UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

JEPHESSON ALEX FLORIANO DOS SANTOS

TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO ANÁLOGO DA PIPERINA 2-OXO-2-(4-NITROFENILAMINA)-PIPERINOATO DE ETILA EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

João Pessoa – PB
2017

JEPHESSON ALEX FLORIANO DOS SANTOS

TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO ANÁLOGO DA PIPERINA 2-OXO-2-(4-NITROFENILAMINA)-PIPERINOATO DE ETILA EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa – PB

2017

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237t Santos, Jephesson Alex Floriano dos.
Toxicidade e potencial antitumoral do análogo da piperina 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila em modelo experimental de tumor ascítico de Ehrlich / Jephesson Alex Floriano dos Santos. - João Pessoa, 2017.
148 f. : il.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Atividade antitumoral. 3. Toxicidade. 4. Piperina. I. Sobral, Marianna Vieira. II. Título.

UFPB/BC

JEPHESSON ALEX FLORIANO DOS SANTOS

TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO ANÁLOGO DA PIPERINA 2-OXO-2-(4-NITROFENILAMINA)-PIPERINOATO DE ETILA EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

APROVADA EM 22/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Marianna Vieira Sobral

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
Orientadora

Marcia R Piuvezam

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam
Membro interno

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras
Membro externo

Dedico esse trabalho,

Aos meus avós, Ana Floriano do Nascimento e Abel Francisco do Nascimento, por serem meus exemplos para a vida.

Aos meus pais, Rosilene e José Antônio, por todos os ensinamentos. Aos meus irmãos, Lucas, Kayo Vinicius e Maria Clara. A Andrea pelo apoio prestado.

Essa é para vocês!

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho é devido a um conjunto de inspirações, esforços, ajuda e dedicação de diversas pessoas, entre eles, professores, funcionários, amigos, familiares, sem os quais não seria possível a realização e desenvolvimento do mesmo, assim, quero desejar meus profundos agradecimentos.

Agradeço aos meus avós, **Abel Francisco e Ana Floriano,** pois me deram tudo que precisei para chegar aqui, e que sempre me deram apoio para conquistar todos os meus sonhos e ser alguém de valor. Mais do que isso, eles me deram motivos para querer ser um grande profissional Farmacêutico, profissional de saúde, e para realizar meu sonho de ser um cientista. A ciência pode mudar o mundo, e eu quero isso por vocês. A vocês, agradeço por serem minha fonte inspiração profissional.

Aos meus pais, **Rosilene Floriano e José Antônio,** por terem me dado a vida e contribuído para que eu chegasse ao dia de hoje. Independente da forma, vocês deixaram suas contribuições para esse momento tão especial em minha vida.

Aos meus tios **Jailson Trajano e Rosimary Floriano** por toda contribuição ao longo de minha trajetória pré-acadêmica e acadêmica. Sou eternamente grato. Aos meus irmãos, **Lucas, Kayo e Maria Clara** por estarem presentes e terem contribuído para deixar meus dias mais coloridos. Aos meus primos, **Rian e Ana Caroline,** que sempre estiveram presentes e realmente são pessoas que levo no coração.

Agradeço muito a minha família por entender minhas escolhas, desejos e loucuras. Vocês são tão parte deste trabalho quanto eu.

Meu agradecimento especial vai para uma pessoa que apareceu no início do meu mestrado. Mas que foi o motor de minhas mudanças, desejos e principalmente por me fazer acreditar mais em mim mesmo. **Andréa,** eu só tenho a agradecer, agradecer por você ter sido o divisor de águas, por me fazer acreditar que eu realmente poderia conquistar o que quisesse, e agradeço por ter confiado e acreditado tanto em mim. Você mudou a minha rota, viabilizou

minhas loucuras e participou ativamente da minha vida profissional. Andréa não contribuiu apenas com esse trabalho, contribuiu para eu ser um profissional de saúde melhor, contribuiu com todos os nossos desafios científicos e todas as nossas discussões e aprendizados acadêmicos. Sim, você foi o motor que me levou do ponto **A** ao ponto **Z,** mesmo sabendo das consequências que isso traria. Sou eternamente grato.

Quero agradecer aos meus amigos, mas antes de citar nomes, desejo fazer algumas considerações. A vida profissional e pessoal são coisas indissociáveis para mim, e essas pessoas me ajudaram de alguma forma a me encontrar pessoalmente e consequentemente me sentir bem para que eu pudesse conquistar com maior êxito os meus objetivos de profissionais. Agradeço a esses meus amigos pela oportunidade de conhecimento, e por me ajudarem a crescer me sentir bem comigo mesmo. Essas pessoas são **André, Aratã, Alana, Ângelo, Gyan, Jocykleber, John, Karen, Laísa, Matheus, Marília e Pedro**, entre tantos outros amigos.

Agradeço ao **Manoel Neto,** que se tornou parte da família e no qual temos uma convivência de quase 5 anos de amizade.

Agradeço de coração a **Angélica Soares,** pois ela teve papel fundamental para a realização desse trabalho e também na viabilização e realização dos meus sonhos. Ela tornou-se uma grande amiga, alguém que pude confiar, que tenho muita admiração e no qual sinto muito orgulho de ter conhecido. Agradeço por tudo, pois sua contribuição foi fundamental para este trabalho, para meu futuro acadêmico e minha vida.

Agradeço a **Marília Borges,** pela contribuição no presente trabalho, e por ter sido tão paciente e tão amiga.

Minha formação acadêmica veio recheada de pessoas que contribuíram diretamente para que eu me tornasse o profissional de hoje, amante pela farmácia e da pesquisa. Uma dessas pessoas, é a minha orientadora, **Drª. Marianna Vieira Sobral**, no qual tenho o maior orgulho por ter aceitado me acompanhar e me orientar nesse percurso de mestrado. Eu te agradeço por ter feito parte da realização do meu sonho, por ter acreditado e confiado em mim, mesmo nas horas em que nem eu mesmo acreditava. Agradeço por ter me

orientado com tanto carinho e tanta dedicação. Admiro muito sua capacidade, inteligência e como conduz nosso aprendizado. Posso dizer que hoje já sinto saudades, e saudade é mais uma demonstração de que a senhora realmente marcou minha vida e se tornou uma pessoa importante. A senhora realmente me fez sentir o que é pesquisa, e me despertou uma das coisas que mais me movem, a curiosidade, e me deu algo fundamental, autonomia, autonomia essa que me fez acreditar que eu sempre poderia chegar onde quisesse. Seu papel transcendeu o papel de orientadora, como também foi uma amiga e conselheira.

A minha família do Laboratóriodo Oncofarmacologia (ONCOFAR), **Monalisa Brito**, **Daiene Martins**, **Aline Xavier**, **Tatianne Mota**, **Tatyanna Kelvia**, **Viviane Medeiros, Ryldene Marques, Daiana**, **Renata Abrantes**, **Rafael Ferreira**, **Flávia Barbosa**, **Ana Luisa**, **Ana Luiza e Ana Paula** que foram essenciais para a viabilização dos experimentos, sendo responsáveis também pela construção desse trabalho. Agradeço muito a cada um do vocês. Vocês realmente me fizeram sentir-me em casa, e de alguma forma, todos vocês contribuíram para minha formação. A troca de saberes é algo constante e temos um grupo de pesquisa que é muito qualificado.

Meus agradecimentos especiais vão para a minha grande amiga **Monalisa**, no qual tenho grande admiração e agradeço demais por todos os debates e conversas sobre câncer. Sendo essencial no ensinamento de diversas técnicas e por ser a amiga e companheira que foi e que ainda é. Esse mestrado tem um toque seu, e que minha formação tem grande contribuição sua. Além de que, agradeço muito a você pelo meu futuro, no qual você colocou a oportunidade em minha porta.

A **Taty, Vivi e Tati**, agradeço todo o apoio prestado, não só em experimentos, mas também nas coisas do dia-a-dia. Agradeço muito a todas vocês, que sempre estiveram presentes e que estavam dispostas a ajudar e contribuir com o trabalho e minha formação. A vocês, meu grande obrigado. Vocês foram presentes que a vida me deu, e que guardarei por toda a minha vida. Cada uma de vocês três tem um espaço em meu coração, todas tiveram papeis diferentes em minha vida, mas somaram muito durante minha trajetória. Ao **Rafael,** meu amigo de graduação e do Acre (lugar que nos tornamos amigos), você está no meu coração amigo, e agradeço demais toda contribuição prestada,

companheirismo e amizade. Você é um menino muito talentoso e acredito muito em ti. A minha colega de graduação que se tornou alguém muito especial, **Ryldene**, que me ajudou muito nas técnicas, desenvolvimentos e também com sua amizade. A rotina do laboratório nos aproximou muito, e só tenho a agradecer por tudo isso. Acredito muito em seu sucesso.

Ana Paula? E a Ana Paula? Bem, 1 mês de experimento convivendo com aquela pessoa todos os dias. Mas tempo não define amizade, tempo só dá a oportunidade. Ana foi a parceria que deu certo, foi o sinergismo para a criação do presente trabalho. Mas a Ana não foi apenas a parceira de trabalho, ela se tornou uma amiga, confidente e companheira. Ela foi uma das pessoas que mais me estimulava para o novo, para enfrentar os desafios e crescer. Para a Ana, vai toda minha gratidão e agradecimento por ter feito parte de minha vida.

A professora **Drª. Daniela Priscila Marchi Salvador**, minha orientadora dos tempos de graduação, sendo a pessoa que meu iniciou na pesquisa e que acreditava em mim. Ela foi a pessoa que me deu grandes chances na vida, me ajudou e que contribuiu de uma forma muito preciosa para meu futuro.

A professora **Drª. Marcia Regina Piuvezam,** quero agradecer novamente. Minha paixão pela imunologia nasceu e se consolidou com a senhora, é realmente algo que me traz um prazer enorme. Agradeço a senhora por ter me dado isso, pois, todo conhecimento que adquiri com a senhora são fundamentais, tanto para a realização desse trabalho, quanto para a minha vida. Dentre a minha amada Farmacologia e Fisiologia, a imunologia é o meu amorzinho. A senhora, o meu eterno obrigado e admiração.

Ao auxílio do amigo do Laboratório de Imunofarmacologia (CBiotec/UFPB), **Dr. Fagner Leite** com os estudos imunológicos, e da **Profa. Dra. Giciane Carvalho**, com os estudos histopatológicos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por oferecer seus recursos e oportunidades, e ao Biotério Prof. Dr. Thomas George (IPeFarM/CCS/UFPB) pelo fornecimento dos animais.

Em especial aos funcionários do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM), ao amigo **sr. Josué** pelo apoio e disponibilidade,

sempre disposto a ajudar; e ao **sr. José Crispim Duart** pela prestatividade quando precisamos dos animais de laboratório.

Ao técnico **Jean Aguiar** pela disposição, paciência e boa vontade para sempre nos ajudar, quando preciso, nas análises bioquímicas.

Ao professor **Dr. Robson Veras**, pela contribuição preciosa na discussão dos dados, pelos ensinamentos e pela colaboração com o presente trabalho.

Ao professor **Dr. Hemerson Magalhães,** pela colaboração com o trabalho, pela amizade. Será meu eterno professor de Toxicologia e agradeço demais pela sua disponibilidade e por ter sido sempre tão prestativo.

A todos os professores que ministraram as disciplinas de mestrado, pelos ensinamentos científicos, assim como aos amigos da pós-graduação.

A secretária da pós-graduação, **Caroline Medeiros Mangueira** pelos serviços prestados com efetividade e presteza sempre.

A todos os meus amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Ao fim, quero agradecer a todos vocês que citei, e peço desculpas caso tenha esquecido alguém. Nesse momento, acho fundamental falar de uma coisa chamada saudade. Eu tenho tanto carinho por todos vocês, tanta admiração e agradeço tanto de coração por terem participado dessa trajetória. Nessa minha mudança/ausência, quero sentir todos vocês perto. Pois muitos foram a minha família até a presente data. São tantas pessoas, tantos momentos, tantas vidas, no qual, levarei comigo. Se a saudade existe, é porque os momentos foram incríveis, e hoje eu já sinto saudades. Eu realmente não tenho palavras para agradecer, porque não foi apenas uma contribuição nesse trabalho, mas vocês também foram uma contribuição para a minha vida.

Sabe quando a terra, a chuva, parece cantar. E a rua inteira está bonita? Lá em frente você vê escuro, mas só brilha quem se atreve a passar. Por todo o tempo que nada mudou, só muda pra quem nunca vai parar!

Você é o que você sonhou!

Outro Eu

SANTOS, J. A. F. **TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO ANÁLOGO DA PIPERINA 2-OXO-2-(4-NITROFENILAMINA)-PIPERINOATO DE ETILA EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH.** 2017. 148f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, associado a uma elevada taxa de insucesso na terapêutica, o que está relacionado a aspectos como efetividade, toxicidade, farmacocinética e resistência por parte das células tumorais. Nesse contexto, produtos naturais continuam exercendo importante papel como protótipos para a síntese de novos candidatos a fármacos. A piperina é um alcaloide amida, isolada de espécies de *Piper*, que apresenta atividade antitumoral, entretanto possui significante toxicidade. Com o objetivo de potencializar a sua atividade e reduzir a toxicidade, vários análogos inéditos estão sendo estudados, dentre estes o 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE02). Esse trabalho objetivou investigar a atividade antitumoral, bem como a toxicidade do HE02. No ensaio de hemólise, HE02 induziu apenas 5,01% de hemólise na maior concentração testada (1000 µg/mL), apresenta baixa citotoxicidade em eritrócitos de camundongos. Já em linhagem de células RAW 264.7, HE02 induziu 49,75% de citotoxicidade após tratamento com 1000 µg/mL. No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda, a dose letal 50% (DL_{50}) foi estimada em torno de 2000 mg/kg, o que permitiu a escolha de doses seguras a serem usadas no ensaio farmacológico. Em modelo de tumor ascítico de Ehrlich, HE02 (12,5 ou 25 mg/kg) apresentou atividade antitumoral por reduzir os parâmetros viabilidade e total celular ($p<0,05$), sem alterar o volume e massa tumorais. Na análise do perfil do ciclo celular, HE02 (12,5 mg/kg) induziu pequeno aumento no pico sub-G1 ($p<0,05$), de apenas 10% em relação ao controle, mostrando que alterações no ciclo celular não representam um mecanismo importante no efeito antitumoral de HE02. O tratamento com HE02 (12,5 mg/kg) reduziu a microdensidade vascular peritumoral ($p<0,05$), indicando ação antiangiogênica. Com relação a avaliação de citocinas do microambiente tumoral observou-se que HE-02 aumentou as concentrações de IL-1β, TNF-α e IL-12, ao passo que reduziu as citocinas IL-4 e IL-10 ($p<0,05$). Além disso, HE02 induziu aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) no fluido peritoneal ($p<0,05$ para ambos). Esses dados sugerem que HE02 promove modulação do sistema imune no sentido de estimular um perfil de linfócitos T *helper* 1 (Th1), que é citotóxico para as células tumorais. No que diz respeito a avaliação da toxicidade no modelo de carcinoma de Ehrlich, foi observado redução do peso corporal, além de aumento da ureia, porém o dano renal foi descartado pela análise histológica dos rins. Ainda, foi observado leucocitose acompanhada de neutrofilia e linfopenia. Esses resultados conjuntos que HE02 apresenta baixa toxicidade e atividade antitumoral *in vivo* por estimulação do sistema imune.

Palavras-chave: Piperina, Atividade antitumoral, Toxicidade

SANTOS, J. A. F. **TOXICITY AND ANTITUMORAL POTENTIAL OF THE ANALOGUE OF THE PIPERINE 2-OXO-2(4-NITROPHENYLAMINE) – ETHYL PIPERINOATE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ASHTITIC TUMOR OF EHRLICH**. 2017. 148f. Dissertation (Masters in Natural Products and Bioactive Synthetics) UFPB/CCS, João Pessoa

ABSTRACT

Cancer is a worldwide public health problem, associated to an elevated rate of failure in therapy, which is related to aspects such as effectiveness, toxicity, pharmacokinetics and resistance by tumor cells. In this context, natural products still have a big part as prototypes to the synthesis of new drug candidates. The piperine is an amide alkaloid, isolated from species of *Piper*, which shows antitumor activity, however it has significant toxicity. In order to potentiate its activity and reduce the toxicity, several unpublished analogues are being studied, among them the 2-oxo-2-(4-nitrophenylamine) ethyl piperinoate (HE-02). This work aimed to investigate the antitumor activity as well as the toxicity of the HE-02. In the hemolysis experiment, HE-02 inducted only 5,01% of hemolysis on the higher concentration tested (1000ug/mL), suggesting low cytotoxicity in mouse erythrocytes. In RAW 264.7 cell lines, HE-02 inducted 49,75% of cytotoxicity after treatment with 1000ug/mL. In the pre-clinical test of toxicity, the 50% lethal dose (LD50) was estimated around 2000 mg/kg, which allowed the choice of safe doses to be used in the pharmacological test. In the Ehrlich ascites tumor model, HE-02 (12,5 or 25 mg/kg) showed antitumor activity by reducing viability and total cell parameters ($p<0,05$), without altering tumor volume and mass. In the analysis of the cell cycle profile, HE-02 (12,5 mg/kg) induced a small increase of only 10% in the sub-G1 peak ($p<0,05$) in relation to the control, suggesting that alterations in the cell cycle do not represent an important mechanism in the antitumor effect of HE-02. The treatment with HE-02 (12,5 mg/kg) reduced the peritumoral vascular microdensity ($p<0,05$), indicating antiangiogenic action. Regarding the evaluation of cytokines of the tumor microenvironment, it was observed that HE-02 increased the concentrations of IL-1β, TNF-α and IL-12, while reducing IL-4 and IL-10 cytokines ($p<0,05$ for all). In addition, HE-02 induced the increase of concentrations of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) in the peritoneal fluid ($p<0,05$). These data together suggest that HE-02 promotes modulation of the immune system in the sense of stimulating a profile of T *helper* lymphocyte 1 (Th1), which is cytotoxic to tumor cells. Regarding the evaluation of toxicity in the Ehrlich carcinoma model, a reduction in body weight was observed in addition to an increase in urea, but kidney damage was ruled out by histological analysis of the kidneys. Furthermore, leukocytosis was observed, accompanied by neutrophilia and lymphopenia. These results suggest that HE-02 shows low toxicity and antitumor activity *in vivo* by stimulation of the immune system.

