado de acordo com a fórmula abaixo.

$$CRI = \frac{IC50 \text{ quimioterápico sozinho}}{IC50 \text{ quimioterápico associado à miristicina}}$$

Valores de CRI superiores a 1 indicam efeito sinérgico (CHOU, 2010). A representação gráfica deste efeito está apresentada como isoblograma, bastante utilizado para o estudo de sinergismo entre fármacos. No isoblograma, os IC50 oriundos da aplicação isolada de cada produto são unidos, gerando a isobole de aditividade ou linha teórica de aditividade. Os demais IC50 obtidos da associação em diferentes proporções dos produtos podem então ser analisados em relação à sua posição diante da isobole de aditividade. Se esses pontos se posicionarem em torno da isobole de aditividade, a ação é de efeito aditivo; ao se colocarem abaixo, a ação é de sinergismo; ao se situarem acima, a ação é de antagonismo (KRUSE; VIDAL and TREZZI, 2018).

3.5 Análise estatística

Os resultados dos testes *in vitro* foram expressos como média \pm desvio padrão das médias (EPM). A análise estatística dos dados de IC50 apresentados na tabela foi realizada por análise de variância simples (ANOVA 1 way) seguida de pós-teste de Tukey. A diferença estatística da associação entre miristicina e os quimioterápicos nas diversas concentrações apresentada nos gráficos foi detectada com análise de variância bidirecionada (ANOVA 2 way) seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes, sendo representados pelos asteriscos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O experimento foi realizado em triplicata biológica e duplicata experimental..

4. RESULTADOS

A atividade citotóxica do composto miristicina, bem como dos quimioterápicos cisplatina e docetaxel, foi avaliada frente à linhagem tumoral NCI-ADR/RES. A partir da curva obtida, foram calculados os valores de IC50. O composto miristicina não apresentou atividade citotóxica, visto que seu IC50 foi >1 mM para esta linhagem (TABELA 1). Os quimioterápicos cisplatina e docetaxel, quando tratados isoladamente, apresentaram IC50 de $215,60 \pm 6,36$ e $15,04 \pm 1,36$ μM , respectivamente (TABELAS 1 e 2).

Tabela 1. Atividade citotóxica expressa como IC50 (μM) de miristicina, cisplatina e sua associação na linhagem NCI/ADR-RES^a após 48 h de exposição.

	Miristicina	Cisplatina	Miristicina 1 mM + Cisplatina	Miristicina 500 μM + Cisplatina	Miristicina 100 μM + Cisplatina
IC50^b	>1000	215.60 ± 6.36	$144.70 \pm 2.44^{**}$	176.15 ± 21.61	$259.86 \pm 5.82^*$
CRI^c	n.a.	n.a.	1.49	1.22	0.67

^aNCI/ADR-RES: linhagem celular de adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplos fármacos; ^bIC50: concentração da amostra necessária (μM) para inibir 50% da viabilidade celular e calculada por análise de regressão não linear usando ORIGIN 7.5® (OriginLab Corporation); ^cCRI: índice de redução da concentração calculado como IC50 cisplatina/IC50 cisplatina+miristicina; n.a.: não aplicado. Análise estatística por ANOVA one-way seguida do teste de Tukey (**p < 0,01; *p < 0,05, relacionado à cisplatina). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e duplicata experimental. Concentração testada: 1,6-1000 μM (miristicina) e 5-332 μM (cisplatina).

Tabela 2. Atividade citotóxica expressa como IC50 (μM) de miristicina, docetaxel e sua associação na linhagem NCI/ADR-RES^a após 48 h de exposição.

	Miristicina	Docetaxel	Miristicina 1 mM + Docetaxel	Miristicina 500 μM + Docetaxel	Miristicina 100 μM + Docetaxel
IC50^b	>1000	15.04 ± 1.36	$3.69 \pm 0.00^{**}$	$10.90 \pm 0.04^*$	$22.23 \pm 2.78^*$
CRI^c	n.a.	n.a.	4.08	1.38	0.83

^aNCI/ADR-RES: linhagem celular de adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplos fármacos; ^bIC50: concentração da amostra necessária (μM) para inibir 50% da viabilidade celular e calculada por análise de regressão não linear usando ORIGIN 7.5® (OriginLab Corporation); ^cCRI: índice de redução da concentração calculado como IC50 docetaxel/IC50 docetaxel+miristicina; n.a.: não aplicado. Análise estatística por ANOVA one-way seguida do teste de Tukey (**p < 0,01; *p < 0,05, relacionado ao docetaxel). em triplicata biológica e duplicata experimental. Concentração testada: 1,6-1000 μM (miristicina) e 0,4-25 μM (docetaxel).