Key words: Piperine, Antitumor activity, Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os cinco tipos de câncer mais comuns em 2012 de acordo com o índice de desenvolvimento humano (IDH). Os níveis de desenvolvimento social foram divididos em quatro perfis: IDH baixo (<0,530); IDH médio (0,530≤ IDH <0,710); IDH alto (0,710 ≤ IDH < 0,800) e muito alto (IDH ≥ 0,800) **27**
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2016-2017 por gênero, exceto pele não melanoma (INCA, 2016).....**28**
Figura 3. Estágios para formação do tumor..... **29**
Figura 4. Papel canônico das ciclinas e cinases dependentes de ciclinas na progressão do ciclo celular **34**
Figura 5. Atuação dos principais agentes antiangiogênicos..... **38**
Figura 6. Influência das células tumorais sobre o processo inflamatório. **41**
Figura 7. Modelo de inflamação supressora de tumor **43**
Figura 8. Estrutura do HE-02..... **61**
Figura 9. Efeito do tratamento com o HE-02 e 5-FU na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com CAE..... **84**
Figura 10. Efeito do tratamento de nove dias com HE-02 (12,5 mg/kg, i.p.) e 5-FU (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich **94**
Figura 11. Efeito do tratamento de nove dias com HE-02 (12,5 mg/kg, i.p.) e 5-FU (25 mg/kg, i.p.) na histologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich..... **96**
Figura 12. Efeito do tratamento de nove dias com HE-02 (12,5 mg/kg, i.p.) e 5-FU (25 mg/kg, i.p.) na histologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich..... **97**

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral do 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE-02) **68**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Citotoxicidade do HE-02 em linhagens de macrófagos RAW 264.7 **79**
Gráfico 2. Efeito do tratamento com HE-02 e 5-FU em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich..... **82**
Gráfico 3. Percentagem de células de CAE nas fases do ciclo celular após tratamento com solução 12% de Tween 80 (controle) e do HE-02 (12,5 mg/kg) **83**
Gráfico 4. Concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos **86**
Gráfico 5. Produção de espécies reativas de oxigênio após tratamento com HE-02 (12,5 mg/kg) **87**
Gráfico 6. Quantificação de nitrito do fluído peritoneal dos animais controle e tratados com HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) **88**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da administração de doses únicas (i.p.) do análogo da piperina 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila em camundongos **80**
Tabela 2. Consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução de 12% tween 80 (controle), HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) **89**
Tabela 3. Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) **90**
Tabela 4. Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), HE02 (6,25; 12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) **91**
Tabela 5. Índices dos órgãos de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), HE02 (6,25; 12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). **92**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5- fluorouacil
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CCL-2	Quimiocina ligadora 2
CDK-4	Cinase dependente de ciclina-4
CDK-6	Cinase dependente de ciclina-6
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CH50	Concentração que produz 50% de hemólise
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
CI50	Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular
CO_2	Dióxido de carbono
DL50	Dose que causa 50% da letalidade dos animais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
dUTP	Trifosfato de deoxiuridina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FdUMP	5-fluoro-2’-deoxiuridina-5’-monofosfato
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FUTP	5-fluorouridina-5’-trifosfato
H.E.	Hematoxilina e eosina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10

IL-12	Interleucina 12
INF-γ	Interferon gama
INCA	Instituto Nacional do Câncer
M/T	Mortos/Vivos
MDR-1	*Proteína 1 de Resistência a múltiplos fármacos*
mTor	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetillyiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
NCI-USA	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
OncoFar	Laboratório de OncoFarmacologia
OMS	Organização Mundial de Saúde
v/v	Volume/volume
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PBS	Solução Tampão Fosfato
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
pRB	Gene supressor Tumoral que expressa a Proteína do Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
TH1	Linfócito T auxiliar tipo I
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TS	Timidilato sintase
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VEGF	Fator de Crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
2 REFERENCIAL TEÓRICO 25
2.1 Aspectos gerais no câncer 25
2.1.1 Controle do ciclo celular 30
2.1.2 Angiogênese tumoral 34
2.1.3 Microambiente tumoral 38
2.1.4 Estresse oxidativo e o papel do óxido nítrico no contexto do câncer 52
2.2 Tumor Ascítico de Ehrlich 58
2.3 Análogos da piperina e o 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila 59
3 OBJETIVOS 63
3.1 Objetivo geral 63
3.2 Objetivos específicos 63
4 MATÉRIAL E MÉTODOS 65
4.1 Local da Pesquisa 65
4.2 Material 65
4.2.1 Substância teste 65
4.2.2 Animais 66
4.2.3 Linhagem de células tumorais 66
4.2.4 Substâncias e reagentes 66
4.2.5 Equipamentos 67
4.3 Métodos 68
4.3.1 Ensaios toxicológicos 68
4.3.1.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos 68
4.3.1.2 Avaliação da citotoxicidade em linhagem de macrófagos RAW 264.7 69
4.3.1.3 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda 70
4.3.2 Avaliação da atividade antitumoral *in* vivo em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich 70
4.3.2.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade celular e total celular 71

4.3.2.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral..... 71
4.3.2.2.1 Análise do ciclo celular 72
4.3.2.2.2 Avaliação do efeito antiangiogênico..... 72
4.3.2.2.3 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal 73
4.3.2.2.4 Investigação do estresse oxidativo 74
4.3.2.2.4.1 Quantificação de espécies reativas de oxigênio 74
4.3.2.2.4.2 Quantificação dos níveis de nitrito..... 74
4.3.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich 75
4.3.2.3.1 Avaliação podenral e do consumo de água e ração 75
4.3.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos 75
4.3.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos 76
4.3.2.3.4 Análises histológicas..... 76
4 RESULTADOS 79
5.1 Ensaios toxicológicos 79
5.1.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos 79
5.1.2 Avaliação da citotoxicidade em linhagem de células RAW 264.7 . 79
5.1.3 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda..... 80
5.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich 81
5.2.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade celular e total celular 81
5.2.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral 82
5.2.2.1 Análise do ciclo celular..... 82
5.2.2.2 Avaliação do efeito antiangiogênico 83
5.2.2.3 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal 84
5.2.2.4 Investigação do estresse oxidativo..... 87
5.2.2.4.1 Quantificação de espécies reativas de oxigênio 87
5.2.2.4.2 Quantificação de níveis de nitrito..... 87
5.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich 88

5.2.3.1 Avaliação do consumo de água e ração 88
5.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.. 89
5.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos 92
5.2.3.4 Análises histopatológicas 93
6 DISCUSSÃO 99
7 CONCLUSÕES 116
8 REFERÊNCIAS 118
ANEXOS 145

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico que se refere a um conjunto de doenças caracterizadas pela presença de células em proliferação contínua, com propriedades de invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000; COSTA-LOTUFO et al., 2010). Representa uma das causas mais comuns para a alta morbidade e mortalidade, ao lado das doenças cardiovasculares (BRINDHA et al., 2016), o que o caracteriza como um importante problema de saúde pública mundial (JEMAL et al., 2011; KALASA et al., 2015).

Segundo a organização não governamental *World Cancer Research Fund International*, a incidência do câncer cresceu mais de 20% na última década, havendo registros de cerca de 14,1 milhões de casos em 2012 e perspectivas de que este número aumente para 24 milhões até 2035 (WHO, 2014).

Várias abordagens são usadas para o tratamento do câncer, incluindo a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, muitas vezes sendo utilizada a combinação de mais de um tipo de tratamento (ZHU et al., 2014). Embora seja um dos métodos mais utilizados, a quimioterapia apresenta limitações de eficácia terapêutica, além de produzir efeitos secundários graves, como consequência da baixa especificidade dos fármacos antineoplásicos (SAFARZADEH et al., 2014). Ainda, as células cancerígenas desenvolvem rapidamente mecanismos pleiotrópicos de resistência aos medicamentos administrados, o que também compromete o sucesso da terapia (GOTTESMAN et al., 2016).

Produtos naturais, incluindo compostos derivados de organismos marinhos, micro-organismos e, especialmente, de plantas, têm desempenhado um importante papel no desenvolvimento de vários agentes antineoplásicos (COSTA-LOTUFO et al., 2010; CRAGG; NEWMAN, 2013). Nesse contexto, desde o final de 1930, quando foi introduzida a quimioterapia, 206 compostos foram aprovados para uso em todo o mundo, sendo aproximadamente 75% de produtos naturais ou derivados destes (NEWMAN; CRAGG, 2010; GOTTESMAN et al., 2016). Estes incluem a vimblastina e a vincristina obtidas de *Catharanthus roseus* (ISHIKAWA et al., 2009), e os análogos semissintéticos vindesina e vinorelbina; o paclitaxel, obtido de *Taxus brevifolia*, e o derivado

semissintético docetaxel; a podofilotoxina e os derivados semissintéticos, etoposídeo e teniposídeo; e a camptotecina e os análogos, topotecano e irinotecano (CRAGG; NEWMAN, 2013). Então, compostos naturais formam um grande arsenal de fármacos antineoplásicos que efetivamente contribuem para o combate à doença e ainda servem como protótipos para síntese de novos candidatos a fármacos (GOTTESMAN et al., 2016).

No entanto, apesar da diversidade farmacológica associada ao tratamento do câncer, incluindo medicamentos produzidos a partir de produtos naturais ou sintéticos, muitos destes não alcançam o objetivo terapêutico esperado, o que se reflete na redução dos índices de sobrevida dos indivíduos acometidos com a doença. Impulsionados por essa imperativa, as pesquisas não clínicas e clínicas, utilizando diversas abordagens terapêuticas contra o câncer, continuam crescendo em todo o mundo na perspectiva da descoberta de novos fármacos, ou de reduzir a toxicidade e o desenvolvimento de resistência relacionada aos fármacos já existentes (WU; ZHOU, 2015).

Os fármacos quimioterápicos são baseados em compostos tóxicos que inibem principalmente a rápida proliferação das células cancerosas, mas, infelizmente, eles também inibem o rápido crescimento necessário para a manutenção de folículos pilosos, medula óssea e gastrointestinal células do trato que conduzem aos efeitos secundários indesejáveis observados no tratamento do câncer (PÉREZ-HERRERO & FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015). Fazendo-se importante o estudo do perfil toxicológico de novos fármacos, afim de obter um tratamento mais efetivo, com uma menor toxicidade.

O alcaloide amida piperina (amida piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(E)-4(E)-pentadienoico) foi isolado originalmente de frutos da pimenta preta (*Piper nigrum* Linn) e pimenta longa (*Piper longum* Linn) (GREENSHIELDSA et al., 2014; MADHAVI et al., 2009; MEGHWAL; GOSWAMI, 2013) e apresenta potente atividade antitumoral *in vitro* (FOFARIA et al., 2014; YAFFE et al., 2014) e *in vivo* (BEZERRA et al., 2006; LAI et al., 2012). No entanto, a piperina apresenta alta toxicidade aguda em roedores, caracterizada principalmente por hepatotoxicidade (BEZZERA et al., 2006).

Assim, com o objetivo de maximizar os efeitos farmacológicos e minimizar a toxicidade, foram sintetizados três diferentes análogos da piperina, o 2-oxo-2-fenilamina-piperinoato de etila (HE-01), o 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato

de etila (HE-02) e o 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila (HE-03). Os primeiros ensaios mostraram que o análogo HE-03 apresenta potente atividade antitumoral em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich, e baixa toxicidade aguda, apesar de induzir alterações associadas a fraca hepatotoxicidade.

Continuando as pesquisas com os análogos da piperina, o presente trabalho se propôs a investigar a atividade antitumoral e possíveis mecanismos de ação do HE-02 relacionados ao ciclo celular, angiogênese e microambiente tumoral, além de avaliar a sua toxicidade.

Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

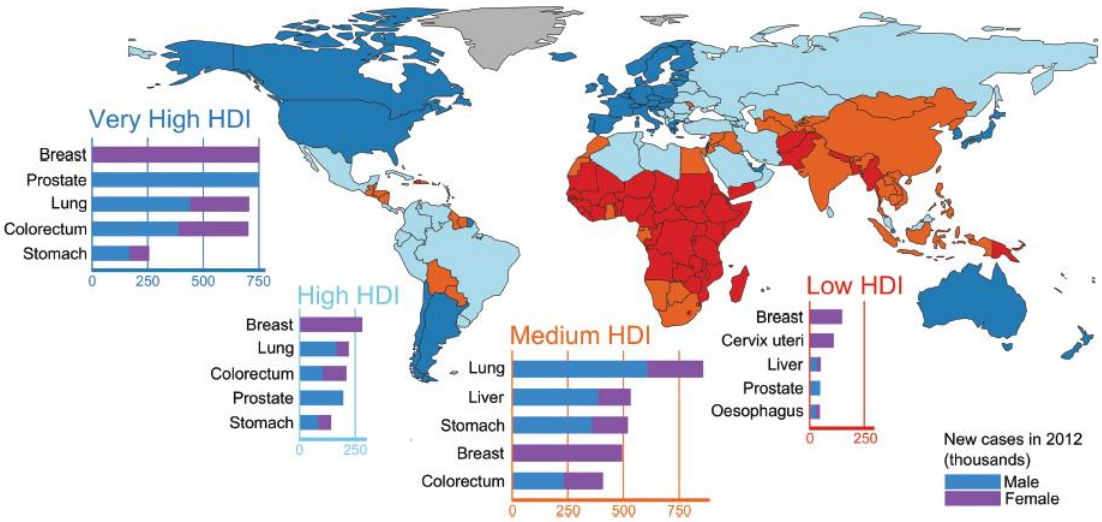
2.1 Aspectos gerais do câncer

As neoplasias são caracterizadas, de forma geral, por uma proliferação anormal do tecido, o que culmina com a formação dos tumores. Caracterizam-se por crescimento e padrões de diferenciação alterados, podendo ser classificadas em neoplasias benignas, quando acometem um órgão específico, são não invasivas e reproduzem o aspecto das células do tecido que lhes deu origem, ou neoplasias malignas (câncer), nas quais as células apresentam pouca semelhança com as células que as originaram, e possuem a capacidade de invasão dos tecidos vizinhos, determinando a formação de metástases (ROBINS; COTRAN, 2010).

O câncer é classificado de acordo com a célula normal que o originou. Para fins de classificação primária, os tipos de tumores são ordenados nos seguintes grupos: Carcinomas, que se referem a neoplasias malignas de origem epitelial; Sarcomas, que são tumores de tecido conjuntivo que incluem ossos, cartilagens, tendões e tecido fibroso; Linfomas, que se desenvolvem nas glândulas e nódulos do sistema linfático; Leucemias, tumores da medula óssea que afetam as células das linhagens mieloide e/ou linfoide; e Mielomas, tumores originários de plasmócitos, que são células produtoras de imunoglobulinas. Ainda, alguns tumores podem se desenvolver na medula espinhal ou no cérebro, o tipo de tumor cerebral mais comum é aquele que se desenvolve a partir das células da glia, que são chamados de gliomas (ALMEIDA et al., 2005; *Nacional Cancer Institute*, 2017; *Cancer Research UK*, 2017).

Em uma escala global, a melhoria das condições socioeconômicas está associada ao aumento do risco de câncer por meio do aumento do consumo de tabaco e uso de bebidas alcoólicas, mudanças na dieta, com ingestão elevada de gordura e açúcar, além da diminuição de atividade física (STEWART et al., 2016). A figura 1 mostra os cinco tipos de câncer mais comuns no mundo, de acordo com o índice de desenvolvimento humano (IDH).

Figura 1. Os cinco tipos de câncer mais comuns em 2012 de acordo com o índice de desenvolvimento humano (IDH). Os níveis de desenvolvimento social foram divididos em quatro perfis: IDH baixo (<0,530); IDH médio (0,530≤ IDH <0,710); IDH alto (0,710 ≤ IDH < 0,800) e muito alto (IDH ≥ 0,800).



Fonte: Extraído de UNDP, 2013.

**United Nations Development Programme* (UNDP)

Dados do projeto Globocan/Iarc (*International Agency for Research on Cancer*), apontaram que, dos 14 milhões de casos detectados em 2012, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Para a mortalidade, a situação agrava-se quando se constata que, dos oito milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram em mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (IARC, 2012).

No Brasil, para o biênio 2016-2017, aponta-se a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) e mama (58 mil) serão os mais frequentes. A figura 2 mostra a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil para o biênio 2016-2017 (INCA, 2016).

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2016-2017 por gênero, exceto pele não melanoma (INCA, 2016).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

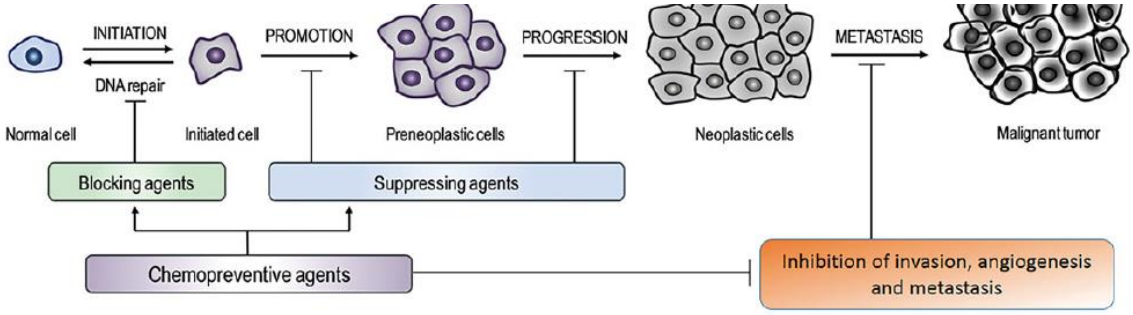
*FONTE: Instituto Nacional de Câncer, 2016

A carcinogênese é reconhecida como um processo de múltiplos passos, que produzem três diferentes estágios: iniciação, promoção e progressão (VINCENT; GATENBY, 2008). A iniciação envolve a alteração ou a mutação de genes que ocorre de forma espontânea ou induzida por exposição a um agente carcinogênico. As alterações genéticas podem resultar em desregulação de vias de sinalização bioquímica associadas com a proliferação celular, sobrevivência, diferenciação, e morte celular (SIDDIQUI et al., 2015).

A fase de promoção é considerada um processo relativamente longo e reversível, em que as células neoplásicas se proliferam ativamente e acumulam-se. Nesta fase, as vias intrínsecas impulsionadas pela ativação de proto-oncogenes tanto em células pré-neoplásicas quanto em células neoplásicas recrutam células inflamatórias que acabam acelerando a fase de promoção e progressão tumoral (SMITH et al., 2016).

A progressão é a fase entre uma lesão pré-maligna e o desenvolvimento de câncer invasivo, é a fase final da transformação neoplásica, onde ocorrem alterações genéticas e fenotípicas, e a hiperproliferação celular. Isto envolve um aumento rápido no tamanho do tumor, no qual as células podem sofrer novas mutações com potencial invasivo e metastático. A metástase envolve a propagação das células tumorais do local primário para outras partes do corpo por meio da corrente sanguínea ou do sistema linfático (Figura 3) (SIDDIQUI et al., 2015).

Figura 3. Estágios para formação do tumor. Fonte: Extraído de SIDDIQUI et al., 2015.



Sendo assim, o princípio da carcinogênese induzida ou de ocorrência natural é que promotores tumorais e a indução de mutações oncogênicas levam à proliferação destas células oncogeneticamente iniciadas ou levam à expansão de uma população de células que já tenha sido alvo de agentes cancerígenos (KARIN et al., 2016).

Logo, a prevenção do câncer primário é conseguida por meio da redução da exposição a agentes cancerígenos reconhecidos e/ou aumento da promoção da saúde, ao passo que a prevenção secundária é exemplificada pela triagem, detecção precoce e quimioprevenção (STEWART et al., 2016).

As modalidades primárias básicas no tratamento do câncer envolvem cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A quimioterapia é considerada a modalidade mais comum no tratamento antineoplásico e sua ação se dá por meio da utilização de compostos químicos, chamados de quimioterápicos antineoplásicos. Esses fármacos podem ser utilizados isoladamente ou de forma combinada para a realização da quimioterapia. De acordo com o tipo, a dose, a duração e a frequência do tratamento, muitos efeitos adversos podem ser observados no organismo (JESUS et al., 2016).

Isso é consequência do fato que a maioria destas substâncias não possui especificidade, ou seja, não destrói seletiva e exclusivamente as células tumorais. Os tecidos formados por células de rápida proliferação, por apresentarem semelhança às células neoplásicas - alta atividade mitótica e ciclos celulares curtos - representam os principais alvos da toxicidade quimioterápica (CLEATOR; PARTON; DOWSETT, 2002). Em geral, os efeitos adversos podem se apresentar como agudos ou tardios, de acordo com o

período em que ocorrem. Os efeitos adversos agudos ocorrem durante a quimioterapia e acometem tecidos com alta taxa de renovação celular, como a mucosa bucal. Já os efeitos adversos tardios podem apresentar-se meses ou anos após o tratamento, sendo observados em tecidos e órgãos de maior especificidade celular (JESUS et al., 2016).

Atualmente, as principais classes de quimioterápicos são: os agentes alquilantes, onde se encontram as mostardas nitrogenadas (ciclofosfamida, ifosfamida); os derivados da metilidrazina (Porcarbazina), aquil sulfonato (bussulfano), nitrosureias (carmustina), triazenos (Dacarbazina); e os complexos de coordenação da platina (cisplatina e carboplatina). Os agentes alquilantes alquilam aminas reativas, oxigênio e fosfato do DNA, sendo assim, o processo de morte está diretamente ligado à lesão direta do DNA (ALMEIDA et al., 2005).

Os agentes antimetabólitos, que atuam em geral inibindo a síntese de DNA, são outra classe importante de quimioterápicos e estão subdivididos nos grupos de agentes análogos do ácido fólico (metotrexato), análogos da pirimidina (5-fluoruracila) e análogos das purinas (6-mercaptopurina) (ALMEIDA et al., 2005).

Há ainda uma classe importante de quimioterápicos, o grupo de hormônios e seus antagonistas, como os estrogênios (dietilestilbestrol, etinilestradiol), os antiestrogênios (tamoxifeno), inibidores da aromatase (anastrazol) (LEAL et al., 2010), androgênios (propionato de testosterona), antiandrogênios (bicalutamida) e os análogos do hormônio de liberação de gonadotrofina (leuprolina). O crescimento de vários tipos de câncer depende da presença de hormônios ou é regulado por eles. Essas moléculas interrompem o eixo estimulador criado por reservatórios sistêmicos de androgênios e estrogênios, inibem a produção de hormônios ou a ligação a seus receptores e, por fim, bloqueiam a complexa expressão de genes que promovem o crescimento e sobrevida dos tumores (TONON; SCHOFFEN, 2009).

Com relação aos derivados de produtos naturais, podem ser citados os alcaloides da vinca (vimblastina, vincristina e vinorelbina) que se ligam às β-tubulinas impedindo sua polimerização; os taxanos (paclitaxel e docetaxel) que, diferente dos alcaloides da vinca, se ligam a um sítio diferente das β-tubulinas promovendo sua polimerização e inibindo a despolimerização; além das epipodofilotoxinas (etoposídeo, teniposídeo), camptotecinas (topotecano,

irinotecano), antibióticos citotóxicos (doxorrubicina), equinocandinas (yondelis), antracenediona (mitoxantrona) e enzimas (mitomicina C e L-asparaginase) (DEMAIN; VAISHNAV, 2011).

Além desses, há agentes diversos como hidróxiureia, agentes de diferenciação (tretinoína), inibidores de tirosinacinase (imatinibe, desatinibe), inibidores de proteassoma (bortezomibe), modificadores da resposta biológica (interferon-alfa), imunomoduladores (talidomida) e inibidores do m-TOR (ALMEIDA et al., 2005).

Por fim, uma classe importante da terapia antineoplásica é formada pelos anticorpos monoclonais (rituximabe, alentuzumabe, trastuzumabe). Esses fármacos atuam nas células tumorais por meio de uma variedade de mecanismos como: citotoxicidade celular dependente de anticorpos, citotoxicidade dependente de complemento e ligação direta (YAMADA, 2010).

No câncer, as células tumorais compartilham várias características que as diferem das células normais, estas incluem: potencial ilimitado de proliferação, acompanhado de transformação metabólica; autossuficiência em sinais de crescimento e resistência aos mecanismos antiproliferativos e antiapoptóticos; aquisição de imortalidade replicativa; instabilidade do genoma e inflamação promotora de tumor. Além disso, para nutrição, oxigenação e crescimento dos tumores, há a formação de novos vasos (angiogênese), bem como os tumores desenvolvem a habilidade de escapar da detecção imunológica, e finalmente, invadir outros tecidos e produzir metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011; (VAJDIC; VAN LEEUWEN, 2009; TALMADGE; FIDLER, 2010).

2.1.1 Controle do ciclo celular

O ciclo celular é um conjunto de eventos organizados e monitorados, responsáveis pela adequada divisão celular. É um processo que exige uma alta quantidade de energia, além de uma adequada ordenação de eventos para garantir a duplicação correta e segregação do genoma. Esse processo envolve quatro fases que vão desde a quiescência (fase G0) à proliferação (fases G1, S, G2 e M) (DIAZ-MORALLI et al., 2013), que objetiva replicar o material genético e promover sua segregação cromossômica, garantindo assim que o DNA

duplicado seja distribuído igualmente às duas células filhas (NORBURY; NURSE, 1992; SHERR; BARTEK, 2016). A progressão ordenada entre estas fases é rigidamente controlada pelos 'checkpoints' e pela interação de várias ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs) associadas (MORGAN, 1997; FINN et al., 2016).

Pelo menos 12 *locus* genéticos separados são conhecidos para codificar as CDKs, as quais pertencem a uma família bem conservada de proteínas serina/treonina cinases. Esta família inclui três CDKs da interfase (CDK2, CDK4, CDK6), uma CDK mitótica (CDK1, anteriormente conhecida como CDC2), e uma série de CDKs reguladoras, tais como CDK7, um componente complexo das CDKs de ativação e de transcrição (CDK8, CDK9) (CANAVESE et al., 2012; FINN et al., 2016). As CDKs contêm um núcleo catalítico específico para serina/treonina, e associam-se às subunidades reguladoras conhecidas como ciclinas, que controlam a atividade cinase e a especificidade ao substrato das CDKs. A ativação de um complexo ciclina/CDK está envolvida na progressão do ciclo celular (LIM; KALDIS, 2013).

Tipicamente, a repressão da progressão do ciclo celular é mantida por fatores de transcrição da família E2F, pelo produto do gene do retinoblastoma (pRb), e outras proteínas, como p107 e p130 (BERTOLI et al., 2013). O E2F regula positivamente um conjunto de genes cujas atividades são necessárias para a progressão do ciclo celular e a síntese de DNA cromossômico (CHEN et al., 2009).

Ao iniciar o ciclo celular, as células no estado de repouso começam a sintetizar a ciclina D1 em resposta a sinais mitogênicos e de adesão (FINN et al., 2016). A progressão para a fase G1 é inicialmente controlada por uma ou mais ciclinas do tipo D (D1, D2 ou D3) regulada por mitógeno que montam combinatoriamente com CDK4 ou CDK6, enquanto a ciclina E-CDK2 age mais tardiamente, próximo à transição G1/S (Figura 4) (VAITES et al., 2011; SHERR; BARTEK, 2016). Além disso, a ciclina D1 coordena a bioenergética mitocondrial na progressão para G1 (WANG et al., 2014).

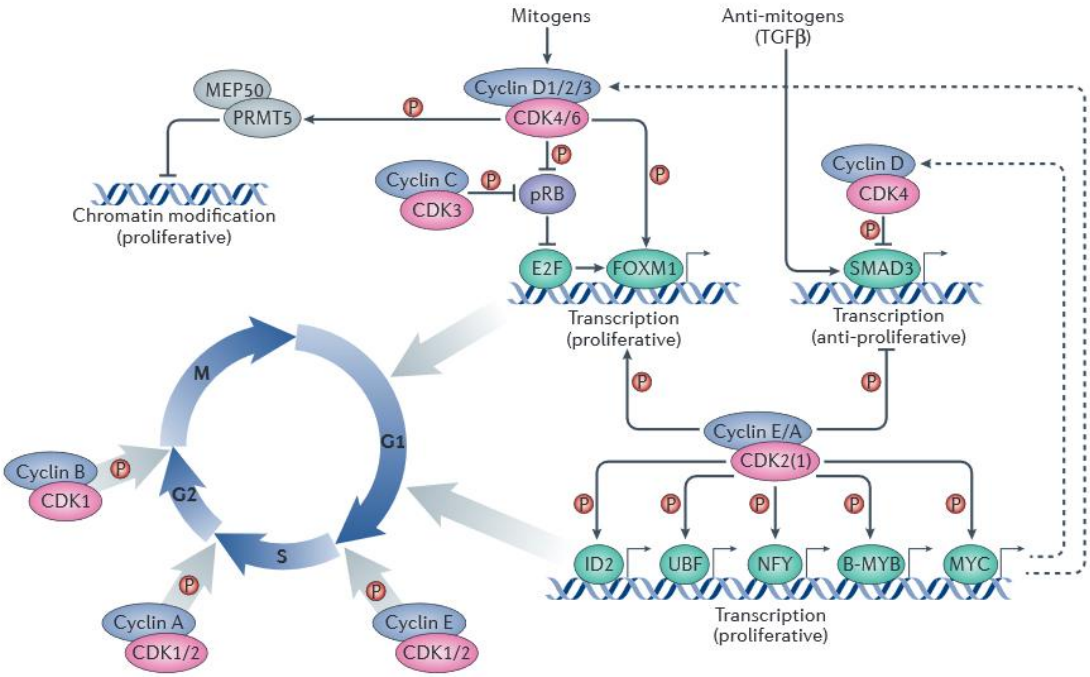
Então, a ciclina D1 passa a formar complexos de ativação com CDK4/CDK6, que, em seguida, iniciam a fosforilação de pRb. O processo de fosforilação mediada pelo complexo ciclina D1:CDK4/6 leva à repressão

transcricional da pRb, levando à diminuição da captura dos fatores de transcrição da família E2F, resultando na transcrição de genes alvo específicos da fase S. Um destes genes codifica ciclina E, que controla a formação de mitocôndrias com alta carga de energia na transição G1/S (WANG et al., 2014) e que se associa com CDK2 e fosforila mais a pRb, bem como outros mediadores chave do ponto de verificação da fase G1/S (DONCIC et al., 2011). Este processo cria um *feedback* positivo levando a uma transição irreversível G1-S (o chamado "ponto de restrição"), assim levando o ciclo celular a continuar de uma forma independente do mitógeno (SKOTHEIM et al., 2008; DONCIC et al., 2011).

Na fase S tardia, a CDK2 é ainda ativada pela ciclina A2, permitindo a transição da fase S para a fase G2. Por último, CDK1 é ativada por um tipo de ciclina A no final da interfase para facilitar o início da mitose. Após a decomposição do envelope nuclear as ciclinas do tipo A são degradadas, facilitando a formação dos complexos CDK1-Ciclina B, que são responsáveis pela condução das células através da mitose (MALUMBRES et al., 2009).

Duas grandes transições são necessárias para que ocorra a divisão celular: a transição G2/M e a transição metáfase/anáfase. Estas são regulados pela CDK1 e o complexo de promoção da anáfase (APC, uma ubiquitina-ligase E3), respectivamente (MURRAY; HUNT, 1993; NURSE, 2000; MORGAN, 2006; RHIND; RUSSELL, 2012). Durante a fase G2, a CDK1 é mantida a um baixo nível de atividade, sendo sua ativação necessária e suficiente para desencadear a entrada na mitose. Assim, a ativação de CDK1 é o ponto focal de muitas vias de sinalização que controlam a divisão celular. Estas vias têm efeitos positivos, tais como a ativação de CDK1 quando a célula atingir um tamanho crítico, e efeitos negativos, tais como atrasar a ativação de CDK1 na presença de danos ao DNA (RHIND; RUSSELL, 2012). Através de sua localização citoplasmática, nuclear e centrossomal, o complexo B1/CDK1 é capaz de sincronizar diferentes eventos, como desagregação do envelope nuclear e separação dos centrômeros (WANG et al., 2014).

Figura 4. Papel clássico das ciclinas e cinases dependentes de ciclinas na progressão do ciclo celular.



A progressão do ciclo celular é conduzida por complexos heterodiméricos formados por ciclina D, ciclina E, ciclina A ou ciclina B com cinase dependente de ciclina 4 (CDK4), CDK6, CDK2 ou CDK1. A entrada no ciclo celular é conduzida pela formação de complexos de ciclina D-CDK4/6 em resposta à estimulação miogênica. Estes complexos fosforilam e inativam parcialmente pRB, liberando assim a sua inibição dos fatores de transcrição de E2F. Os E2Fs subsequentemente promovem a expressão de múltiplos genes do ciclo celular, entre os quais aqueles que codificam ciclinas do tipo E, que se ligam e ativam CDK2 (e, em menor extensão, CDK1). A ativação de CDK2 (e CDK1) por Tipo E e A-(ID2), bem como o fator de ligação a montante (UBF), o fator nuclear Y (NFY), o fator B de ligação B- MYB e MYC, que contribuem para a progressão do ciclo celular em diferentes níveis. Os complexos ciclina D1-CDK4 também fosforilam modificadores de cromatina, tais como a proteína Arg N-metiltransferase 5 (PRMT5), o co-fator metilosoma proteína 50 (MEP50) para promover a repressão de genes específicos com propriedades antiproliferativas. Vários complexos de ciclina-CDK podem fosforilar o fator de transcrição SMAD3, que é ativado por antimitogênios, tais como o fator transformador do crescimento β (TGFβ) e a proteína FOXM1, para promover a progressão do ciclo celular. A entrada na mitose é especificamente conduzida por complexos de ciclina B-CDK1. As setas tracejadas indicam conexões indiretas ou conexões com várias etapas. Fonte: HYDBRING et al., 2016.

Como foi descrito acima, a progressão do ciclo celular é regulada por diferentes mecanismos. Isso permite o início, a progressão e a conclusão do ciclo celular (UHLMANN et al., 2011). Dado que a principal característica da célula tumoral seja a proliferação descontrolada, não é surpreendente que os principais intervenientes dos mecanismos acima citados estejam alterados (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A superexpressão de CDKs e ciclinas, e a perda de expressão de pRB são frequentemente observadas em neoplasias humanas. Essas modificações

associadas a tumores resultam normalmente de alterações cromossômicas ou da inativação epigenética. As CDKs desreguladas podem induzir sinalização mitogênica constitutiva e respostas defeituosas aos sinais antimitóticos, assim levando à proliferação não programada e instabilidade genômica e cromossômica (MALUMBRES; BARBACID, 2009). A maioria dos tumores humanos apresentam defeitos no controle da transição G1 para S. Consequentemente, as CDKs envolvidas nessa transição, as CDK 4, 6 e 2 estão alteradas em mais de 80 a 90% dos tumores (DIAS-MORALLI et al., 2013).

O conhecimento estrutural das CDKs permitiu o desenvolvimento de inibidores com potenciais efeitos terapêuticos (DIAS-MORALLI et al., 2013). Um inibidor potente de CDK é o flavopirodol, que apresenta atividade antitumoral contra várias linhagens de tumores, atuando por meio de sua atividade citotóxica, levando à parada do ciclo celular e apoptose (CETINTAS et al., 2016). Além disso, vários trabalhos recentes mostram a busca por novos inibidores de CDKs que apresentem efeito antitumoral, dentre eles os inibidores reversíveis e seletivos para a CDK 4/6, o Palbociclib (FINN et al., 2014), o abemaciclibe e LEE011 (MAYER, 2015).

2.1.2 Angiogênese tumoral

Em 1787, Hunter usou o termo angiogênese para descrever a formação de vasos sanguíneos semelhantes a galhos de árvores. Na angiogênese, após a formação dos grandes vasos, ocorre ramificação e distribuição dos mesmos formando uma rede vascular complexa (OLIVEIRA et al., 2010). Sendo assim, a angiogênese é a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes (KRALICHOVA; VETVICKA, 2016), caracterizando-se como processo chave de várias doenças, incluindo retinopatia diabética proliferativa, aterosclerose, artrite reumatoide e câncer (WANG et al., 2013).

A angiogênese tumoral é um dos marcadores da progressão tumoral e é essencial para invasividade e metástase (VORONOV et al., 2014). Ela é necessária para o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes, para a remoção de produtos do metabolismo celular, além de favorecer a migração de células tumorais em grandes distâncias, o que produz as metástases (FIGG,

2008; POTENTE et al., 2011; TAHERGORABI; KHAZAI, 2011). Em tumores, a angiogênese não atinge a resolução após o estabelecimento da perfusão vascular, assim sendo, a cascata angiogênica patológica é persistente e torna-se impulsionada pela condição patológica (CHUNG; FERRARA, 2011).

Nesse sentido, quando um tumor atinge de 1 a 2 mm de diâmetro e quando a demanda de oxigênio e nutrientes é insuficiente no local, estabelece-se um microambiente de hipóxia, que coopera junto com eventos oncogênicos para promover a angiogênese. Esse processo de hipóxia é impulsionado principalmente pelo Fator Induzido pela Hipóxia (HIF) (DAYAN et al., 2008), que é capaz de induzir a expressão de mediadores pró-angiogênicos, incluindo o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), as angiopoietinas-1 e 2, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos básicos (bFGF) e a proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1), para iniciar o processo de angiogênese (KROCK et al., 2011; CHUNG; FERRARA, 2011).

Quando estes fatores de crescimento se ligam aos seus receptores específicos localizados nas células endoteliais dos vasos sanguíneos pré-existentes, são ativadas várias vias de transdução de sinal para a ativação das células endoteliais (NIU; CHEN, 2010). Por outro lado, fatores antiangiogênicos podem ser ativados com o objetivo de inibir esse processo. Dentre os fatores antiangiogênicos, podem ser citados o interferon, interleucinas, inibidores de metaloproteinases da matriz (MMPs), angiostatina e endostatina. Nesse sentido, o determinante inicial para o processo angiogênico parece ser o desequilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos (CASTAÑEDA-GILL, 2016).

O processo de formação de novos vasos é mediado por intussuscepção ou por brotamento. Na intussuscepção, o excesso de estresse de cisalhamento microvascular, promove a divisão longitudinal de um único vaso em dois novos vasos sanguíneos; já a formação por brotamento ocorre a partir da hipóxia tecidual, levando a uma degradação proteolítica da matriz extracelular, seguida de atração quimiotática e proliferação de progenitores endoteliais e células endoteliais circulantes. As células endoteliais então se reorganizam formando a luz do vaso e logo em seguida terminam sua maturação funcional (OLIVEIRA et al., 2010; TAHERGORABI; KHAZAEI, 2012).

Os vasos tumorais são marcadamente distintos da vasculatura normal, uma vez que os vasos sanguíneos do tecido tumoral são de tamanhos irregulares e são dispostos de forma desorganizada, além de partilharem características de arteríolas, capilares e vênulas simultaneamente (CASTAÑEDA-GILL; VISHWANATHA, 2016).

No câncer, o processo de angiogênese é considerado um marcador do desenvolvimento tumoral, representando, portanto, um importante alvo terapêutico. Atualmente, é bem caracterizada a alta expressão de VEGF em tumores, o que define seu papel central na formação de novos vasos para o desenvolvimento do câncer (WELTI et al., 2016).

Alguns compostos antiangiogênicos estão disponíveis para o tratamento de tumores sólidos, como o bevacizumabe, que é um anticorpo monoclonal humanizado IgG1 que tem como alvo o VEGF-A. A inibição do VEGF-A bloqueia a angiogênese e limita o suprimento de sangue para o tumor, diminuindo ou interrompendo seu crescimento (OLDHAM; DILMAN, 2008; ISSAAD et al., 2016).

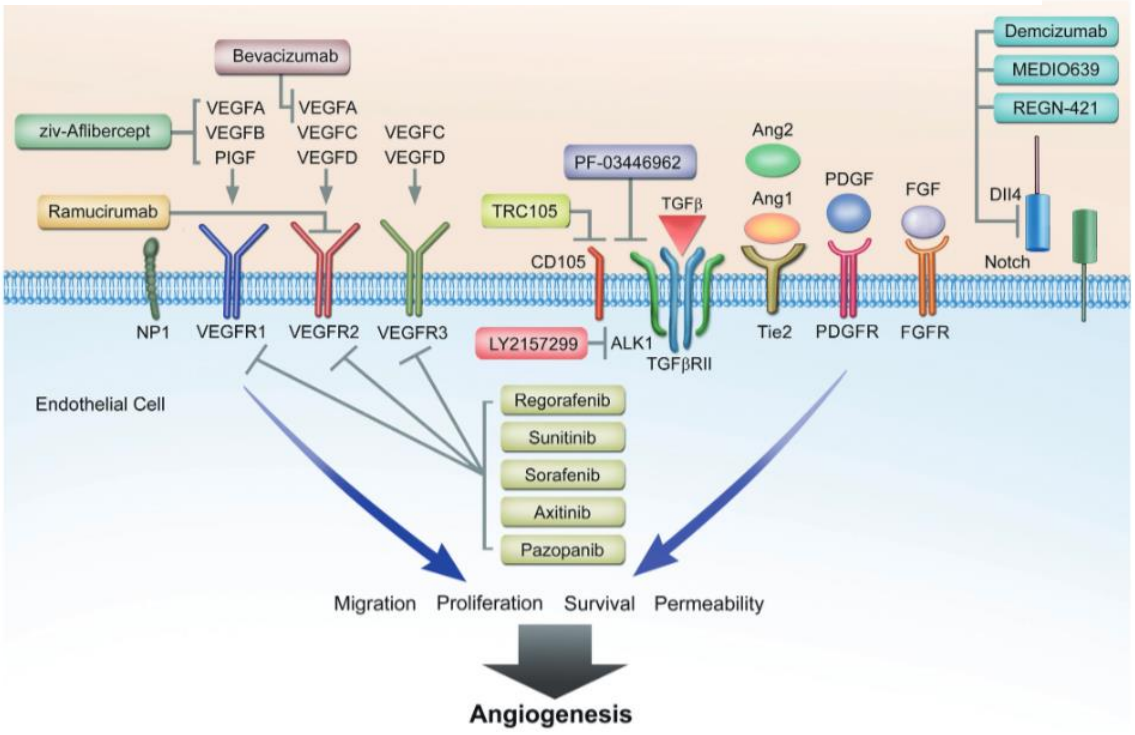
A terapia antiangiogênica pode ser classificada com base em seus alvos. Por exemplo, os inibidores da angiogênese podem atuar diretamente sobre as células endoteliais (ECs) e inibir a sua capacidade para proliferar, migrar, sobreviver e formar novos vasos. Outros inibidores perturbam a produção de fatores angiogênicos ou vias de sinalização de angiogênese (JAIN, 2013).

Os inibidores endógenos da angiogênese têm sido explorados como agentes antiangiogênicos adequados e muitos destes inibidores têm como alvo as células endoteliais. Um desses compostos é a endostatina, que inibe a migração e proliferação das células endoteliais. Embora o mecanismo de ação não seja completamente compreendido, a ação antiangiogênica da endostatina é mediada em parte pela sua ligação às integrinas (FINLEY et al., 2015). Outras classes de inibidores da angiogênese bloqueiam a neovascularização, tendo como alvo as vias de sinalização de numerosos fatores, incluindo VEGF, EGF (Fator de crescimento epidérmico), PDGF, angiopoietinas, IGF (Fator de crescimento semelhante a insulina), FGF (Fator de crescimento de fibroblastos), TSP1 (trombospondina), DLL4 (Ligante semelhante ao Delta 4)/*Notch* e

sinalização HGF (Fator de crescimento de hepatócitos/c-Met) (FINLEY et al., 2015).

As principais classes de agentes antiangiogênicos são: os anticorpos monoclonais anti-VEGF que têm como alvo o VEGF ou o seu receptor; os inibidores de tirosina-cinase (TKI); e os inibidores da proliferação de células endoteliais, como descritos na Figura 5.

Figura 5. Atuação dos principais agentes antiangiogênicos. FONTE: CLARKE & HURWITZ, 2013.