Embora isoladamente não tenha apresentado atividade citotóxica (FIGURA 4) na linhagem tumoral resistente, a miristicina corrobora para a potencialização do efeito dos quimioterápicos (FIGURAS 5 e 6), demonstrada pela redução dos valores de IC₅₀ encontrados para os mesmos quando estes foram associados à miristicina (TABELAS 1 e 2). Com relação à cisplatina, essa redução é significativa para a maior concentração de miristicina associada ao quimioterápico (1 mM). Já para o docetaxel se observa que as duas maiores concentrações (500 μ M e 1mM) reduziram o valor de IC₅₀. Na concentração de 1 mM, o CRI obtido para a cisplatina foi 1,49, o que significa que a miristicina potencializou o efeito deste quimioterápico em 1,49 vezes e reduziu o valor de IC₅₀ em 32,88%. Na mesma concentração, o CRI obtido para o docetaxel foi 4,08, demonstrando que a miristicina potencializou o efeito deste fármaco em 4,08 vezes e reduziu o valor de IC₅₀ em 75,46%. Estes valores de CRI acima de 1 indicam que houve sinergismo entre a miristicina e os quimioterápicos empregados.

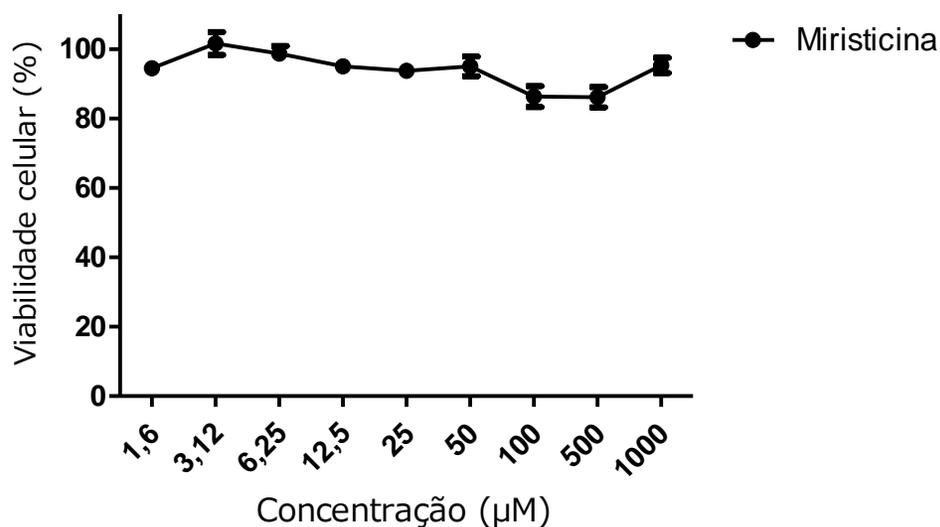


Figura 4. Atividade citotóxica do composto miristicina. Ensaio realizado com a linhagem tumoral NCI/ADR-RES, relacionando o percentual de viabilidade celular versus concentração, após 48 horas de incubação.

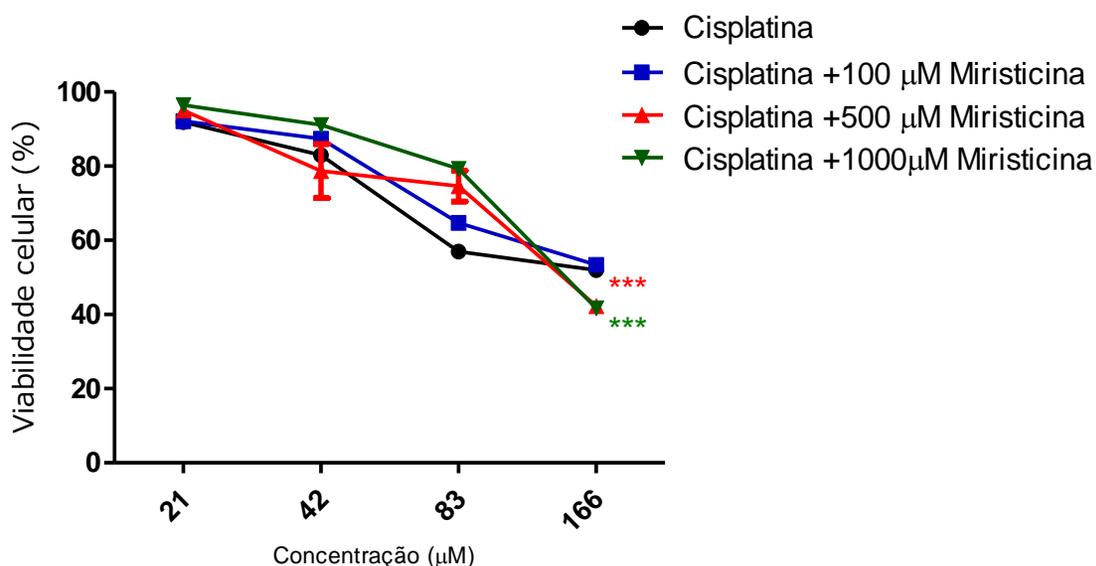


Figura 5. Atividade citotóxica do composto Miristicina em associação ao quimioterápico cisplatina.