Mecanismos de resistência a terapias antiangiogênicas podem ser categorizados em grande parte pelo envolvimento dos eixos VEGF, células estromais e vias não-VEGF. Estes mecanismos dependem de uma série de fatores de sinalização parácrinos distintos e inter-relacionados e de cascatas intracelulares. As abordagens clínicas que visam vias múltiplas envolvendo VEGFC, VEGFD, Tie2-Ang2, Dll4-Notch e TGF-β podem ter maior benefício do que as monoterapias bloqueando a sinalização do VEGFA ou do VEGFR2 isoladamente, por exemplo. Inúmeros ensaios clínicos estão em curso para avaliar terapias específicas com especificidade para estes mecanismos de resistência (CLARKE; HURWITZ, 2013). Atualmente, em virtude do desenvolvimento de resistência aos antiangiogênicos, o uso de terapia de

combinação incluindo agentes antiangiogênicos e fármacos citotóxicos tem predominado como escolha no tratamento de alguns tipos de câncer (JAIN, 2014; KIEUHOA et al., 2016).

2.1.3 Microambiente tumoral

O microambiente tumoral é o local de desenvolvimento do tumor, formado não só por células neoplásicas, mas também por células do estroma, que incluem células do endotélio vascular e linfático, pericitos, fibroblastos, miofibroblastos e também várias células derivadas da medula óssea, como macrófagos e neutrófilos (HANAHAN; COUSSENS, 2012). Neste microambiente também são encontrados outros elementos, tais como, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e nutrientes que podem igualmente favorecer alterações fenotípicas das células tumorais (WEINSTEIN; STORKUS, 2015).

Normalmente, o microambiente que envolve o tumor fornece sinais de supressão tumoral, desde que a arquitetura da homeostase do tecido seja essencialmente controlada. No entanto, uma vez que a homeostase dos tecidos é perdida, esse microambiente alterado passa a ser um promotor potente do tumor (BISSEL; HINES, 2011).

O microambiente tumoral pode ser subdividido em: microambiente químico e microambiente celular. O microambiente químico engloba o pH do meio, a pressão parcial de O_2 (pO_2) e as concentrações de moléculas pequenas (como o óxido nítrico) e metabólitos (como a glicose e o lactato). Este microambiente reduz a oferta de O_2 que exerce efeitos importantes sobre o microambiente celular com profundas consequências para progressão do tumor, levando à aquisição de propriedades invasivas e metastáticas. De fato, a hipóxia intratumoral é um estímulo patológico que impulsiona mudanças na expressão gênica, o que leva a mudanças na sinalização celular (SEMENZA, 2016).

Já no microambiente celular estão incluídas as células tumorais, as células do estroma e a matriz extracelular produzida por estas células. Uma premissa que está sendo cada vez mais aceita é que as células cancerígenas não manifestam a doença separadamente, mas que recrutam e corrompem diversos

tipos celulares. Essas interações colaborativas entre as células neoplásicas e seu estroma de suporte se coalescem nas estruturas ectópicas, que são cronicamente proliferativas e muitas vezes disseminadoras. Assim, nas últimas décadas, o microambiente tumoral e suas células constituintes do estroma têm assumido grande destaque no contexto do conhecimento da biologia do câncer (HANAHAN; COUSSENS, 2012).

Uma vez que o tumor é formado, ele não só modifica o estroma drasticamente, como também inicia uma resposta inflamatória e imune complexa, na qual células inflamatórias são recrutadas em resposta a sinais provenientes deste microambiente, e que é, pelo menos parcialmente, responsável pela sua progressão (BISSEL; HINES, 2011).

A primeira proposição documentada de uma associação entre inflamação e câncer foi atribuída ao patologista alemão Rudolf Virchow, em meados do século XIX. Essa hipótese era baseada na detecção de infiltrados inflamatórios em neoplasias malignas sólidas, levando ao reconhecimento da inflamação como uma das características chave (*hallmark*) do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

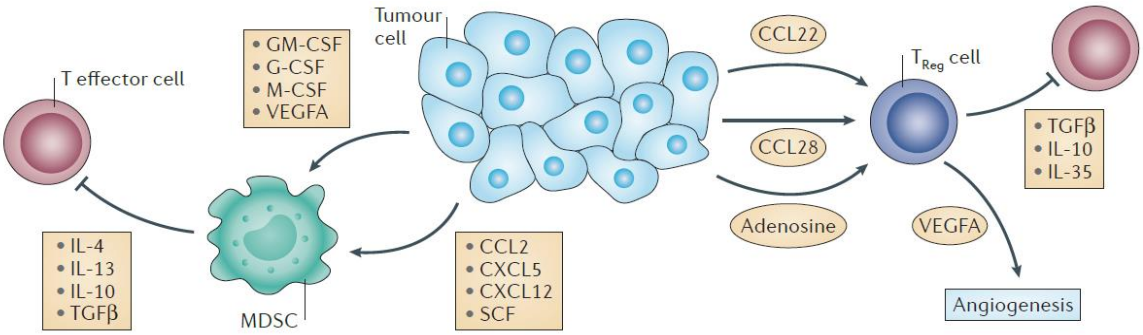
A inflamação pode ser definida como uma resposta fisiopatológica de uma lesão tecidual, que pode ser causada por uma lesão estéril ou uma infecção, em que o sistema imune tenta eliminar ou neutralizar estímulos prejudiciais e inicia processos de regeneração e cicatrização (SHALAPOUR; KARIN, 2015). Embora seja um mecanismo de defesa, os eventos complexos e os mediadores envolvidos na reação inflamatória podem agravar diversas doenças (SAHA et al., 2009; PATRA et al., 2016).

Nesse contexto, sabe-se que mediadores inflamatórios e fatores de crescimento estão envolvidos em todas as fases do desenvolvimento do tumor por meio de múltiplos mecanismos, que incluem indução de proliferação e resistência à apoptose, indução de mutações no DNA, promoção da angiogênese, invasão e metástase. Isso é corroborado por diversos estudos que demonstram a associação de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) com a redução da incidência de câncer colorretal, de mama, bexiga, próstata e pulmão (FERNANDES et al., 2015).

Então, células e mediadores inflamatórios no microambiente tumoral coordenam um ambiente de respostas pró-inflamatórias, que podem agir de forma autócrina e/ou parácrina em células malignas e não malignas. Além disso, o infiltrado de células imunes no tumor pode ter um papel duplo, podendo levar a uma resposta antitumoral, ou à promoção ativa de tumorigênese e inibição de uma resposta imunológica protetora (CRUSZ; BALKWILL, 2015).

As células tumorais interferem tanto no sistema imune inato, quanto no sistema adaptativo, e induzem macrófagos e neutrófilos para um estado de diferenciação do tipo 2, além de uma mudança de perfil de resposta de linfócitos Th1 (T *helper* 1) para Th2 (T *helper* 2). Essas células são capazes de interferir com cada passo da resposta inflamatória antitumoral, secretando mediadores que bloqueiam a função das células efetoras imunes e reprogramam essas células para um perfil regulatório, como demonstrado na Figura 6 (ELINAV et al., 2013). Nesse contexto, as células T regulatórias (Treg) suprimem a resposta imutária, e são consideradas como pró-tumorais (DUNN et al., 2004).

Figura 6. Influência das células tumorais sobre o processo inflamatório.



O tumor recruta células T regulatórias (Treg) e manipula suas funções. As quimiocinas CCL22 e CCL28 atraem células Treg que expressam receptores CCR4 e CCR10 no local de crescimento do tumor. Células Treg inibem as células efetoras através de secreção de mediadores e induzem angiogênese. As células tumorais também promovem a geração de células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC) por meio da liberação de fatores de crescimento e agentes quimiotáxicos. As MDSC suprimem as respostas de células T antitumorais pela liberação de citocinas como IL-4, IL-10, IL13 e fator transformador do crescimento (TGF-β)
Fonte: ELINAV et al., 2013.

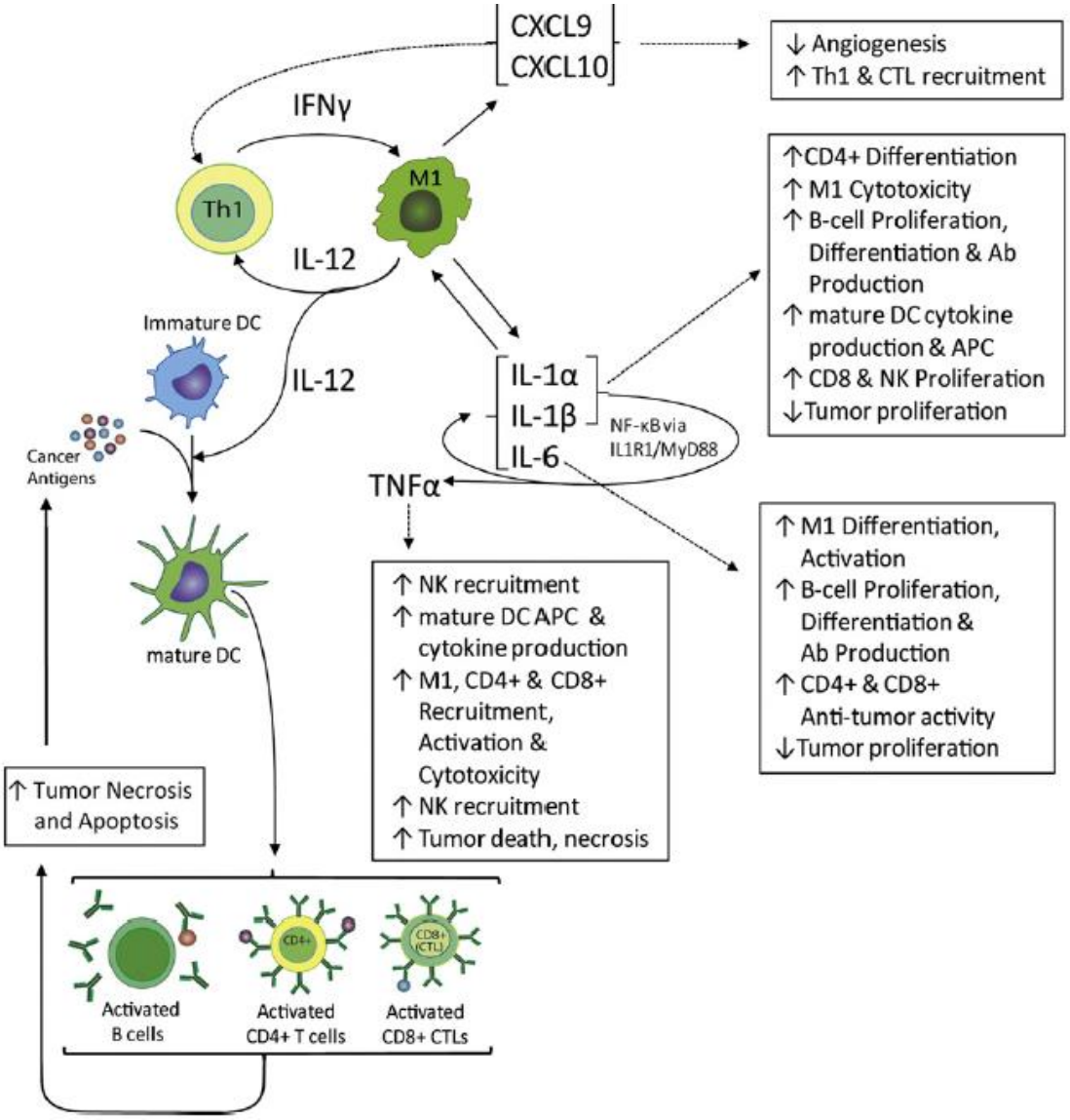
Por outro lado, foi sugerido por Paul Ehrlich, 50 anos após Virchow, que o sistema imunológico poderia combater tumores, uma sugestão reiterada pela hipótese de vigilância imunológica de Burnet e Thomas (BURNET, 1970; DUNN et al., 2004). As células tumorais apresentam antígenos “não-próprios”, o que

pode levar à apresentação antigênica. Assim, mesmo tumores em crescimento podem estar sujeitos à vigilância imunológica (DUNN et al., 2004; GRIVENNIKOV et al., 2010). Já é conhecida uma gama de células imunitárias "antitumorais", incluindo as células T auxiliar do tipo 1, linfócitos T $CD8^+$, células *Natural killer* (NK) e linfócitos T *Natural Killer* (NK-T), macrófagos de tipo 1, neutrófilos de tipo 1, eosinófilos e células dendrítricas (VERBEKE et al., 2011).

De acordo com a hipótese de imunovigilância, células NK e linfócitos T citotóxicos matam células tumorais por mecanismos de liberação de perforinas e granzimas B, e via receptores TRAIL (Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF) e Fas; e as células Th1, com a produção de IFN-γ, e em alguns casos Th17, com a produção de IL-17, promovendo um aumento da imunidade citotóxica (MARTIN-OROZCO et al., 2009). Outros componentes críticos deste sistema são as células dendrítricas e macrófagos, que apresentam antígenos e respondem a sinais de perigo e estresse, bem como moléculas imunorreguladoras e citotóxicas, como interferon gama (INF-γ), FasL, TRAIL, GM-CSF (Fator estimulador de colônias de Granulócitos e Macrófagos) e interleucina (IL)-12 (GRIVENNIKOV et al., 2010).

Um modelo dos efeitos das células Th1 e M1 resultando em inflamação antitumoral foi publicado por Haabeth e colaboradores em 2012. Eles descobriram que a inflamação supressora de tumores na resposta imune precoce é regulada por um número relativamente pequeno de citocinas, como demonstrado na Figura 7 (BURKHOLDER et al., 2014).

Figura 7. Modelo de inflamação supressora de tumor



A figura demonstra que os linfócitos Th1 e os macrófagos M1 são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias que promovem a vigilância imunológica e a citotoxicidade. A liberação de INF-γ por linfócitos Th1 resulta em recrutamento de macrófagos M1 e a manutenção desse fenótipo, enquanto a IL-12 produzida por macrófagos M1 recruta, ativa e mantém o fenótipo Th1. O TNF-α liberado, por meio da sinalização do NF-κB, ativa as funções de APC das células dendríticas, promove o seu recrutamento e de linfócitos T $CD4^+$, linfócitos $CD8^+$ e células NK, além de ativação citotóxica de macrófagos M1.

*Fonte: BURKHOLDER et al., 2014.

Considerando esse contexto do sistema imunológico como componente do microambiente tumoral, pode-se destacar vários mediadores inflamatórios cujas atividades em conjunto resultam na progressão tumoral, especialmente, citocinas e quimiocinas, que são liberadas tanto por células tumorais como por células do hospedeiro dentro do microambiente do tumor (ELINAV et al., 2013).

A IL-1 afeta células tanto da imunidade adaptativa, quanto da imunidade inata e exerce uma vasta atividade biológica, incluindo a indução de febre, vasodilatação, hematopoese, ativação de linfócitos, atração e extravasamento de leucócitos, angiogênese e síntese de anticorpos (GARLANDA et al., 2013), sendo um importante mediador patogênico da autoinflamação, autoimunidade, doenças infecciosas e degenerativas (SIMS; SMITH, 2010; GARLANDA et al., 2013). A IL-1 tem a capacidade de induzir a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e a liberação de quimiocinas, o que resulta no recrutamento de leucócitos, além disso, aumenta o tempo de vida e estimula a função efetora de neutrófilos e macrófagos (MANTOVANI et al., 2011; GARLANDA et al., 2013; VORONOV et al., 2014). A IL-1α e IL-1β são codificadas por genes distintos, ligam-se ao receptor IL1-R1 e apresentam propriedades biológicas similares. O precursor da IL-1α está presente constitutivamente em células epiteliais de todo trato gastrointestinal, pulmões, fígado, rins, células endoteliais e astrócitos. Após a morte celular por necrose, tal como ocorre em doenças isquêmicas e necrose tumoral, o precursor da IL-1α é liberado, o que inicia rapidamente uma cascata de citocinas inflamatórias e quimiocinas (RIDER et al., 2011). A IL-1α circulante é raramente encontrada, mas está contida em corpos apoptóticos produzidos a partir das células endoteliais (BERDA-HADDAD et al., 2011).

Em contraste, a IL-1β é produzida por células hematopoiéticas, tais como monócitos, macrófagos, células dendrítricas da pele e micróglia, em respostas aos *Toll-Like Receptors* (TRLs), componentes do sistema complemento e citocinas (tal como o Fator de Necrose Tumoral α, TNF- α) e da própria IL-1 (DINARELLO, 2011). Diferentemente do precursor da IL-1α, o precursor da IL-1β precisa ser clivado pela caspase-1, liberando assim a citocina ativa no meio extracelular (HOFFMAN et al., 2001; GARLANDA et al., 2013).

Na carcinogênese, a IL-1α e IL-1β apresentam diferenças entre si. Um estudo realizado por Krelin e colaboradores (2007) demonstrou que animais com deficiência de IL-1β desenvolvem tumores, quando comparados a animais deficientes de IL-1α ou do tipo selvagem (GARLANDA et al., 2013). A IL-1β, juntamente com o TNF-α, INF-γ e IL-18, tem função de ativar macrófagos e

neutrófilos para fagocitose e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NETEA et al., 2010).

A IL-1β juntamente com o TNF-α induzem a expressão de genes pró-inflamatórios em células inflamatórias e do estroma, levando a uma cascata de sinalização no local da inflamação, o que culmina com a iniciação, propagação e sustentação da inflamação. A IL-1 é um forte ativador de células endoteliais, e induz profundas mudanças na expressão gênica e função dessas células, assim participando ativamente das reações inflamatórias, imunológicas e de formação de novos vasos (VORONOV et al., 2014). Devido a isso, a IL-1 tem grande participação na angiogênese e invasividade. A IL-1α pode estimular a expressão de moléculas de adesão (ICAM, VCAM e E-selectina) nas células endoteliais, levando assim a uma maior interação das células tumorais com o endotélio, facilitando a invasão metastática (ZITVOGEL et al., 2012). Enquanto a IL-1β regula a expressão de VEGF e de seus receptores nas células endoteliais (VORONOV et al., 2014).

O TNF-α, uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, tem papel essencial na patogênese da resposta inflamatória aguda (PHUMEETHAM et al., 2012). TNF-α, que pertence a um grupo de citocinas pleiotrópicas, foi inicialmente identificado e designado pela sua capacidade para matar células tumorais, sendo atualmente considerado um fator chave na regulação de numerosos processos fisiológicos e patológicos tais como inflamação, autoimunidade e neurodegeneração (CHEN et al., 2016). A superfamília de receptores do TNF pode ser classificada em duas categorias: os que possuem um domínio de morte intracelular (DD) e os que não apresentam esse domínio (AGGARWAL et al., 2012).

Seis diferentes receptores foram encontrados: DR1, também chamado de TNFR1; DR2, que é chamado de Fas; DR3, no qual se liga o Inibidor celular do crescimento dos vasos (VEGI); EDA-A1, EDA-A2 e GITRL (AGGARWAL et al., 2012). O TNFR1 é ativado tanto pelo TNF solúvel, quanto pelo TNF transmembranar. O domínio de morte desse receptor recruta a proteína adaptadora TRADD, levando à montagem do complexo I, que promove a ativação do fator nuclear *kappa* B (NF-κB) e de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). O complexo I induz inflamação, degeneração tissular,

sobrevivência e proliferação celular, e orquestra a defesa imune contra agentes patogênicos. Entretanto, a formação do complexo IIa e IIb resulta em apoptose, e o complexo IIc induz necroptose e inflamação (KALLIOLIAS; IVASHKIV et al., 2016). O TNF-α atua sobre os dois receptores já mencionados, sendo que sua atividade para o receptor TNFR-2 é cinco vezes maior do que o receptor TNFR1, no entanto, o TNFR1 inicia a maioria das respostas biológicas do TNF-α. O TNFR1 (p60) está expresso em todos os tipos celulares, e o TNFR2 (p80) tem confinada sua expressão principalmente para as células imunitárias (AGGARWAL et al., 2003; HORSSEN et al., 2006).

Nesse sentido, o TNF é considerado uma citocina pleiotrópica que provoca necrose e apoptose das células tumorais. No entanto, dados da literatura mostram que esta citocina emergiu também como um importante fator de risco para tumorigênese, progressão tumoral, invasão e metástase (CHU, 2013).

No contexto do microambiente tumoral podem ainda ser caracterizados outros componentes chave da resposta inflamatória, o que inclui o recrutamento de leucócitos. Os infiltrados leucocitários em tumores podem incluir células T e B, e/ou macrófagos associados a tumores (TAMs). Nesse sentido, o TNF pode regular o crescimento tumoral modulando cada um destes subconjuntos de leucócitos. O TNF medeia a produção de IL-17 dependente de TNFR1-1 em células $CD4^+$, levando ao recrutamento de células mielóides no microambiente tumoral e à progressão tumoral. O TNF pode também promover a diferenciação de células mielóides associadas a tumores em células que expressam marcadores de células endoteliais e, embora estas células não possam ser diretamente incorporadas na vasculatura do tumor, parece que promovem a angiogênese e o crescimento tumoral (WATERS et al., 2013)

A citocina imunomoduladora IL-12 emergiu como uma potente citocina indutora da imunidade antitumoral. Ela foi originalmente identificada em 1989 como o fator de estimulador de células NK, apresentando vários efeitos biológicos sobre os linfócitos T de sangue periférico. É produzida principalmente por células apresentadoras de antígenos (APC), tais como células dendrítricas, monócitos, macrófagos e linfócitos B através dos receptores *Toll-Like* (TRINCHIERI et al., 2014).

Em trabalho realizado por Bekaii-Saab e colaboradores (2009), foi demonstrado que IL-12, usado como adjuvante, promoveu a morte das células tumorais por meio da atividade das células NK em pacientes que foram tratados com trastuzumabe (DAVID; KLINKE, 2010), um anticorpo monoclonal direcionado contra o domínio extracelular do receptor tirosina cinase HER2 que é superexpresso em alguns tipos de câncer de mama (VALABREGA et al., 2006). Além disso, já foi descrito que o principal papel da IL-12 é orquestrar a resposta imune do tipo Th1 (LASEK et al., 2013). As células T do perfil Th1 produzem INF-γ, IL-2 e TNF-α, potencializando a imunidade mediada por células e induzida via sinalização de IL-12, através do transdutor de sinal e ativador de transcrição–4 (STAT-4) e T-bet (Fator de transcrição da família Tbox, responsável pela regulação de linfóticos T helper do tipo 1). Isso se contrapõe ao perfil Th2 que produz IL-4, IL-5 e o Fator Transformador de Crescimento–β (TGF-β), que direciona uma resposta imune do tipo humoral (KENNEDY; CELIS, 2008).

A IL-12 tem um papel chave na regulação da inflamação através da comunicação entre as respostas inatas e adaptativas. IL-12, por meio das APCs, leva a uma ativação e proliferação de células NK e T para promoverem suas funções citolíticas, por liberação de granzimas e perforinas, e liberação de citocinas. Além disso, a IL-12 inibe a interferência dos linfócitos T reguladores (TUGUES et al., 2014).

Os efeitos antitumorais da IL-12 são bem estabelecidos, no entanto, essa citocina é incapaz de inibir diretamente o crescimento tumoral. Em vez disso, a IL-12 orquestra uma resposta do tipo Th1 contra o câncer. Outro dado importante é que a IL-12 parece provocar uma resposta antitumoral mais potente quando existe diretamente no local do tumor, em vez de apresentar-se sistemicamente (LASEK et al., 2014). A IL-12 também induz a produção de quimiocinas antiangiogênicas, tais como a proteína indutível por IFN-y (IP-10, CXCL10) e monocinas induzidas por IFN-γ (MIG, CXCL9) em células endoteliais. Assim sendo, a produção endógena de IFN-γ é necessária para o efeito antitumoral da IL-12 na maioria, se não em todos os casos. Assim sendo, a IL-12 além de apresentar potente atividade antitumoral, apresenta atividade anti-metastática (XU et al., 2010).

A CCL2 pertence a um grupo de citocinas de baixo peso molecular com atividade de quimioatração. Ela orquestra o recrutamento de células imunes para locais específicos, sendo expressa constitutivamente em funções homeostáticas, e é induzida durante um processo inflamatório para atração de leucócitos para defesa e reparação tecidual (ROLLINS, 1997; LIM et al., 2016). CCL2 é expressa por uma grande variedade de células, incluindo células endoteliais, epiteliais, mielóides, músculo liso e fibroblastos, tanto constitutivamente, quanto por indução, sendo um quimioatrativo para monócitos, basófilos, linfócitos T e células NK (DESHMANE et al., 2009; LIM et al., 2016). No contexto da malignidade tumoral, a secreção de CCL2 a partir das células tumorais, constitui a principal fonte desta quimiocina, principalmente no câncer de mama (LABEL-HAZIV et al., 2014).

A CCL2 também tem um papel distinto na angiogênese. Ela promove alguns passos da angiogênese, como proliferação, migração e formação de túbulos das células endoteliais (STAMATOVIC et al., 2006). A CCL2 recruta células mielóides, como macrófagos associados a tumores (TAMs) e células supressoras derivadas de mielóide. A elevada abundância de TAMs nos tumores, juntamente com as atividades angiogênicas diretas da CCL2 nas células endoteliais, contribui para o perfil angiogênico elevado atribuído a esta quimiocina. Paralelamente, a CCL2 promove as funções relacionadas com a metástase, atuando diretamente sobre células tumorais que expressam CCR2, originando a migração e invasão de células tumorais, para a produção de metaloproteinases de matriz e para aumento de metástases (LEBEL-HAZIV et al., 2014).

A sinalização CCL2-CCR2 é especialmente importante para metástase bem-sucedida, estando envolvida nos passos iniciais e tardios. A CCL2 pode ser produzida tanto pelo câncer, como pelas células do estroma no microambiente do tumor, exercendo efeitos diretos sobre as células cancerosas e funcionando indiretamente através do recrutamento de células do estroma do hospedeiro com atividades pró-tumorigênicas durante a metástase (LIM et al., 2015). Durante as fases iniciais da metástase, as células cancerosas adquirem um fenótipo migratório e invasivo, o que lhes permite quebrar a matriz extracelular circundante (ECM), invadir os tecidos vizinhos e avançar para o sangue ou vasos

linfáticos. A CCL2 contribui para esta fase inicial, orientando a migração de células cancerígenas por meio da interação com o receptor CCR2 expresso em células tumorais (CHIU et al., 2012).

Nesse contexto, CCL2 induz a expressão de metaloproteinases MMP2 e MMP9 em células cancerosas, o que está diretamente relacionado ao aumento da invasão. Após a migração e invasão, a intravasação de células cancerosas na circulação é necessária para permitir a disseminação metastática (TANG; TSAI, 2012). A CCL2 tem papéis adicionais durante os estágios posteriores de metástase. Além de leucócitos, CCL2 também pode atrair células cancerosas para locais secundários, embora este processo seja mais complexo podendo exigir interações com outros tipos de células hematopoiéticas. Adicionalmente, CCL2 pode estimular a proliferação celular e aumentar a sobrevivência das células cancerosas nos locais metastáticos (LIM et al., 2015).

O interferon gama (INF- γ) faz parte de um grupo de citocinas pleiotrópicas que desempenham papéis importantes na comunicação intercelular durante as respostas imunológicas inatas e adquiridas. Esta citocina desempenha diversas funções biológicas, principalmente relacionadas à defesa do hospedeiro e à regulação imune, incluindo a defesa antiviral e antibacteriana, além de regular ciclo celular, apoptose e inflamação (ZAIDI; MERLINO, 2011).

O IFN-γ desempenha um papel crítico na capacidade do sistema imune para reconhecer e eliminar agentes patogênicos por meio do aumento da apresentação de antígenos pelas APCs. O Foxp3 e o supressor de sinalização de citocinas 1 (SOCS-1) são dois reguladores críticos da sinalização do IFN-γ (LARKIN et al., 2013). É uma citocina secretada por células T ativadas e células NK, sendo responsável pela modulação de diversas células (LIN; YOUNG, 2013). Quando ativa seu receptor, desencadeia uma resposta a partir da ativação da *Janus* Cinase (JAK), o que leva à ativação do seu fator de transcrição STAT1, que se dimeriza quando fosforilado e é translocado para o núcleo onde interfere com a transcrição gênica (BROMBERG et al.,1996; GREEN et al., 2016; LARKIN et al., 2013).

O IFN-γ facilita o desenvolvimento do perfil Th1 por induzir a expressão de T-bet e suprimir a expressão de GATA3, que está envolvida na diferenciação Th2 (LIN et al., 2013). O T-bet é um importante fator de transcrição para Th1,

desempenhando um importante papel na regulação da expressão de IFN-γ (SZABO et al., 2002; ZHU et a., 2012). As células T $CD4^+$ *naive* não expressam T-bet, com isso o IFN-γ induz a expressão de T-bet nessas células, o que resulta em uma retroalimentação positiva durante a diferenciação Th1 (YANG et al., 2007; ZHU et al., 2012). Ainda, o INF- γ ativa macrófagos, levando-os a produzirem óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (MATSUZAWA et al., 2014).

Estudos demonstram que o INF-γ inibe o crescimento tumoral, causando parada do ciclo celular em G1, diminuindo a replicação do DNA, a absorção de aminoácidos e a síntese de proteínas (IIWES, 1979; GREEN et al., 2016). Outros estudos demonstraram que o INF estimula o gene RIG-G (IFIT3) que controla a função da p21 e p27, por meio do bloqueio da JAB1 que é seu regulador negativo. Além disso, o IFIT3 bloqueia c-myc, levando à parada do ciclo celular (GREEN et al., 2016). Por fim, os efeitos do INF incluem a ativação da caspase-8 e PARP (*Poly (ADP-Ribose) polymerase*), levando à morte celular pela via extrínseca (GREEN et al., 2016).

Nas células cancerosas, o IFN tem um importante papel por ativar os receptores de morte TRIAL e FAS, e também na liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de participar das funções de imunovigilância, aumentando a imunogenicidade de células tumorais, e na detecção e eliminação de células malignas, por meio do recrutamento de linfócitos T citotóxicos (BEKISZ et al., 2013; GREEN et al., 2016). Sendo assim, em tumores, o IFN-γ tem sido associado com funções citostáticas, citotóxicas e antitumorais (ZAIDI; MERLINO, 2011).

Em contraste, dados adicionais têm mostrado que o IFN-γ tem um comportamento dual, o qual, dependendo das circunstâncias, tais como o microambiente em que se encontra e a intensidade de sinalização, pode ser citostático/citotóxico, bem como pode apresentar efeitos proliferativos (WAJANT, 2009).

A IL-4 é uma citocina pleiotrópica, um regulador potente da imunidade, que é secretada principalmente por mastócitos, células Th2, eosinófilos e basófilos (HOWARD et al., 1982; SILVA-FILHO et al., 2013; SACHIN et al., 2016). Tem sido demonstrada sua importância para a sobrevivência de leucócitos, tanto em

condições fisiológicas como patológicas, tal como a manutenção do perfil mediado por células Th2, e para mudança de classe para IgE (SACHIN et al., 2016). Classicamente, a IL-4 conduz a polarização das células T $CD4^+$ para o fenótipo Th2, juntamente com supressão do INF-γ, responsável pela indução do perfil Th1 (NELMS et al., 1999; SILVA-FILHO et al., 2014).

Além disso, IL-4 estimula o crescimento e diferenciação dos linfócitos B, controla a troca de classe de IgM para IgG e induz o desenvolvimento de linfócitos B de memória (SILVA-FILHO et al., 2013). Esta citocina tem sido frequentemente associada à sua atividade proliferativa, antiapoptótica de células tumorais e angiogênica (HALLETT; VENMAR; FINGLETON, 2012), além de regular a expressão de numerosos genes em diversos tipos de células, incluindo linfócitos, macrófagos, fibroblastos, e células epiteliais e endoteliais (LUZINA et al., 2012). A IL-4 liga-se na cadeia α do receptor IL-4R, que pode se dimerizar com a cadeia γ comum para produzir o complexo de ligação do tipo 1, que é expresso em células hematopoiéticas, ou com a IL-13Rα para formação do complexo do tipo 2, que está expresso também em células não hematopoiéticas (CALLARD et al., 1996; REMALINGAM et al., 2008; SACHIN et al., 2016). O complexo do tipo 1 é crítico para a polarização do perfil Th2 (SACHIN et al., 2016).

Já havia sido reportado que o aumento da produção de IL-4 e da expressão de IL-4R está relacionado com vários tipos de tumores, incluindo câncer de mama, ovário, cólon, pulmão e tireoide. Estudos recentes demonstram que a IL-4 pode promover a formação do tumor por inibição da apoptose e aumento da proliferação (TODARO et al., 2006; ROCA et al., 2012). Relatos da literatura mostram que o aumento da sobrevivência induzido por IL-4 envolve a via Akt em células cancerosas (LI et al., 2009; ZORAN 2011). Outros estudos demonstraram aumento de IL-4 no soro de pacientes com câncer de próstata (WISE et al., 2000; ZORAN, 2011). De fato, pacientes com câncer, exibem aumento de IL-4 no ambiente tumoral, além disso, os linfócitos infiltrados no tumor foram principalmente polarizados para perfil Th2 (LI et al., 2009).

A IL-10 foi identificada em 1989 como um fator produzido por células Th2 em resposta à estimulação antigênica, sendo capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas por células Th1 (FIORENTINO et al.,

1989; SATO et al., 2011). Ela foi inicialmente reconhecida como uma citocina que modula o crescimento e a diferenciação de células da imunidade inata, queratinócitos e células endoteliais e suprime a ativação e funções efetoras das células T (MOORE et al., 1993; KRISTEN et al., 2013). A IL-10 é considerada uma citocina tolerogênica e anti-inflamatória, porque bloqueia a produção de citocinas pró-inflamatórias e a capacidade das células mielóides para ativar eficazmente células T (GEGINATE et al., 2016). Ela é produzida por células T reguladoras, sendo o principal obstáculo que as células T $CD8^+$ enfrentam para mediarem a lise tumoral (KHAZAIE et al., 2009) e a terapia imunológica contra o câncer (KHAZAIE et al., 2006; KRISTEN et al., 2013).

O receptor de IL-10 (IL-10R) é composto de duas diferentes cadeias, IL-10R1 e IL-10R2. A ligação da IL-10 à subunidade IL-10R1 induz uma mudança conformacional no receptor, permitindo-lhe dimerizar com o IL-10R2, conduzindo assim à transdução de sinal na célula alvo (JOSEPHSON et al., 2001; SATO et al., 2011).

A IL-10 foi detectada em vários tipos de tumores e desempenha um papel chave na supressão do sistema imune e no escape da vigilância imunológica (SATO et al., 2011). Ela apresenta funções pleiotrópicas na regulação do sistema imune e na inflamação. Além disso, regula a expressão das citocinas do perfil Th1 (TAGA; TOSATO, 1992), a expressão de antígenos no MHC de classe II (WALL et al., 1991) e de moléculas co-estimulatórias dos macrófagos (DING et al., 1993), enquanto aumenta a sobrevivência e proliferação celular (ITOH et al., 1995; SATO et al., 2011). A supressão da expressão do MHC classe II pela IL-10 já é um fato bem documentado, sendo essa supressão tanto constitutiva, quanto induzida por INF-γ. Sendo assim, a redução da apresentação antigênica tem sido implicada como responsável pela inibição das células Th1. Além disso, foi demonstrado que a IL-10 inibe fortemente a expressão de citocinas em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (LPS) (FIORENTINO et al., 1991), somando-se a isso a mesma demonstrou capacidade de desativar macrófagos por meio da inibição da produção de NO (DOKKA et al., 2001; MARK et al., 2015).

Em relação a seus efeitos no câncer, é consenso que a expressão de IL-10 representa um mecanismo de escape da vigilância imunológica

(STEINBRINK et al., 1999). A IL-10 reduzindo ou inibindo a apresentação antigênica via regulação descendente da expressão de MHC classe II em APCs, bem como MHC classe I em células tumorais, implica na contribuição para um ambiente imunossupressor e assim facilita a progressão tumoral (MANNINO et al., 2015). Ainda, a IL-10 é secretada por alguns tumores, tais como linfoma de células B e Melanoma, atuando como um fator de crescimento autócrino (NUBER et al., 2012; GENINAT et al., 2016).

Existe uma grande quantidade de evidências sugerindo que a IL-10 também possui potentes efeitos antitumorais. Um possível mecanismo que foi proposto para explicar estas descobertas foi que a IL-10 tem atividade antitumoral sob certas condições, como a estimulação mediada por IL-10 sobre células NK, bem como sua estimulação direta. A IL-10 pode estimular indiretamente a atividade das células NK *in vivo*. Adicionalmente, foi demonstrado que as células NK aumentam a TIA-1 (uma proteína que favorece a sua citotoxicidade) em resposta à IL-10 e esta atividade tumoricida proposta foi sugerida para auxiliar a estimulação de Linfócitos T citotóxicos (MANNINO et al., 2015).

O equilíbrio entre sinais pró-inflamatórios e anti-inflamatórios fornecidos por diferentes populações de células T parece ser crucial para a manutenção da fisiologia normal, bem como para a supressão do desenvolvimento do câncer. Nesse contexto, a IL-10 é uma citocina essencial para a homeostase de células T reguladoras (Tregs) e a supressão de células T pró-inflamatórias que expressam IL-17 (Th17) (OTF, 2014).

2.1.4 Estresse oxidativo e o papel do óxido nítrico no contexto do câncer

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos, que são comumente chamados de oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (ROS), enquanto que mecanismos de proteção, que objetivam eliminá-las, são chamados de antioxidantes (REUTER et al., 2010). A regulação da homeostase redox é fundamental para manter as funções celulares normais e assegurar a sobrevivência celular (GORRINI et al., 2013).

A respiração aeróbia gera energia a partir das mitocôndrias em células eucarióticas, e como resultado desse metabolismo oxidativo, compostos são produzidos. A maioria desses compostos são benéficos para a célula, no entanto, menos de 5% desses compostos podem ser tóxicos para a célula se sua concentração aumentar além dos limites normais. Esses compostos derivados do metabolismo oxidativo são necessários para o funcionamento de certos eventos celulares, incluindo transdução de sinal, ativação enzimática, expressão gênica, formação de pontes dissulfeto, formação de novas proteínas no retículo endoplasmático, além de controlar a atividade de caspases durante o mecanismo de apoptose (SOSA et al., 2013).

ROS são amplamente definidos como espécies químicas contendo oxigênio, apresentando propriedades reativas, incluindo radicais livres superóxido ($O_2\cdot^-$) e hidroxila (HO•), bem como moléculas não radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estima-se que cerca de 2% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias é reduzido para formar superóxidos. A partir disso, as mitocôndrias são consideradas as principais fontes de ROS. Os peroxissomos estão envolvidos na remoção de ROS (por meio da decomposição catalisada do H_2O_2) e na produção de ROS (por meio da β-oxidação dos ácidos graxos e da atividade da flavina oxidase) (GORRINI et al., 2013).

O dano que ROS causam na célula não depende apenas de suas concentrações intracelulares, mas sim do equilíbrio entre sua concentração e as espécies antioxidantes endógenas. Quando o equilíbrio pró-oxidante/anti-oxidante é perdido, o estresse oxidativo é gerado, alterando e danificando diversas moléculas intracelulares, incluindo o DNA, RNA, lipídios e proteínas (VESKOUKIS et al., 2012). Essas espécies reativas causam danos ao DNA e mal funcionamento do seu mecanismo de reparo. A oxidação do DNA gera a 8-hidroxi-2’-deoxiguanosina, que é um produto capaz de gerar mutações no DNA e promover o processo de carcinogênese. Além disso, a membrana celular é rica em lipídios poli-insaturados, que são susceptíveis à oxidação por ROS. Assim, essas espécies reativas promovem a peroxidação lipídica e consequentemente aumentam a permeabilidade da membrana celular, podendo assim levar à morte da célula (SOSA et al., 2013).

As células inflamatórias também produzem mediadores solúveis, como os metabólitos do ácido araquidônico, citocinas e quimiocinas, que atuam recrutando células inflamatórias para o local, o que gera uma maior produção de espécies reativas (REUTER et al., 2010).

Os antioxidantes representam os mecanismos de defesa das células que captam espécies reativas e podem ser classificados em diferentes grupos de acordo com suas propriedades: antioxidantes endógenos, antioxidantes naturais e antioxidantes sintéticos. Os antioxidantes endógenos incluem glutationa, ácido alfa lipóico, coenzima Q, ferritina, ácido úrico, bilirrubina, metalotioneína, l-carnitina, melatonina, superóxido dismutase enzimática (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPXs), tiorredoxinas (TRX) e peroxirredoxinas (PRXs). Os antioxidantes naturais coexistem em um delicado equilíbrio com insumos oxidativos. Outros antioxidantes podem ser obtidos a partir da dieta, tais como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), α-caroteno (vitamina A), ácido lipóico, ácido úrico, glutationa e flavonoides (SILVA; JANISIULIONIS, 2014).

As células tumorais são caracterizadas pelo aumento da glicólise anaeróbia (efeito Warburg) e devido a isso apresentam altos níveis de espécies reativas de oxigênio. Esse estresse oxidativo é exercido por ROS que se acumulam, resultando em um desequilíbrio entre geração e eliminação de ROS. Os níveis elevados de ROS em células tumorais são uma consequência de alterações em várias vias de sinalização que afetam o metabolismo celular. Por fim, essa elevada concentração de ROS é neutralizada por mecanismos de defesa antioxidante, presentes nas células tumorais (GORRINI et al., 2013).

No contexto do câncer, ROS podem promover o desenvolvimento e a progressão de tumores, por interferir em diversos processos biológicos, tais como: proliferação celular por ativação da ERK 1/2 e ativação da RKT dependente de ligante; evasão da apoptose por ativação de SRC, NF-κB, PI3K e Akt; invasão de tecidos e metástases por aumento da síntese de metaloproteinases, superexpressão de Met e interação de Rho-Rac; e, por fim, angiogênese, por promover a liberação de VEGF e angiopoietina (SOSA et al., 2013).