Ensaio realizado com a linhagem tumoral NCI/ADR-RES, relacionando o percentual de viabilidade celular versus concentração, após 48 horas de incubação. Análise estatística por ANOVA two-way seguida Bonferroni (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

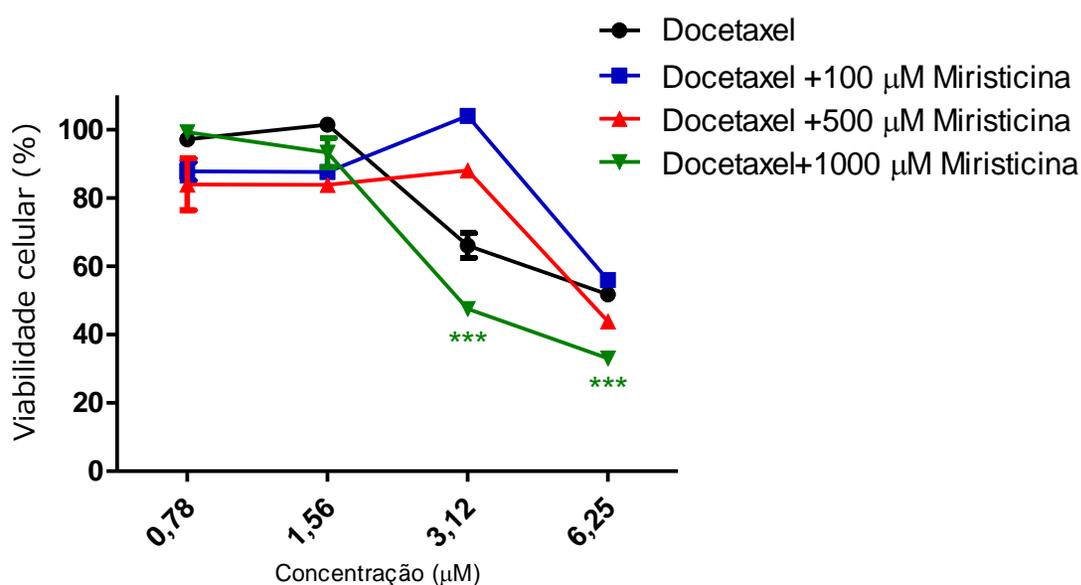


Figura 6. Atividade citotóxica do composto miristicina em associação ao quimioterápico docetaxel.

Ensaio realizado com a linhagem tumoral NCI/ADR-RES, relacionando o percentual de viabilidade celular versus concentração, após 48 horas de incubação. Análise estatística por ANOVA two-way seguida Bonferroni (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Tendo em vista os relevantes valores de IC50 e CRI obtidos, urgiu-se a necessidade de comprovar se o efeito da associação entre miristicina e quimioterápicos foi sinérgico. A análise dos isobologramas foi utilizada para avaliar as interações entre miristicina e os quimioterápicos (FIGURA 7). A isobole representada em azul no gráfico indica o efeito aditivo preditivo da associação entre a miristicina e os quimioterápicos. A curva obtida abaixo desta isobole e representada em vermelho indica que o real efeito desta associação foi sinérgico, ou seja, a ação resultante é maior do que a simples soma dos efeitos isolados de cada um deles.

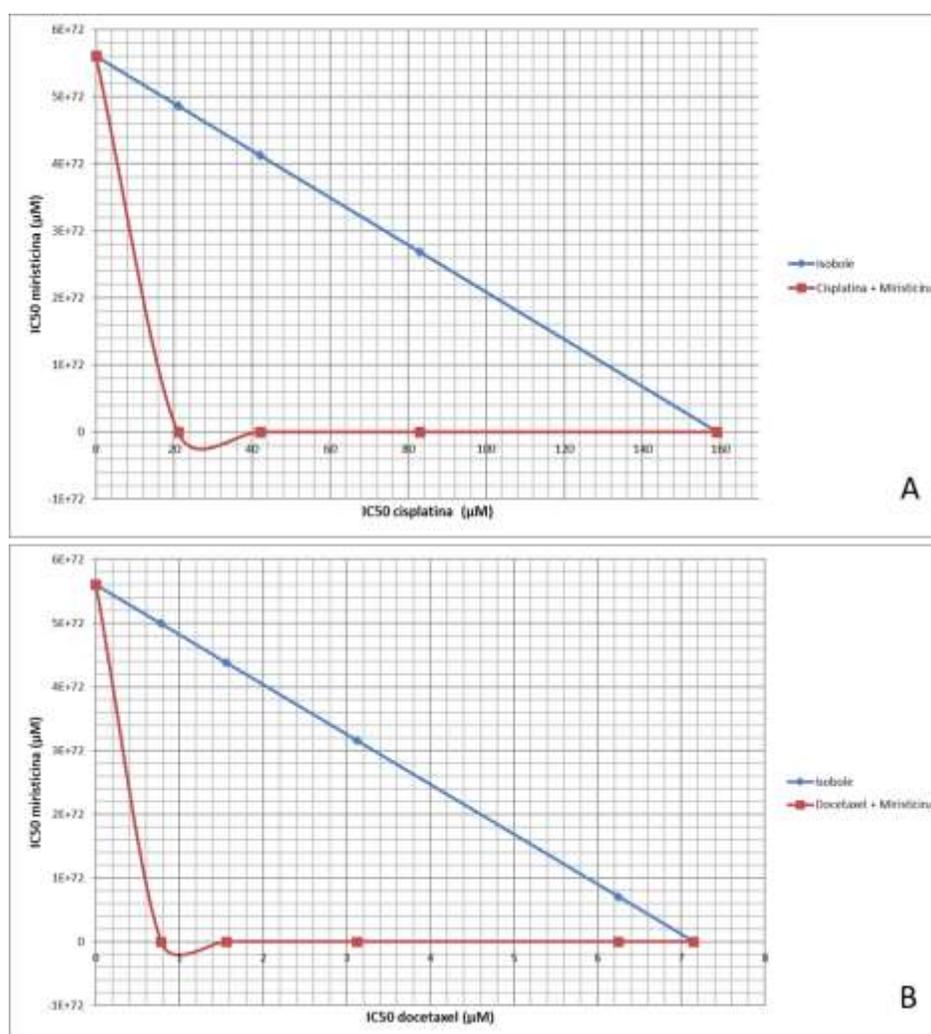


Figura 7. Isobologramas representando a interação sinérgica entre miristicina e os quimioterápicos cisplatina (A) e docetaxel (B) na linhagem de ovário resistente a múltiplos fármacos NCI/ADR-RES após 48 h de incubação.

5. DISCUSSÃO

Os quimioterápicos derivados de platina são usados como principal tratamento do câncer de ovário, apesar de seus efeitos adversos graves e desenvolvimento de resistência. Em ensaios clínicos, a cisplatina é frequentemente selecionada devido à sua forte atividade antitumoral, mas seus efeitos adversos incluem toxicidade renal, náuseas e vômitos. Portanto, para evitar toxicidade renal, os volumes de urina devem ser monitorados e a infusão de grandes doses é obrigatória na quimioterapia à base de cisplatina (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). O mecanismo molecular da apoptose induzida pela cisplatina envolve a ativação da proteína tumoral 53 (p53), fosforilação do componente da proteína ativadora (AP-1) levando à parada do ciclo celular através da estimulação de p21 e regulação negativa de ciclinas e ciclinas dependentes de quinases (TCHOUNWOU et al., 2021).

O docetaxel é um taxano semi-sintético que inibe a despolimerização dos microtúbulos, detendo as células na fase G2/M do ciclo celular e induz a fosforilação de bcl-2, promovendo assim uma cascata de eventos que finalmente leva à morte celular apoptótica (PIENTA, 2001). É aprovado para o tratamento do câncer de mama e pulmão e é indicado para o tratamento de carcinoma metastático de ovário após falha de quimioterapia de primeira linha. O docetaxel é um importante fármaco anticancerígeno que pode induzir reações de hipersensibilidade, hipereosinofilia sanguínea, levando a interrupções deletérias do tratamento. A hipereosinofilia sanguínea pode ser um sinal biológico, potencialmente letal, de reações de hipersensibilidade viscerais tardias (HAMDAN et al., 2019).