A produção de ROS por neutrófilos e macrófagos como um mecanismo para destruição de células tumorais já está bem estabelecida. Nessas células, ocorre uma rápida formação de superóxido principalmente mediada pela NAPDH oxidase, levando à uma produção subsequente de peróxido de hidrogênio. Além disso, durante o processo inflamatório, os macrófagos ativados também geram óxido nítrico que reage com o superóxido para produzir radicais de peroxinitrito, que são semelhantes na sua atividade aos radicais hidroxilo, contribuindo para a apoptose das células tumorais. Além disso, o aumento desproporcional de ROS nas células tumorais, pode levar a parada de ciclo celular, apoptose e/ou senescência(LIOU; STORZ, 2010)

Embora os níveis de ROS que são neutralizados pelos mecanismos de defesa antioxidante em células tumorais sejam elevados, ainda são compatíveis com as funções celulares da célula tumoral. As células tumorais podem ser mais sensíveis do que as células normais ao acúmulo de ROS, o que oferece uma interessante janela terapêutica (LIU; WANG, 2015). Muitos agentes antineoplásicos, incluindo taxanos, alcaloides da vinca e complexos de coordenação da platina, são atualmente usados para induzir altos níveis de ROS, resultando em morte celular (BARRERA, 2012). O paclitaxel, que é um fármaco que inibe o fuso mitótico por estabilizar os microtúbulos, e a partir disso, inibe a divisão celular, em células de câncer de mama, provoca a translocação de Rac1, que regula positivamente a NOX, promovendo assim a geração de ROS, levando a seu acúmulo provocando danos à membrana da célula tumoral (LIU; WANG, 2015).

O Óxido Nítrico (NO) é um gás de meia-vida curta, produzido endogenamente, que atua como molécula sinalizadora no corpo. É sintetizado pela Óxido Nítrico Sintase (NOS) e serve como molécula de sinalização chave para vários processos fisiológicos. Por outro lado, a síntese excessiva e não regulada de NO está relacionada com condições fisiopatológicas, incluindo o câncer (CHOUDHARI et al., 2013).

O NO apresenta efeitos dicotômicos dentro do modelo de câncer. Ele modula diferentes eventos relacionados ao câncer incluindo angiogênese, apoptose, ciclo celular, invasão e metástase. Em contraste aos seus efeitos promotores de tumor, ele também foi descrito em virtude dos seus efeitos

citotóxicos. Os efeitos do NO na biologia tumoral são amplos, abrangendo seu envolvimento na transformação celular, formação de lesões neoplásicas, iniciação e regulação da cascata metastática (CHOUDHARI et al., 2013).

Em 1985, surgiram relatórios que documentavam a produção de nitritos e nitratos *in vitro* por macrófagos quando induzida por LPS e INF-γ. A síntese deles era dependente de L-arginina e levou à citotoxicidade de bactérias e células tumorais. Estas observações iniciais levaram ao conceito do potencial papel do NO como agente antitumoral. Os relatos do papel do NO no câncer rapidamente se acumularam, mas dividiram seu papel em virtude de suas atividades bifásicas como um agente antineoplásico e uma molécula pró-neoplásica (HUERTA, 2015).

O NO derivado de macrófagos, células de Kupffer, células NK e células endoteliais participa na atividade citotóxica contra diversos tipos de tumores. Isso sugere que o NO tem efeito citotóxico e citostático nas células tumorais. Vários alvos moleculares, tais como aconitase e ribonucleotídeo redutase foram implicados nos efeitos citostáticos mediados pelo NO, além disso, ele causa supressão da síntese de DNA. A superprodução prolongada de NO atua como modulador pró-apoptótico, ativando proteases da família de caspases através da liberação de citocromo c mitocondrial para o citosol, regulação positiva da p53 e alterações na expressão de proteínas associadas à apoptose, incluindo a família Bcl-2. Além disso, a superprodução de NO leva à supressão de metástases (CHOUDHARI et al., 2013).

Em contrapartida, sabe-se que em níveis baixos, o NO pode levar à formação de tumores. O mecanismo de ação que conduz à atividade pró-neoplásica do NO são numerosos, e incluem: proliferação celular por ativação de oncogenes; estimulação da angiogênese; inibição da apoptose por S-nitrosilação, inativação das caspases -1, -2, -4, -8 e -3, -6, -7, interrupção do complexo Apaf-1/Caspase-9, indução da proteína de choque térmico 70 (Hsp 70), mutação de p53 e ativação de COX-2. Certamente, podem ocorrer simultaneamente vários processos que conduzem a este efeito multifatorial (HUERTA, 2015).

Outra participação importante do NO é na angiogênese. Este é um evento molecular crítico envolvido na progressão do tumor. Uma grande variedade de

genes e fatores de transcrição atuam como mediadores pró-angiogênicos, incluindo o NO, todos eles envolvidos na promoção da neovascularização. Vários estudos têm implicado o papel do NO na angiogênese. O NO estimula a via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), bem como o supressor tumoral p53 e VEGF, que são mediadores coletivos que agravam a angiogênese (MACLAUCHLAN et al., 2011).

Os fatores de crescimento proliferativos e angiogênicos, tais como o VEGF, têm mostrado predominantemente que afetam a sinalização de NO e, consequentemente, aumentam a angiogênese. A expressão de VEGF induziu NOS2 em vários tumores humanos. O VEGF estimula a expressão de eNOS, que foi identificada como um regulador e promotor da angiogênese. A relação entre o NO e o VEGF é recíproca. Estudos mostraram que a hipóxia induzida promove a elevação do iNOS possivelmente por meio do NF-κ B (VAHORA et al., 2016).

Esses efeitos dicotômicos do NO no câncer resultam da sua capacidade de interferir com vários processos relacionados ao desenvolvimento e evolução da doença, tais como, o crescimento tumoral, migração, invasão, sobrevivência, angiogênese e metástase. Portanto, os resultados conflitantes são, na realidade, consequência da natureza dual dos efeitos celulares mediados por NO, que dependem de vários fatores, como, a concentração de NO (HALDER et al., 2016), o microambiente e o ciclo celular no tumor (RIDNOUR et al., 2008; HALDER et al., 2016), o estado redox (MOCELLIN; BRONTE; NITTI, 2007) e o tempo de exposição (VILLALOBO, 2007).

2.2 Tumor Ascítico de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário espontâneo adaptado à forma ascítica, espécie específica, originado de camundongos fêmeas, que é transplantado em camundongos por via intraperitoneais (i.p.) em série [18]. Quando inoculado de forma subcutânea, ele cresce em forma sólida (EHRLICH, 1906; CALIXTO-CAMPOS et al, 2013) A forma ascítica do tumor tem sido utilizada como modelo experimental para avaliar a influência que fármacos podem causar na sua proliferação e também avaliar a resposta do hospedeiro

contra as células tumorais (KAMETANI et al., 2007). A ascite característica é formada devido a resposta inflamatória causadas pelas células tumorais, resultando em aumento da permeabilidade vascular peritoneal (FASTAIA & DUMONT, 1976). Outros fatores que contribuem para a ascite e letalidade do tumor de Ehrlich incluem a drenagem linfática peritoneal prejudicada pelas células tumorais, a pressão mecânica exercida pelo aumento progressivo do líquido ascítico, da hemorragia peritoneal e da endotoxemia (CALIXTO-CAMPOS et al., 2013).

2.3 Análogos da piperina e o 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperanoato de etila

Os produtos naturais são a fonte mais consistente de fármacos. Novos medicamentos baseados em produtos naturais incluem muitos agentes anticancerígenos, tais como vindesina, vinorelbina, etoposídeo, docetaxel e topotecano (BEZERRA et al., 2008).

Estudos da literatura mostram que o alcaloide amida piperina (amida piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(E)-4(E)-pentadienoico) foi isolado originalmente de frutos da pimenta preta (*Piper nigrum Linn*) e pimenta longa (*Piper longum Linn*) (GREENSHIELDSA et al., 2014; MADHAVI et al., 2009; MEGHWAL AND GOSWAMI, 2013), e é o componente majoritário de *P. Longum e P. Nigrum*, variando de 5 a 9% de concentração (WANG et al., 2014).

Já foi descrito que a piperina apresenta potente atividade antitumoral *in vitro* (FOFARIA et al., 2014; YAFFE et al., 2014) e *in vivo* (Bezerra et al., 2006; Lai et al., 2012), inibe metástases pulmonares (PRADEEP; KUTTAN,2002), além de inibir a expressão celular de metaloproteinases de matriz-9 (MMP-9) em HT-1080, assim interferindo com a migração e invasão das células tumorais. Ainda, esta substância inibe a expressão em nível transcricional do gene HER2, apresentando um potencial para prevenção e tratamento do câncer de mama. Estudos de mecanismos de ação demostraram que a piperina induz citotoxicicidade contra as células tumorais, pelo menos em parte, por meio do aumento de ROS, além de exercer efeito antiproliferativo por indução de parada de ciclo celular e autofagia (WANG et al., 2014).

Outras atividades descritas para a piperina incluem a proteção contra a genotoxicidade induzida por agentes químicos cancerígenos e a inibição das isoenzimas do complexo P450 (CASTRO et al 2006). Além disso, foi relatado que ela inibe a produção de óxido nítrico, e TNF-α, sendo também um potente inibidor do fator nuclear kappa B e da expressão de citocinas pró-inflamatórias, em células RAW 264.7 estimuladas com LPS (YING et al., 2013). Foi descrito que a piperina, além das atividades antiproliferativas, apresenta efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, antiucerogênicos, antioxidantes e citoprotetores (HWANG et al., 2011).

No entanto, apesar da significante atividade *in vivo*, a piperina apresenta significante toxicidade demonstrada pela DL50 (dose que produz morte de 50% dos animais) em torno de 60 mg/kg (i.p.) (PIYACHATURAWAT et al., 1983). Além da piperina, outras substâncias obtidas de espécies de *Piper*, bem como análogos delas obtidos, têm sido relatadas por mostrar atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (BEZERRA et al. 2006).

A atividade citotóxica direta da piplartina, outro alcaloide amida obtido de espécies de *Piper*, contra células tumorais tem sido descrita em muitos estudos. A piplartina é capaz de matar células tumorais de vários histótipos, incluindo hematológicos, cólon, melanócito, pulmão, mama, Sistema Nervoso Central (SNC), pancreático, nasofaríngeo, ósseo, bexiga, renal e próstata. Sua citotoxicidade foi observada em concentrações micromolares em células tumorais, mas não ocorreu citotoxicidade em células normais. Além disso, sua citotoxicidade foi seletiva sobre as células cancerosas, mostrando fraca toxicidade em células normais (BEZERRA et al., 2013).

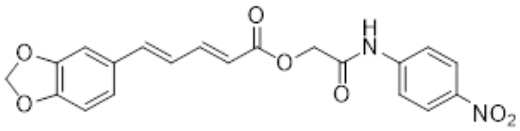
Assim, com o objetivo de maximizar os efeitos farmacológicos e minimizar a toxicidade, foram sintetizados três diferentes derivados da piperina, 2-oxo-2-fenilamina-piperinoato de etila (HE-01), 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE-02) e 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila (HE-03). Em triagem preliminar, realizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), foi observado que as três moléculas apresentaram significante atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE). Estudos adicionais mostraram que HE-03 apresentou

baixa toxicidade no ensaio agudo, com DL_{50} estimada em 1000 mg/kg i.p., com mecanismo de ação antitumoral envolvendo parada do ciclo celular, onde ocorreu aumento do pico sub-g1 e consequente diminuição das fases G0/G1 e S, e atividade antiangiogênica em modelo de carcinoma ascético de Ehrlich. Além disso, o HE-03 apresentou atividade antiangiogênica no mesmo modelo testado (SOUZA, 2015).

Ainda, HE-03 induziu alterações histopatológicas, como fraca hepatotoxicidade, que incluiu discreto infiltrado inflamatório linfo-histiocitatário e esteatose macro e microvesicular. Além disso, o HE-03 não apresentou potencial mutagênico e genotóxico (SOUSA, 2015).

Considerando a busca por novas alternativas terapêuticas pela indústria farmacêutica que sejam mais potentes e seletivas, e considerando a atividade antitumoral da piperina e seus análogos, foi selecionada o 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE-02) (Figura 8) para avaliar sua toxicidade, com o objetivo de fornecer dados relativos à segurança de seu uso, bem como avaliar seu potencial antitumoral e seus possíveis mecanismos de ação.

Figura 8. Estrutura do HE-02.



Objetivos

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar a toxicidade e o potencial antitumoral do análogo da piperina, o 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE02).

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade do HE02 em eritrócitos de camundongos, e em células da RAW 264.7;
- ✓ Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do HE02 em camundongos;
- ✓ Estudar a atividade antitumoral *in vivo* do HE02 em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich;
- ✓ Investigar mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral de HE02: alterações no perfil do ciclo celular, efeito antiangiogênico, imunomodulador e antioxidante;
- ✓ Avaliar o perfil de toxicidade do HE02 após tratamento antitumoral em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich;

MATÉRIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar) e no biotério Prof. Thomas George, ambos do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/Centro de Ciências da Saúde - CCS), todos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A avaliação da citotoxicidade em células RAW 264.7 foi realizada em colaboração com o laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/Unicamp), coordenado pelo Professor Doutor João Ernesto de Carvalho.

4.2 Material

4.2.1 Substância teste

O análogo da piperina 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE-02) foi gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho (Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica/Centro de Ciências Exatas e da Natureza - CCEN/UFPB).

A partir da piperina foi preparado o sal do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(E),4(E)-pentadienóico (ácido piperínico). Então, foi realizada a preparação dos compostos 2-cloro-N-arilacetamida substituídas, obtidas a partir da reação da amina aromática *para*-substituída (R= NO2), Et3N e cloreto de 2-cloroacetila em diclorometano, sob agitação magnética a 0ºC. Por fim, para preparação dos compostos finais, foram realizadas reações de substituição com o sal do ácido piperínico e da 2-cloro-N-arilacetamida solubilizados em n,n-dimetilformamida (DMF) em um banho de óleo a 100 °C durante 12 horas. Após o término da reação, a mistura foi resfriada, e então, foi adicionada água gelada e o sólido foi separado por filtração a vácuo. O produto bruto foi recristalizado em etanol/água,

obtendo o composto HE-02 com rendimento de 70-80%. A estrutura química do composto sintetizado foi confirmada por meio de técnicas de espectroscopia de infravermelho, RMN 1H e 13C.

4.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, pesando entre 26 e 32 g, com faixa etária aproximada de 60 dias, obtidos do biotério Prof. Thomas George (IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 ºC), com livre acesso à comida (*pellets* de ração da marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, colocadas nas grades metálicas das gaiolas em sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram mantidos no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFPB, sob a certidão Nº 006/2016.

4.2.3 Linhagem de células tumorais

Para a avaliação da citotoxicidade em macrófagos foi utilizada a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7. As células foram mantidas em frascos de manutenção de 25 cm^2, em meio RPMI-1640 suplementado e incubada a 37ºC, em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido.

4.2.4 Substâncias e reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: Cetamina – (Ketamin®); cloridrato de xilazina –(Anasedan®); heparina – (HEPAMAX-S®); Solução fosfato tamponada (PBS); Tween 80 (Sigma-Aldrich®); Dimetilsulfóxido (Mallinckrodt CHEMICALS); Triton X-100 (Sigma- Aldrich®); Soro bovino fetal

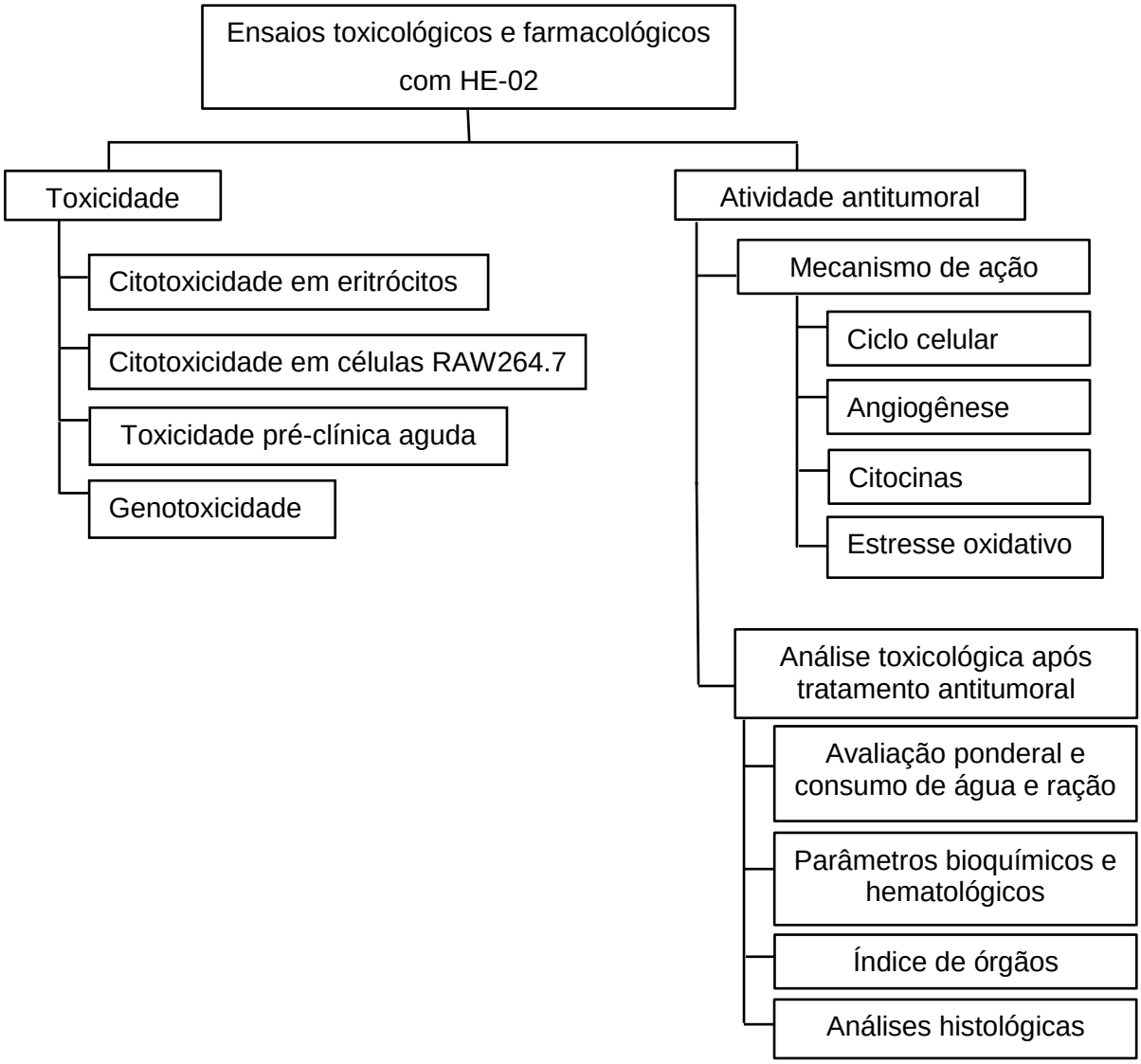
(SBF) (Nutricell®); Iodeto de Propídeo (Sigma –Aldrich); Tween 20 (Sigma-Aldrich®); 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich®); Kit ELISA (eBioscience®).

4.2.5 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Centrífuga (HETTICH-Zentrifugen- Rotina 380 R); Microscópio invertido (Olympus); Balança analítica (GEHAKA® AG 200); Citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA); Câmera fotografica (Canon OverShot A2500); Leitor de placa (Synergy HT, BioTek). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System) e o analisador hematológico celular automático Animal Blood Counter Vet (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente.

4.3 Métodos

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral do 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE-02)



4.3.1 Ensaios toxicológicos

4.3.1.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade em eritrócitos foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de camundongos Swiss, sob anestesia com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.), coletado do plexo orbital. A agulha foi heparinizada (heparina sódica) para prevenir

coagulação. Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente ressuspensas em PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise.

O HE02 foi solubilizado em DMSO (5%) e preparado em PBS, no dobro da concentração desejada (2000 µg/mL). A cada 100 µL dessas soluções foi adicionado 100 µL da suspensão de eritrócitos, em triplicata. Os controles positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 em PBS (2 mL) e DMSO (5%) em PBS (2 mL), respectivamente. A placa de 96 poços foi mantida sob agitação suave por 60 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Então, foi adicionado 200 µL/poç o de solução de Triton X-100 (0,1%) e a placa foi cuidadosamente agitada. A quantidade de hemó lise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm e serviu como prova inversa para determinação da CH_{50} (concentração que produz 50% de hemólise) de HE-02.