Nosso grupo tem trabalhado na triagem de compostos naturais com promissora atividade anticâncer e também no estudo da associação entre novas moléculas e quimioterápicos já bem estabelecidos na clínica, a fim de investigar o potencial sinérgico entre eles. Como já mencionado, o interesse em investigar os efeitos *in vitro* da associação entre miristicina e quimioterápicos em linhagem tumoral de ovário resistente a múltiplos fármacos foi despertado a partir dos resultados obtidos e publicados para a molécula apiol, que difere da miristicina pela presença de um grupo metóxi a mais. Já foi descrito em literatura que o número de grupos metoxi aceitadores de ligação de hidrogênio no terminal de anéis fenólicos é favorável para a atividade inibitória da P-gp (LAIOLO et al, 2021). Os estudos sugerem que esse grupo químico age como aceitador adicional de ligação de hidrogênio, implicando numa maior afinidade pelo sítio ativo da

P-gp e resultando na potente inibição dessa proteína (BAUMERT; HILGEROTH, 2009). Portanto, o estudo com a miristicina poderá predizer se a perda desse grupo influenciará na resposta sinérgica e de reversão da MDR.

Tendo em vista que não há relatos na literatura acerca da potencial atividade reversora da resistência a múltiplos fármacos da miristicina e considerando sua estrutura ser bastante semelhante ao apiol, urgiu-se a necessidade de conduzir o presente estudo da atividade da miristicina na viabilidade celular de linhagem tumoral de ovário resistente em associação a quimioterápicos bem estabelecidos na clínica para o tratamento deste tipo de câncer.

Os ensaios de viabilidade celular *in vitro* são amplamente utilizados para testes de citotoxicidade de produtos químicos e para triagem de novos fármacos. A aplicação destes ensaios tem sido de crescente interesse nos últimos anos. Esses ensaios também são usados em pesquisas oncológicas para avaliar a toxicidade do composto e a inibição do crescimento de células tumorais durante o desenvolvimento de novos candidatos quimioterapêuticos (OZLEM, 2018). São, portanto, importantes ferramentas para o estudo da associação entre fármacos que antecedem a investigação dos mecanismos de ação pelas vias de sinalização intracelular.

Outra importante ferramenta para o estudo das interações medicamentosas tem sido a construção de gráficos do tipo isobogramas. Estes são construídos a partir dos IC₅₀ gerados pelas curvas de resposta e são empregados na comprovação de sinergismo entre as moléculas. A probabilidade de ocorrência de interação após a combinação de medicamentos aumenta, o que pode afetar a eficácia e causar problemas de segurança. Se a combinação de medicamentos clínicos é muito mais eficaz do que a soma de seus efeitos individuais, tem-se como resultado o sinergismo entre os fármacos, mas caso o efeito terapêutico seja enfraquecido, o efeito é de antagonismo. Sinergia indica que dois ou mais componentes são misturados e o efeito é maior que a soma dos efeitos dos componentes individuais quando aplicados sozinhos, produzindo assim o efeito “1+1 > 2”. No âmbito da análise isobográfica, o antagonismo se dá quando o IC₅₀ é maior do que as concentrações esperadas das drogas A e B que são necessárias para produzir o efeito alvo (HUANG et al., 2019).

Os resultados adquiridos neste estudo mostram que a miristicina potencializou os efeitos citotóxicos dos quimioterápicos, evidenciados pela diminuição dos valores de IC₅₀ obtidos e valores de CRI maiores que 1. Este efeito é do tipo sinérgico, que foi observado através do

gráfico de isoblograma, visto que o efeito da associação é maior que a soma dos efeitos dos componentes individuais quando aplicados sozinhos. Acredita-se que esta potencialização dos efeitos quimioterapêuticos se deva, a princípio, ao bloqueio da bomba de efluxo relacionada a MDR. A coadministração clínica de fármacos inibidores do efluxo promovido por proteínas transmembrânicas em combinação com drogas que são anticancerígenas é considerada uma modalidade de tratamento para superar a MDR na terapia anticâncer (ZHANG et al., 2020).

Estudos para elucidação deste mecanismo específico estão sendo realizados por nosso grupo de pesquisa. Nossa hipótese é que ao bloquear a extrusão dos quimioterápicos, estes adentram as células livremente e realizam suas funções, parando o ciclo celular.

Considerando o grande impasse no tratamento quimioterapêutico do câncer que é a MDR adquirida pelas células tumorais, investigar alvos eficazes para contornar esta resistência continua a ser um desafio importante que precisa ser resolvido. Sendo assim, este estudo incentiva a continuação da investigação da miristicina como potencial reversora da MDR.

6. CONCLUSÃO

A miristicina isoladamente não apresenta efeito citotóxico para a linhagem tumoral resistente de ovário NCI/ADR-RES, porém promove efeito sinérgico quando associada aos quimioterápicos cisplatina e docetaxel, reduzindo a concentração quimioterapêutica necessária para causar decréscimo de 50% na viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

- BAO, H.; QI, M.. Anticancer effect of myristicin on hepatic carcinoma and related molecular mechanis. **Pharmaceutical Biology**, v. 59, p. 1124-1130, 2021.
- BAUMERT, C.; HILGEROTH, A.. Recent advances in the development of P-gp inhibitors. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 415-436, 2009.
- BOSTIAN, K.A.; LOMOYSKAYA, O.. Pratical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - a vision for applied use. **Biochem Pharmacol.** , v.71, n. 7, p. 910- 918, 2006.
- BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R.. Mechanism os multidrug resistance in cancer chemotherapy. **Internacional Journey of Molecular Sciences**, v. 21, 21(9) 3233, 2020.
- BRANDAO, H. N.; DAVI, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVI, J.M.. Quimica e farmacologia de quimioterápicos antineoplasicos derivados de planta. **Quim.Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRIXIUS, D.. A hard nut to crack: nutmeg cultivation and the application of natural history between the Maluku islands and Isle de France. **The British Journal for the History of Science**, v. 51, p. 585-606, 2018
- CHOU, T. C., Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. **Cancer Research**, v. 70, p. 440-446, 2010.
- DASARI, S.; TCHOUNWOUM, P. B.. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European journal of pharmacology**, v. 740, p. 364-378, 2014.
- FENG, Y.; HANG, W.; SANG, Z.; LI, S.; XU, W.; MIAO, Y.. Identification of exosomal and non-exosomal microRNAs associated with the drug resistance of ovarian cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, p. 3376-3392, 2019.
- FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; DYBA, T.; RANDI, G.; BETTIO, M.; GAVIN, A.; VISSER, O.; BRAY, F.. Global cancer statistics in 2018. **European Journal of Cancer**, v. 103, p. 356-387, 2018.
- HAMDAN, D.; LEOEUF, C.; FOLL, C. L.; BOUSQUET, A. J.. Re-exploring immune-related side effects of docetaxel in an observational study: Blood hypereosinophilia. **Cancer medicine**,

v.8, p. 2005-2012, 2019.

HE, M.; WU, H.; JIANG, Q.; LIU, Y.; HAN, L.; YAN, Y.; WEI, B.; LIU, F.; DENG, X.; CHEN, H.; ZHAO, L.; WANG, M.; WU, X.; YAO, W.; ZHAO, H.; CHEN, J.; WEI, M.. Hipoxia-inducible factor 2 α directly promotes BCRP expression and mediates the resistance of ovarian cancer stem cells to adriamycin. **Molecular Oncology**, v. 13, p. 403-421, 2018.

HOSSAM, M. A.; AHMED, M. A.; RIHAM, S. E.; ALI, M. E.. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 45-62, 2015

HUANG, R.Y.; PEI, L.; LIU, Q.; CHEN, S.; DOU, H.; SHU, G.; YUAN, Z. X.; LIN, J.; PENG, G.; ZHANG, W.; FU, H.. Isobologram Analysis: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P.. Glicoproteína-p, resistência a múltiplas drogas (mdr) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148-2154, 2010.

INCA, **Bases do tratamento**. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap7.pdf>>. Acesso em: 16 de novembro de 2020.

INCA, **O que é câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 15 de novembro de 2020.

INCA, **Câncer de ovário**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-ovario>>. Acesso em: 27 de abril de 2021.

INCA, **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil** . Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>> Acesso em: 27 abril de 202.

JAIWAL, P.; KUMAR, P.; SINGH, V.K.; SINGH, D. K.. Biological Effects of *Myristica fragrans* . **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 11, p. 21-29, 2009.

KIM, M.K.; CHOI, H.S.; CHO, S.G.; SHIN, Y.C.; KO, S.G.. Rubus coreanus miquel extract causes apoptosis of doxorubicin-resistant NCI/ADR-RES ovarian cancer cells via JNK phosphorylation. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, p. 4065-4072, 2016.

KONYUSHKIN, L. D.; GODOVIKOVA, T. I.; VORONTSOVA, S. K.; TSYGANOV, D. V.;

KARMANOVA, I. B.; RAIHSTAT, M. M.; FIRGANG, S. I.; POKROVSKII, M. A.; POKROVSKII, A. G.; SEMENOVA, M. N.; SEMENOVA, V. V.. Polyalkoxybenzenes from plant raw materials. Parsley and dill seed extracts in the synthesis of polyalkoxy3,5diaryl1,2,4oxadiazoles with antiproliferative activity. **Russian Chemical Bulletin, International Edition**, v. 59, n. 12, p. 2268—2275, 2010.