4.3.1.2 Avaliação da citotoxicidade em linhagem de macrófagos RAW 264.7

Em macrófagos RAW 264.7 foi realizado o ensaio do MTT para avaliação do potencial citotóxico do HE02. Para isso, as células foram pré-incubadas com veículo (0,05% DMSO em RPMI 1640) e HE02 (10 - 1000 µM). Após 4 horas de incubação, foi realizado o ensaio de redução do MTT, previamente descrito por Mosmann (1983). Para isso, os sobrenadantes foram removidos e as células foram incubadas com 200 µL de solução de MTT (1 mg/mL) em meio RPMI-1640 por 2 horas. Então, a solução foi removida, e o MTT reduzido intracelularmente para o sal de formazan não hidrossolúvel foi solubilizado com 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 minutos sob agitação. Para análise, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 550 nm.

Os resultados são expressos em porcentagem de redução, comparado ao grupo controle (veículo).

4.3.1.3 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

O ensaio de toxicidade aguda em camundongos foi realizado de acordo com o "Guideline for Testing of Chemicals" nº 423 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), com algumas modificações (OECD, 2001).

Camundongos, três fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos à dose de 2000 mg/kg do HE02 por via intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (tween 80 a 12% em salina).

O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. A dose inicial escolhida foi de 2000 mg/kg, pois estudos prévios indicaram um baixo nível de toxicidade. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL_{50} (dose responsável pela morte de 50% dos animais experimentais), todavia fornece uma estimativa do seu valor, bem como permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o "Globally Harmonized Classification System" - GHS.

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após a administração, foi realizada observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental descrito por Almeida et al. (1999) (ANEXO C).

4.3.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich

Células de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE) com cinco a sete dias de crescimento foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via intraperitoneal (0,5 mL - 4 x 10^6 células/mL) nos animais

experimentais (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, o HE-02 foi solubilizado em Tween 80 (5%) em salina e administrado diariamente por via intraperitoneal (i.p.) a grupos de seis animais, nas doses de 6,25; 12,5 e 25 mg/kg, por nove dias consecutivos. O grupo controle foi tratado com uma solução de 5% de Tween 80 em solução salina (n=6) e um sétimo grupo de animais foi tratado com 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich®), 25 mg/kg (n=6), como droga padrão.

4.3.2.1 Volume do Tumor, massa tumoral, viabilidade celular e total celular

Para a avaliação do efeito antitumoral do HE-02, um dia após a última administração do tratamento descrito no item 4.3.2, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.), e eutanasiados por deslocamento cervical. Então, o líquido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal e o volume foi medido e expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para a determinação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Para tanto, foram incubados volumes semelhantes de líquido ascítico e de uma solução de 0,4% do corante, seguido de análise das células em câmara de Neubauer. Este ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluírem o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação dessas células (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993).

A massa do tumor foi determinada pela diferença dos pesos dos camundongos antes e depois da retirada do líquido ascítico, e foi expressa em gramas (g). A quantidade total de células viáveis no peritônio dos animais foi expressa como total celular ($x10^7$ células), que foi obtido como o produto do volume do tumor, expresso em mL, pela viabilidade celular, expressa como a quantidade de células x 10^6/mL.

4.3.2.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral

4.3.2.2.1 Análise do ciclo celular

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por nove dias com HE-02 conforme descrito no item 4.3.2. Um dia após a última administração, os animais dos grupos controle, HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. As células coletadas da cavidade peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos foram ressuspenssas em solução de NaCl 0,9% (p/v) a fim de se obter uma concentração final de 1×10^6 células/mL. Para a análise do ciclo celular, as suspensões celulares foram centrifugadas a 3000 rpm, por cinco minutos, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão foi homogeneizada. Foram adicionados 300 µL da solução fluorocrômica hipotônica (HFS) [citrato de sódio 0,1% (p/v), RNAse (0,5 mg/mL), Triton X (0,25 %) e Iodeto de Propídeo (PI) (0,25 mg/mL) e completou-se com água ultrapura até chegar ao volume de 50 mL. Inicialmente, as células populacionais foram colocadas no gráfico FCSxSSC para eliminar os detritos. A partir daí inseriu um gate no gráfico PE 585 / 42nm-W(largura) vs PE 585/42-A (Área) para remover dupletos. O gate com células únicas foi utilizado para analisar o ciclo celular, através do histograma em PE 585/42-A. Os dados foram analisados através do software DIVA 6.0 Os dados obtidos foram tratados com o software *Flowing Software* 2.5.1 e tratados no programa *GraphPad Prism* 5.0 (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

4.3.2.2.2 Avaliação do efeito antiangiogênico

Os animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich foram tratados por nove dias com HE02 conforme descrito no item 4.3.2. Um dia após a última administração, os animais dos grupos controle, HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O peritônio foi cortado e o revestimento interior da

cavidade peritoneal dos animais foi examinado e fotografado para determinação da microdensidade vascular peritumoral, com o auxílio do software AVSOFT®. A microdensidade dos vasos foi determinada pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada (AGRAWAL et al., 2011).

4.3.2.2.3 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal

Para a quantificação de citocinas, os animais foram divididos em grupos (n=6/grupo) para implante das células de carcinoma de Ehrlich, e tratados conforme descrito no item 4.3.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O líquido ascítico coletado da cavidade peritoneal dos animais foi centrifugado a 1200 rpm, por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado a – 20 °C para posterior dosagem das citocinas, por meio de ELISA, de acordo com o protocolo especificado no *Kit* do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-IL-1β, anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-12, anti-CCL2, anti-TNF-α e anti-IFN-γ, solubilizados em tampão fosfato, e incubadas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de soro fetal bovino), por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes IL-1β, IL-4, IL-10, IL-12, CCL2, TNF-α e IFN-γ para a obtenção da curva. As placas foram novamente incubadas *overnight* a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado às placas que foram incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e então foi adicionado o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP). As placas

foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e, após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em leitor de placa a 450 nm. A quantidade de citocinas foi calculada a partir das curvas-padrão.

4.3.2.2.4 Investigação do estresse oxidativo

4.3.2.2.4.1 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

Foi utilizada metodologia previamente descrita (HASUI et al., 1989 adaptado) que se baseia na oxidadação do reagente 2'7 – dicloro dihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Os animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich foram tratados por nove dias com HE-02 conforme descrito no item 4.3.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O líquido peritoneal foi lavado com PBS a 1000 r.p.m., 4 ºC, durante 5 minutos. Após três repetições desse processo, 2,0 x 10^5 células, 200 µL de solução de DCFH-DA (0,3 mM) e PBS q.s.p. 1mL foram encubados em estufa de CO_2 durante 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3000 r.p.m., 4 °C, durante 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS para leitura em citômetro de Fluxo (FacsCanto II, BD, EUA) em 530 nm de fluorescência e 485 nm de comprimento de excitação. A quantificação do *burst* ou espécies reativas de oxigênio (ROS) foi estimada pela intensidade média de fluorescência.

4.3.2.2.4.2 Quantificação dos níveis de Nitrito

Os níveis de nitrito no líquido peritoneal foram quantificados espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naphthyl-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%, utilizando $NaNO_2$ como padrão (GREEN et al., 1982, adaptado). Para isto, os animais transplantados com células de carcinoma ascítico de foram tratados por nove dias com HE-02, conforme descrito no item 4.3.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O líquido peritoneal foi coletado e centrifugado a 5000 rpm, 20ºC, durante dez minutos. Para montagem das placas, foi adicionado 100 µL do sobrenadante de células em quadruplicada nos poços previamente adicionados da solução de Griess.

Após 10 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/visível de microplacas com filtro de 560nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio. Os testes foram feitos em quadruplicata e os valores expressos em µmolar.

4.3.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich

4.3.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com HE-02, os animais de todos os grupos foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração.

4.3.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich foram tratados por nove dias com HE-02 conforme descrito no item 4.3.2. No dia seguinte após a última administração, após jejum de quatro horas, os animais de todos os grupos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.), e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada.

Para a análise dos parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT) o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Já para as análises hematológicas foi utilizado sangue total heparinizado e realizada avaliação das séries vermelha e branca (eritrograma e leucograma).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se *kits* específicos para o analisador bioquímico automático Flexor EL-200® (Elitech) e o analisador hematológico celular automático Hematoclin 2.8 Vet (Bioclin/ Midray), respectivamente. As extensões sanguíneas foram coradas com coloração panótica e analisadas em microscópio óptico, para realização da contagem diferencial de leucócitos (MOURA et al., 2016).

4.3.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a coleta de sangue descrita no item 4.3.2.3.2, os animais de todos os grupos foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) foram removidos e pesados para o cálculo dos seus índices. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

4.3.2.3.4 Análises histológicas

Após a pesagem dos órgãos, descrita no item 4.3.2.3.3, fígado e rins dos animais dos grupos controle, HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e após 24 horas foram resseccionados para processamento histológico: desidratação

com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático, os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson, este último destinado ao estudo do tecido hepático. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As análises histológicas foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira do Departamento de Morfologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios toxicológicos

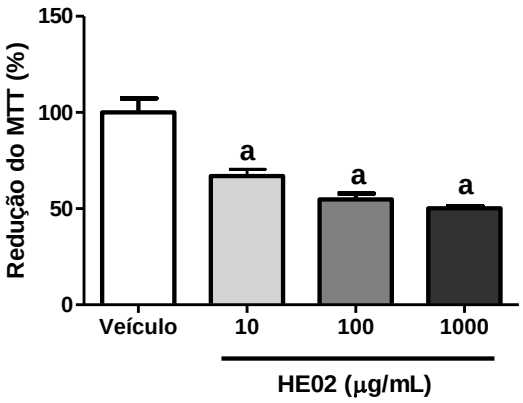
5.1.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos

No ensaio de avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de sangue periférico de camundongos observou-se que HE-02 na concentração de 1000 µg/mL induziu apenas 5,01% de hemólise. Portanto, a sua CI_{50} não foi determinada.

5.1.2 Avaliação da citotoxicidade em linhagem de células RAW264.7

Pode-se observar que HE-02 reduziu a viabilidade de células da linhagem RAW264.7 em 43,10%, 45,22% e 49,75% nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL, respectivamente. Porém, sua CI_{50} não foi determinada, pois a substância não reduziu 50% da viabilidade celular nas concentrações testadas.

Gráfico 1. Citotoxicidade do HE02 em linhagem de macrófagos RAW264.7



*Pré-encubados com veículo e HE02 (0,001 - 1 µM). As células fixadas tiveram sua viabilidade acessada pelo teste de MTT. Barra expressa a média ± erro padrão da média. [a]p<0,05 comparado ao grupo veículo, grupos analisados pelo ANOVA, seguido de Tukey.

5.1.3 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda foi evidenciado que o tratamento inicial com 2000 mg/kg do HE-02 não provocou morte. Seguindo o guia n.423 da OECD, a etapa seguinte foi repetir a dose anterior. Nesta etapa, morreram 2 animais. A partir disso, foi realizado outro experimento com uma dose de 300 mg/kg. Neste ensaio, foi observado que HE-02 não induziu morte nos animais experimentais (Tabela 1). O valor de DL_{50} foi estimado, em torno de 2000 mg/kg e pela classificação GHS, o HE-02 enquadrou-se na categoria 4 da OECD.

Não foram observados efeitos característicos de alterações no sistema nervoso central, em nenhuma das doses avaliadas nos tempos avaliados. Com relação aos efeitos autônomos, houve apenas a presença de diarreia na primeira hora após o tratamento nos animais tratados com a dose de 2000 mg/kg.

Tabela 1 – Efeitos da administração de doses únicas (i.p) do análogo da piperina 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila em camundongos.

Grupo		M/T	Efeitos
Controle		0/3	Nenhum
300 mg/kg		0/3	Nenhum
2000 mg/kg	Experimento 1	0/3	Nenhum
	Experimento 2	2/3	Diarreia

M/T – Morte/Tratado

5.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich

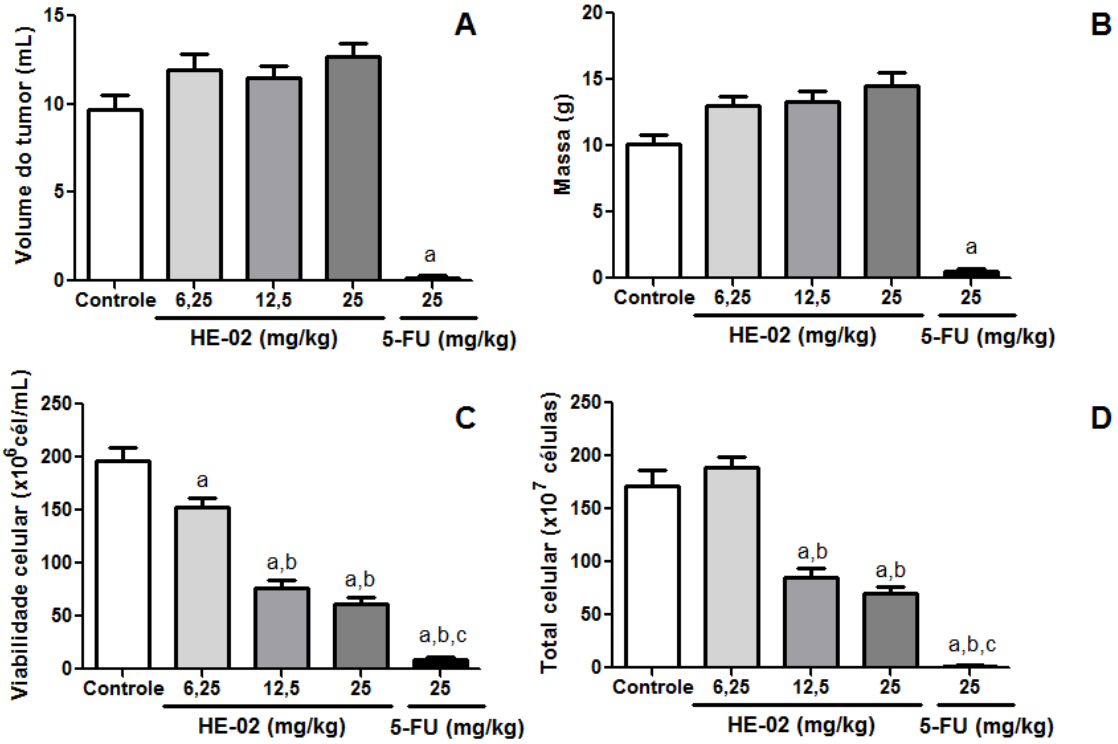
5.2.1 Volume do Tumor, massa tumoral, viabilidade celular e total celular

Pode-se observar que HE-02 não induziu alteração nos parâmetros volume e massa tumoral (Gráfico 2 A e B). Para o 5-FU, observou-se redução significativa do volume (0,17 ± 0,17 mL; $p<0,05$) e da massa tumoral (0,49 ± 0,63 g; $p<0,05$), quando comparados aos respectivos grupos controle (9,67 ± 0,80 mL; 10,11 ± 0,70 g).

HE-02 reduziu significativamente a viabilidade celular nas três doses avaliadas, a saber: 6,25 mg/kg (152,2 ± 8,25 x 10^6 células/mL; $p<0,05$); 12,5 mg/kg (76,62 ± 7,30 x 10^6 células/mL; $p<0,05$); e 25 mg/kg (61,77 ± 5,33 x 10^6 células/mL; $p<0,05$), assim como o 5-FU (9,32 ± 2,76 x 10^6 células/mL; $p<0,05$), quando comparados ao grupo controle (196,1 ± 12,42 x 10^6 células/mL) (Gráfico 2 C).

Por fim, a avaliação do total celular mostrou que HE-02 reduziu significativamente este parâmetro nas doses de 12,5 mg/kg (85,28 ± 8,10 x 10^7 células; $p<0,05$) e 25 mg/kg (69,99 ± 6,65 x 10^7 células; $p<0,05$), bem como o 5-FU (1,82 ± 0,61 x 10^7 células; $p<0,05$), quando comparados ao grupo controle (170,8 ± 15,87 x 10^7 células) (Gráfico 2 D).

Gráfico 2 - Efeito do tratamento com HE-02 e 5-FU em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



A: Volume Tumoral. **B**: Massa tumoral. **C**: Viabilidade celular. **D**: Total celular. Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais. [a]p < 0,05 dados analisados em comparação ao grupo controle por ANOVA seguido de Tukey [b]*p* < 0,05 dados analisados comparando os grupos tratados ao tratado na dose de 6,25 mg/kg por ANOVA seguido de Tukey. [c]*p* < 0,05 dados analisados da droga padrão 5-FU em comparação aos grupos tratados por ANOVA seguido de Tukey.

5.2.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral

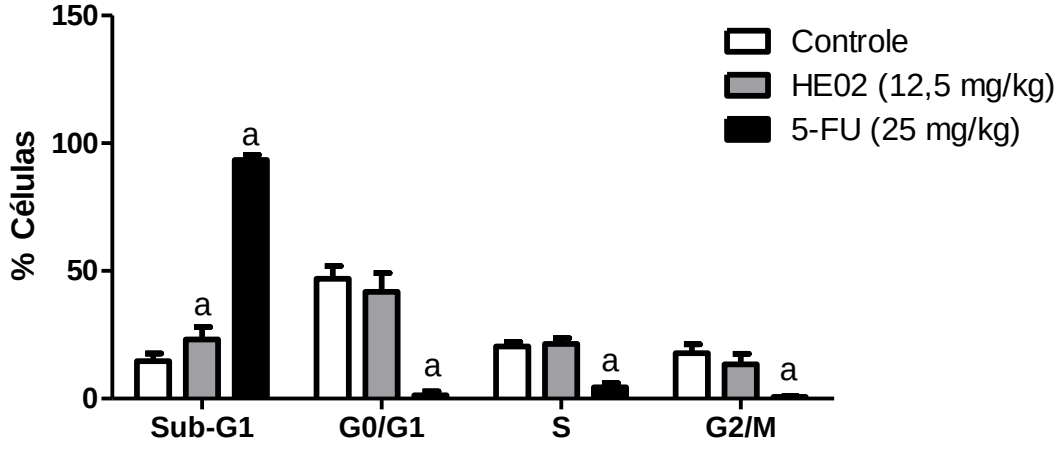
5.2.2.1 Análise do ciclo celular

O tratamento com HE-02 (12,5 mg/kg) não induziu alterações significativas nas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M), quando comparadas aos seus respetivos grupos controle. Foi observado apenas que HE-02 induziu um aumento no pico sub-G1 (23,17 ± 4,84% células; p<0,05), em comparação ao grupo controle (14,64 ± 3,02% células).

A droga padrão 5-FU (25 mg/kg) aumentou o percentual de células no pico sub-G1 para 93,43 ± 2,06% células (p<0,05), quando comparado ao grupo controle (14,64 ± 3,02% células), ao passo que reduziu significativamente o

percentual de células nas fases G0/G1 (1,36% células, p<0,05), S (4,40% células, p<0,05) e G2/M (0,69% células, p<0,05), quando comparados aos seus respetivos grupos controle (G0/G1: 45,70% células; S: 20,44% células; e G2/M: 18,55% células) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Percentagem de células de CAE nas fases do ciclo celular após tratamento com solução 12% tween 80 (controle) e do HE02 (12 mg/kg).

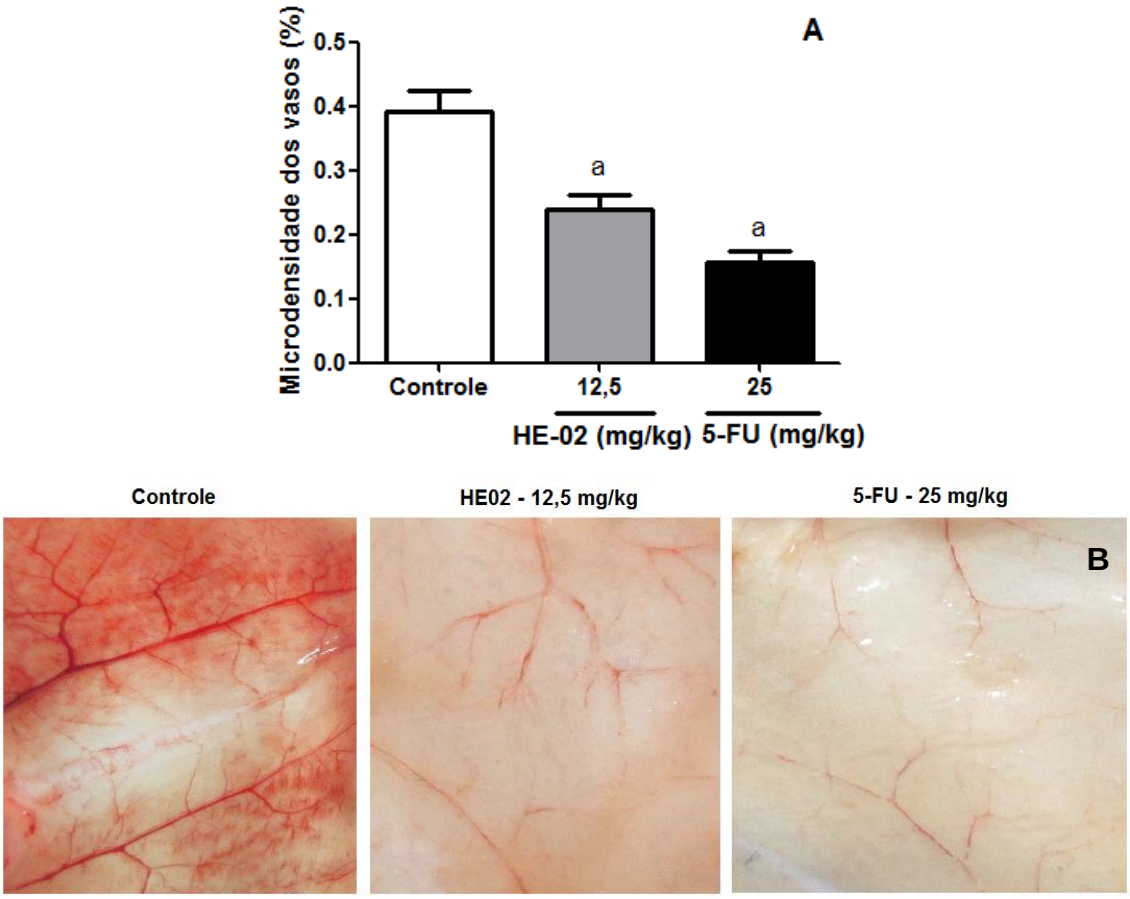


*Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido de Tukey.
[a]*p* < 0,05 comparado ao grupo controle.