KURMAN, R.J.; SHIH, L. M.. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 3, p. 433-443, 2010.

LAILOLO, J.; LANZA, P. A.; PARRAVICINI, O.; BARBIERI, C.; INSUASTY, D.; COBO, J.; VERA, D. M. A.; ENRIZ, R. D.; CARPINELLA, M. C.. Structure activity relationships and the binding mode of quinolinone-pyrimidine hybrids as reversal agents of multidrug resistance mediated by P-gp. **Scientific Reports**, 2021.

LEE, B.K.; KIM, J.H.; JUNG, J.W.; CHOI, J.W.; HAN, E.S.; LEE, S.H.; KO, K.H.; RYU, J.H.. Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. **Elsevier**, v. 157, p. 49-56, 2005.

LI, W.; ZHANG, H.; ASSARAF, Y. G.; ZHAO, K.; XU, X.; XIE, J.; YANG, D. H.; CHENG, Z. S., 2015. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. **Elsevier**, v. 27, p. 14-29, 2016.

LI, Y.J.; LEI, Y. H.; YAO, N.; WANG, C. R.; HU, N.; YE, W. C.; ZHANG, D. M.; CHEN, Z. S.. Autophagy and multidrug resistance in cancer. **Chinese Journal of Cancer**, 2017.

LIMA, C.A.; BENTO, I.L.S.; VASCONCELOS, S. N. S.; SCIANI, J. M.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; LONGATO, G.B.. Reversal of Ovarian Cancer Cell Lines Multidrug Resistance Phenotype by the Association of Apiole with Chemotherapies, **Pharmaceuticals**, v.13, 2020.

MA, W.; ZANG, Y.; ZANG, Y.; ZANG, C.; WANG, J.; MA, L.; YANG, B.; WU, X.. Impact of chrysofenetin, per se or in combination with artemisinin, on breast cancer resistance protein 9 (Bcrp)/ABCG2 mRNA expression levels in mice small intestine. **Rev. bras.farmacogn**, v. 27, n.6, p. 776-779, 2017.

OZLEM, S. A. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages and disadvantages. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Eds). **Genotoxicity** A predictable risk to our actual world. London: Intechopen, 2018. P. 3-6.

- PIENTA, K.J. Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer. **Seminars in Oncology**, v. 28, p. 3-7, 2001.
- PIRAS, A.; ROSA, A.; MARONGIU, B.; ATZERI, A.; DESSI, M. A.; FALCONIERI, D.; PORCEDDA, S.. Extraction and Separation of Volatile and Fixed Oils from Seeds of Myristicafragrans by Supercritical CO₂: Chemical Composition and Cytotoxic Activity on Caco-2 Cancer Cells. **Journal of Food Science**, v.77, p. 448-453, 2012.
- RENGASAMY, G.; VENKATARAMAN, A.; VEERARAGHAVAN, V.P.; JAINU, M..Cytotoxic and apoptotic potential of MyristicafragransHoutt. (mace) extract on human oral epidermal carcinoma KB cell lines. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 3, 2018.
- SENEME, E. F.; SANTOS, D. C.; SILVA, E. M. R.; FRANCO, Y. E.M.; LONGATO, G. B.. Pharmacological and Therapeutic Potential of Myristicin: A Literature Review. **Molecules**, 26, no. 19: 5914, 2021.
- SODIR, N. M.; EVAN, G. I. Finding cancer's weakest link. **Oncotarget**, vol. 2, n. 12, p. 1307-1313, 2011.
- STEFANO, V. D; PITONZO R; SCHILLACI, D.. Antimicrobial and antiproliferative activity of Athamantasicula L. (Apiaceae). **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, p. 31-34, 2011.
- SRIVALLI, K. M. R.; LAKSHMI, P. K.. Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. **Braz. J. Pharm**, v. 48, n. 3, p. 353-367, 2012 .
- TCHOUNWOU, P.B.; DASARI, S.; NOUBISSI, F.K.; RAY, P.; KUMAR, S.. Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 13, p. 303–328, 2021.
- WANG, J.J.; LEI, K.F.; HAN, F.. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. **Eur Rev Med Pharmacol**, v. 22, n. 12, p. 3855-3864, 2018.
- WU Q, Y. Z.; NIE, Y.; SHI, Y.; FAN, D.. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. **CancerLett.**, v. 347, n. 2, p. 156-166, 2014.
- WU, J.; ZHOU, T.; WANG, Y.; JIANG, Y.; WANG, Y.. Mechanism and advances in anti-ovarian cancer with natural plants component. **Molecules**, vol. 26,19: 5949. 2021.

YEE, S.S.; RISINGER, A.L.. Efficacy of a covalent microtubule stabilizer in taxane-resistant ovarian cancer models. **Molécules**, v. 26, 13:4077, 2021.

ZHAO, M.D.; LI, J. Q.; CHEN, F. Y.; DONG, W.; WEN, L. J.; FEI, W. D.; ZHANG, X.; YANG, P. L.; ZHANG, X. M.; ZHENG, C. H.. Co-delivery of curcumin and paclitaxel by ‘‘core-shell’’ targeting amphiphilic copolymer to reverse resistance in the treatment of ovarian cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 9453-9467, 2019.

ZHANG, H.; JUNIOR, C. R. A.; ASSARAF, Y. G.; CHEN, Z. S.; LIU, H. M.. Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp). **Medicinal Research Reviews**, v. 41, p. 525-555, 2020.

ZHENG, G. G.; KENNEY, P.M.; ZHANG, J.; LAM L.K.T.. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis by myristicin, a volatile aroma constituent of parsley leaf oil. **Carcinogenesis**, v.13 n.10, p.1921-1923, 1992.

ANEXO. Artigo publicado na revista *Molecules* (IF: 4.411)

Review

Pharmacological and Therapeutic Potential of Myristicin: A Literature Review

Elisa Frederico Seneme^{1,2,†}, Daiane Carla dos Santos^{1,2,†}, Evelyn Marcela Rodrigues Silva¹, Yollanda Edwirges Moreira Franco^{2,3} and Giovanna Barbarini Longato^{1,2,*}

¹ Research Laboratory in Molecular Pharmacology of Bioactive Compounds, São Francisco University (USF), Bragança Paulista 12916900, SP, Brazil; elisaseneme@gmail.com (E.F.S.); daiancs93@gmail.com (D.C.d.S.); evelynmsilva@gmail.com (E.M.R.S.)

² Graduate Program in Health Science, São Francisco University, Bragança Paulista 12916900, SP, Brazil; yollanda.moreira@gmail.com

³ Laboratory of Molecular and Cellular Biology (LIM), Department of Neurology, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo 01246903, SP, Brazil

* Correspondence: giovanna.longato@fhusd.edu.br; Tel.: +55-(19)-98125-4542

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Natural products have been used by humanity for many centuries to treat various illnesses and with the advancement of technology, it became possible to isolate the substances responsible for the beneficial effects of these products, as well as to understand their mechanisms. In this context, myristicin, a substance of natural origin, has shown several promising activities in a large number of in vitro and in vivo studies carried out. This molecule is found in plants such as nutmeg, parsley, carrots, peppers, and several species endemic to the Asian continent. The purpose of this review article is to discuss data published in the last 10 years at Pubmed, Lilacs and Scielo databases, reporting beneficial effects, toxicity and promising data of myristicin for its future use in medicine. From 94 articles found in the literature, 68 were included. Exclusion criteria took into account articles whose tested extracts did not have myristicin as one of the major compounds.

Keywords: myristicin; nutmeg; natural products; bioactive compounds; therapeutic properties



Citation: Seneme, E.F.; dos Santos, D.C.; Silva, E.M.R.; Franco, Y.E.M.; Longato, G.B. Pharmacological and Therapeutic Potential of Myristicin: A Literature Review. *Molecules* **2021**, *26*, 5914. <https://doi.org/10.3390/molecules26195914>

Academic Editors: Baojun Xu and Kumar Ganesan

Received: 11 August 2021
Accepted: 3 September 2021
Published: 29 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Biodiversity is the variability of all living beings in the biosphere, in its entirety. Such beings become renewable sources of substances that can originate various products for human consumption, including medicines for the treatment of various pathologies. The main producers of these substances are plants, microorganisms, marine algae, among others, which over thousands of years of evolution, were capable of adaptations that made them capable of acquiring biological activities of various types [1].

Data show that there are still few drug discovery programs based on natural products in pharmaceutical companies, although they are a promising source of new drugs [2]. Even so, drugs produced from natural substances are numerous, since those obtained from natural sources represent about 70% of all drugs approved for therapeutic use in the last four decades [3].

Natural compounds have been one of the main sources of the production of medicines since the beginning of time, giving rise to drugs of different therapeutic classes. One of the main examples is the discovery of penicillin in 1928, by the researcher Alexander Fleming, whose research with fungi of the *Penicillium* genus culminated in the discovery of a compound with an antibacterial activity. This compound was called penicillin and is currently used to treat infections caused by bacteria of the *Staphylococcus genus* [4]. Another natural compound of great importance is quinine, derived from the bark of the quinine. Initially this herb was consumed by the indigenous people of the Amazon region. This plant has been used for decades to treat malaria, and this substance gave rise to other drugs