5.2.2.2 Avaliação do efeito antiangiogênico

HE-02 (12,5 mg/kg) induziu redução na microdensidade dos vasos peritumorais (0,24 ± 0,02%; p<0,05), assim como a droga padrão 5-FU (0,16 ± 0,02%; p<0,05), quando comparados ao grupo controle (0,39% ± 0,03%) (Figura 9).

Figura 9 - Efeito do tratamento com o HE02 e 5-FU na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com CAE



A: Percentual de microdensidade dos vascular. Determinado pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada. **B**: Membrana peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. Dados apresentados como média ± desvio padrão de seis animais analisado por ANOVA seguido de Dunnett. [a]$p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.2.2.3 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal

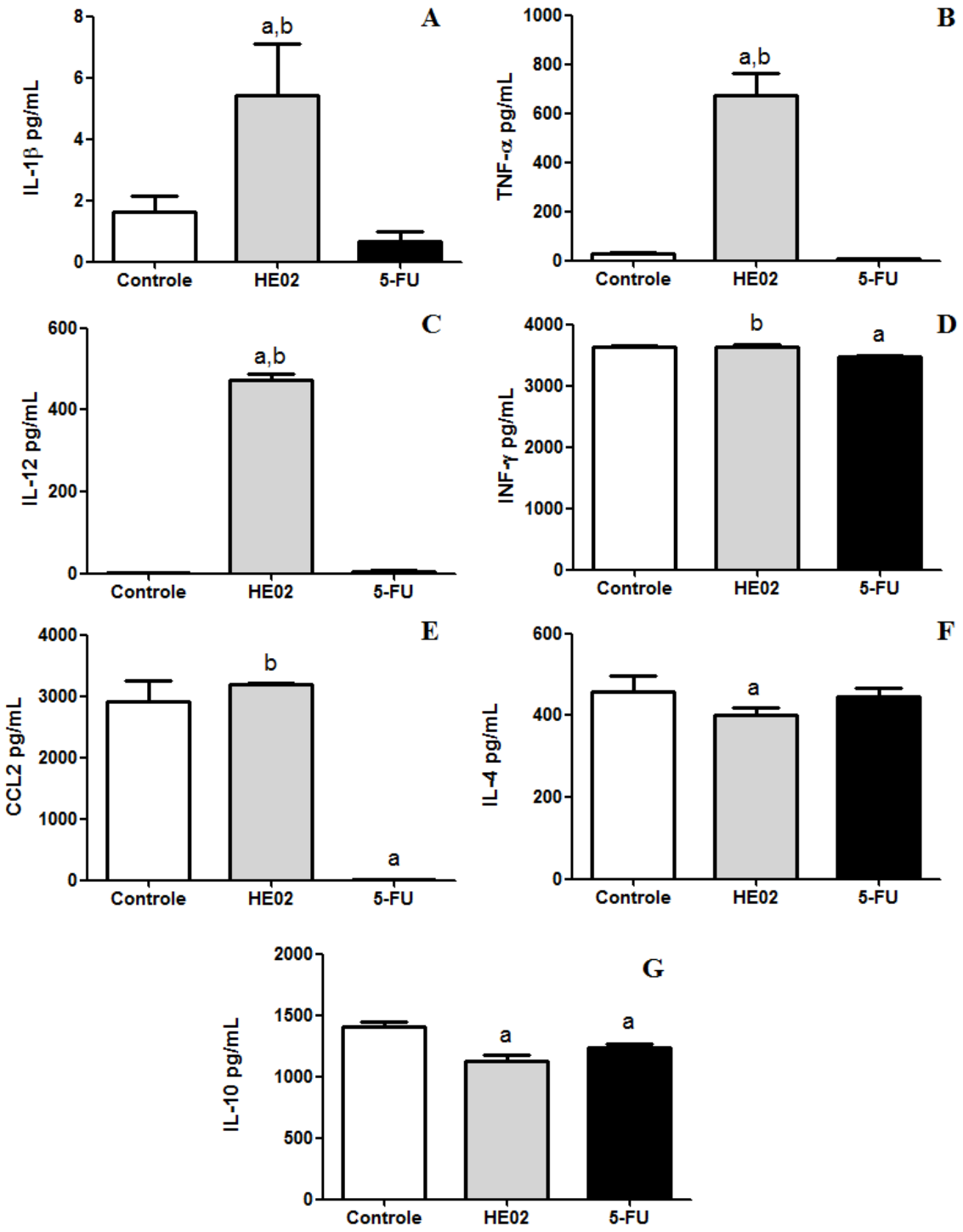
Pode-se observar alterações nas concentrações de algumas citocinas pró-inflamatórias. A IL-1β apresentou aumento de concentração nos animais tratados com HE02 na dose de 12,5 mg/kg (5,42 ± 1,71 pg/mL; p<0,05) quando comparada ao grupo controle (1,62 ± 0,54 pg/mL). HE02 também induziu aumento significativo da IL-12 (472,72 ± 16,70 pg/mL; p<0,05) quando comparado ao grupo controle (1,92 ± 0,48 pg/mL). Com relação ao TNF-α, houve também aumento da sua concentração após tratamento com HE02 (672,5 ± 89,91 pg/mL; p<0,05) quando comparado ao grupo controle (29,24

± 5,83 pg/mL). O 5-FU não foi capaz de alterar significativamente as concentrações das citocinas anteriormente descritas.

Não houve diferença significante nas concentrações de CCL2 nos animais tratados com HE02 na dose de 12,5 mg/kg (3200 ± 7,76 pg/mL; $p<0,05$) quando comparado ao grupo controle (2907 ± 196 pg/mL), entretando ocorreu diminuição dos níveis de CCL2 para os animais tratados com 5-FU (15,81 ± 2,89 pg/mL; $p<0,05$). Além desta, também não houve alteração significante nas concentrações de INF-γ nos animais tratados com HE02 (3642 ± 29,41 pg/mL; $p<0,05$) quando comparado ao grupo controle (3627 ± 28,29 pg/mL), havendo no entanto redução significante de INF-γ nos animais tratados com 5-FU (3474 ± 21,50 pg/mL; $p<0,05$).

Com relação as citocinas anti-inflamatórias, houve diminuição na concentração de IL-10 do grupos tratados com HE02 (1131 ± 42,52 pg/mL; $p<0,05$) e tratado com 5-FU (1238 ± 32,05 pg/mL; $p<0,05$) quando comparado ao grupo controle (1410 ± 37,25 pg/mL). Além desta, a IL-4 também apresentou diminuição de sua concentração nos animais tratados com HE02 (400,6 ± 18,19 pg/mL; $p<0,05$) quando comparado ao grupo controle (456,9 ± 16,67 pg/mL) (Gráfico 4).

Gráfico 4. - Concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos



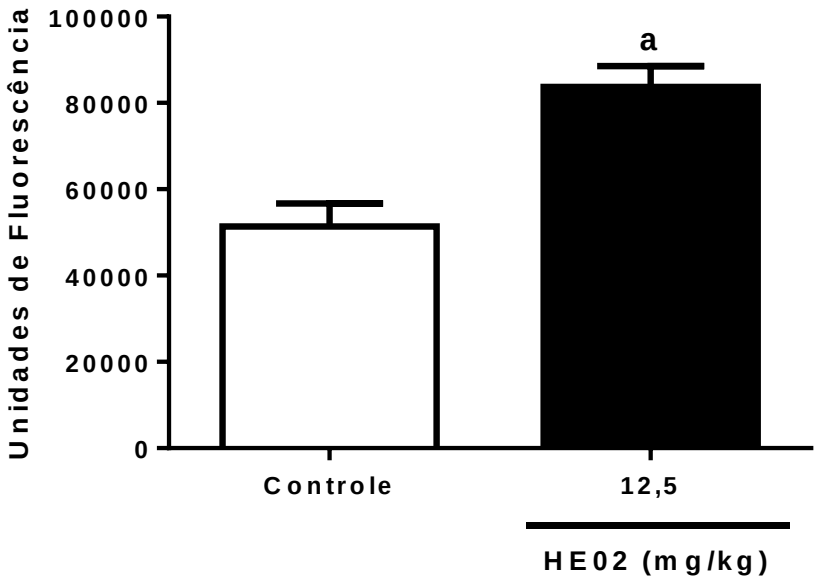
*Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Dunnett. [a]$p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.2.2.4 Investigação do estresse oxidativo

5.2.2.4.1 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

Pode-se observar no Gráfico 5 que HE-02 (12,5 mg/kg) aumentou a produção de ROS (83680 ± 4840 unidades de fluorescência; p<0,05), em comparação ao grupo controle (51360 ± 5372 unidades de fluorescência).

Gráfico 5 – Produção de espécies reativas de oxigênio após tratamento com HE-02 (12,5 mg/kg).

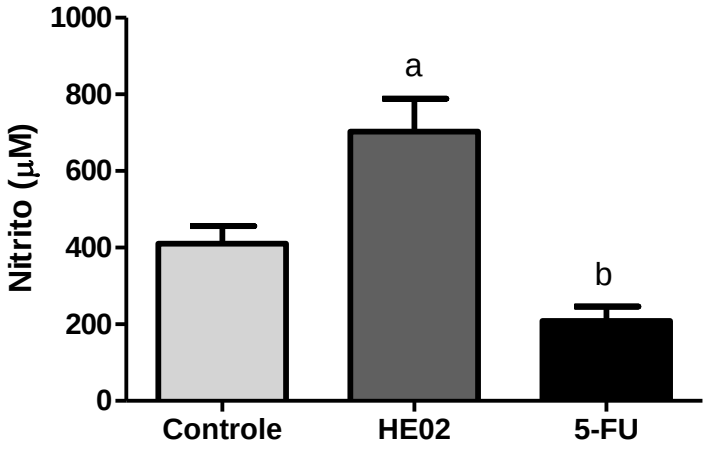


Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisados aos pares por Teste Mann Whitney.
[a]p < 0,05 comparado ao grupo controle.

5.2.2.4.2 Quantificação de níveis de nitrito

Para o grupo tratado com 12,5 mg/kg de HE-02, observou-se aumento significativo na concentração de nitrito (703 ± 85,44 µM; p<0,05) em comparação ao grupo controle (410,4 ± 38,66 µM). Já o 5-FU (25 mg/kg) não induziu alteração significativa na concentração de nitrito (209,1 ± 37,05 µM; p<0,05) (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Quantificação de nitrito do fluido peritoneal dos animais controle e tratados com HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg).



Dados apresentados como média ± erro padrão da média dos animais analisados. Os dados foram apresentados por ANOVA seguido de Dunnett e Tukey. [a]$p < 0,05$ comparado ao grupo sadio; [b]$p<0,05$ comparado ao grupo controle. [c]$p<0,05$ comparado ao 5-FU.

5.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich

5.2.3.1 Avaliação do consumo de água e ração

Na tabela 2 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e de ração, avaliados durante os nove dias de tratamento com HE-02.

De acordo com os resultados obtidos, foi observado que HE-02 (12,5 mg/kg) reduziu significativamente o consumo de água (32,27 ± 6,84 mL, p<0,05), quando comparado ao grupo controle (38,82 ± 6,25 mL).

Em relação ao consumo de ração, é possível observar que o tratamento com HE-02 induziu redução significativa desse parâmetro (18,15 ± 2,84 g; p<0,05), em comparação ao grupo controle (31,06 ± 4,64 g).

Essa diminuição no consumo foi refletida no peso final dos animas, onde os animais tratados com HE02, tiveram redução significativa de seu peso (23,22 ± 0,40 g; p<0,05), quando comparado ao grupo controle (30,71 ± 0,72 g).

Para a droga padrão 5-FU, observou-se aumento significativo no consumo de ração (35,93 ± 6,69 g; p<0,05), em comparação ao grupo controle (31,06 ± 4,64 g). Também houve redução do peso dos animais tratados com 5-FU (26,69 ± 0,98 g; *p*<0,05), quando comparado ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2 - Consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg).

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	38,82±6,25	31,06±4,64	31,50±0,45	30,71±0,72
HE-02	12,5	32,27±6,84[a]	18,15±2,84[a]	30,88±0,82	23,22±0,40[a]
5-FU	25	38,36±3,93	35,93±6,69[a]	32,00±0,62	26,69±098[a]

Dados apresentados como média ± erro padrão da média, analisados por ANOVA seguido de Dunnett e Tukey. [a]p < 0,05 dados analisados em comparação com grupo controle.

5.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Observou-se um aumento significativo da concentração de ureia no sangue dos animais do grupo tratado HE-02 (55,00 ± 5,30 mg/dL; p<0,05), em comparação ao controle (36,83 ± 3,46 mg/dL) (Tabela 3). Não foram observadas alterações nos níveis de creatinina em nenhum dos grupos experimentais.

Em relação à avaliação da função hepática, não foram observadas alterações significativas para os parâmetros ALT e AST em nenhum dos grupos tratados com HE-02 ou com a droga padrão (5-FU).

Tabela 3- Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg).

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Normais*		70 – 400	25 – 100	15 – 40	0,2 – 0,6
Controle		181,80±25,28	25,33±3,84	36,83±3,46	0,24±0,1
HE-02	12,5	247,80±45,19	21,75±2,32	55,00±5,30[a]	0,31±0,03
5-FU	25	155,20±20,78	22,33±4,55	37,80±1,71	0,26±0,01

Dados apresentados como média ± erro padrão da média dados analisados por por ANOVA seguido de Dunnet e Tukey.
[a]*p* < 0,05 dados analisados em comparação com grupo controle
*Parâmetros bioquímicos normais segundo GAD 2007.

No que diz respeito à avaliação hematológica não foram observadas alterações na contagem total de eritrócitos quando comparados aos valores dos grupos controle ou sadio. Com relação à concentração de hemoglobina, foi observado redução significativa no grupo controle (11,59 ± 0,24 g/dL; p<0,05) e no grupo tratado com HE-02 (11,28 ± 0,31 g/dL; p<0,05), e também para o 5-FU (10,88 ± 0,31g/dL; p<0,05), em comparação ao grupo sadio (13,14 ± 0,30 g/dL) (Tabela 4).

Ainda, observou-se que o percentual de hematócrito foi reduzido no grupo controle (38,71 ± 1,09%; p<0,05), e nos grupos tratados com HE-02 (37,17 ± 1,84%; p<0,05) e 5-FU (34,47 ± 1,39%; p<0,05), em comparação ao grupo sadio (47,00 ± 1,12%) (Tabela 3).

Em relação aos parâmetros hematimétricos, não houve nenhuma alteração significativa após tratamento com HE-02 ou 5-FU.

Em relação ao leucograma, pode-se observar que HE-02 induziu aumento nos leucócitos totais (24,70 ± 2,65 10^3/µL; p<0,05), em comparação aos grupos sadio (10,88 ± 1,00 10^3/µL) e controle (11,04 ± 0,73 10^3/µL).

Ainda, é possível observar que HE-02 induziu redução no percentual de linfócitos (31,20 ± 2,13; p<0,05), e aumento no percentual de neutrófilos (67,40 ± 1,48%; p<0,05), em comparação aos seus respectivos grupos sadios

(linfócitos: 76,50 ± 4,19%; neutrófilos: 23,50 ± 1,94%) e controles (linfócitos: 77,00 ± 3,44%; neutrófilos: 19,80 ± 0,49%).

O 5-FU induziu redução de leucócitos totais (4,62 ± 0,36 10^3/µL; p<0,05) em comparação aos grupos sadio (10,88 ± 1,00 10^3/µL) e controle (11,04 ± 0,73 10^3/µL). Além disso, observou-se aumento no percentual de linfócitos (92,33 ± 0,67%; p<0,05) e redução no percentual de neutrófilos (5,83 ± 0,48%; p<0,05), em comparação aos grupos sadio (linfócitos: 76,50 ± 4,19%; neutrófilos: 23,50 ± 1,94%) e controles (linfócitos: 77,00 ± 3,44%; neutrófilos: 19,80 ± 0,49%).

Tabela 4- Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), HE02 (6,25; 12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg).

Parâmetro	Parâmetros normais	Sadio	Controle	HE02 (12,5 mg/kg)	5-FU (25 mg/kg)
Eritrócitos (10^6/mm^3)	9,0 – 11,5	8,98±0,21	7,91±0,18	7,31±0,29	7,33±0,22
Hemoglobina (g/dL)	14,5 – 17,5	13,14±0,30	11,59±0,24[a]	11,28±0,31[a]	10,88±0,31[a]
Hematócrito (%)	45,0 – 57,0	47,00±1,12	38,71±1,09[a]	37,17±1,84[a]	34,47±1,39[a]
VCM (fm^3)	45,0 – 55,0	52,19±0,62	50,19±1,10	50,66±1,42	47,17±1,15
HCM (pg)	13,0 – 16,0	14,53±0,32	14,99±0,40	15,34±0,22	15,02±0,49
CHCM (g/dL)	29,0 – 34,0	27,84±0,50	30,11±0,91	30,63±0,94	31,43±1,29
Leucócitos Totais (10^3/mm^3)	1,0 – 12,0	10,88±1,00	10,88±0,73	24,70±2,65[a,b]	4,62±0,36[a]
Linfócitos (%)	60 – 90	76,50±4,19	77±3,44	31,20±2,13[a,b,c]	92,33±0,67[a,b,c,d]
Segmentados (%)	10 – 40	23,50±1,94	19,80±0,49	67,40±1,48[a,b,c]	5,83±0,48[a,b,c,d]
Monócitos (%)	0 – 6	1,75±0,25	1,60±0,24	1,40±0,24	1,20±0,37
Eosonófilos	0 - 5	0±0	0±0	0±0	0±0

Dados apresentados como média ± erro padrão da média, analisados por ANOVA seguido de Dunnet e Tukey.
[a]*p* < 0,05 dados em comparação com grupo sadio.
[b]*p* < 0,05 dados em comparação com o grupo controle
[c]p < 0,05 dados em comparação com o grupo HE02 dose 6,25 mg/kg.
[d]p < 0,05 dados em comparação com o grupo HE02 dose 12,5 mg/kg

5.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Na Tabela 8 estão expressos os valores referentes aos índices dos órgãos dos animais após nove dias de tratamento com HE-02.

Nenhuma alteração significante foi observada no índice do coração e fígado após tratamento com HE-02, no entanto o 5-FU aumentou o índice do coração (4,05 ± 0,08 mg/g; p<0,05) quando comparado ao grupo controle (3,48 ± 0,10 mg/g), e do fígado (58,96 ± 1,41 mg/g; p<0,05), quando comparado ao grupo controle (67,23 ± 1,84 mg/g).

Em nenhum dos grupos tratados com HE02 e 5-FU foram observadas alterações no índice dos rins.

Foi observado diminuição significativa no índice do timo no grupo tratado com HE-02 (2,02 ± 0,22 mg/g; p<0,05) e também no grupo tratado com 5-FU (2,08 ± 0,12 mg/g; p<0,05), quando comparados ao grupo controle (3,23 ± 0,16 mg/g).

Com relação ao índice do baço, foi observada redução significante no grupo tratado com HE02 (3,22 ± 0,23 mg/g; p<0,05). Além disso, também foi observada alteração do índice do baço nos animais do grupo tratado com 5-FU (5,43 ± 0,63 mg/g; p<0,05), em comparação ao grupo controle (5,38 ± 1,60 mg/g).

Os dados de índice dos órgãos estão representados na tabela 4.

Tabela 5- Índices dos órgãos de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), HE02 (6,25; 12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg).

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)
Controle		3,48±0,10	67,23±1,84	10,58±0,24	3,23±0,16	5,38±0,38
HE02	12,5	3,13±0,12	71,80±1,36	9,75±0,24	2,02±0,22[a]	3,22±0,23[a]
5-FU	25	4,05±0,08[a]	58,96±1,41[a]	10,56±0,44	2,08±0,12[a]	5,43±0,18

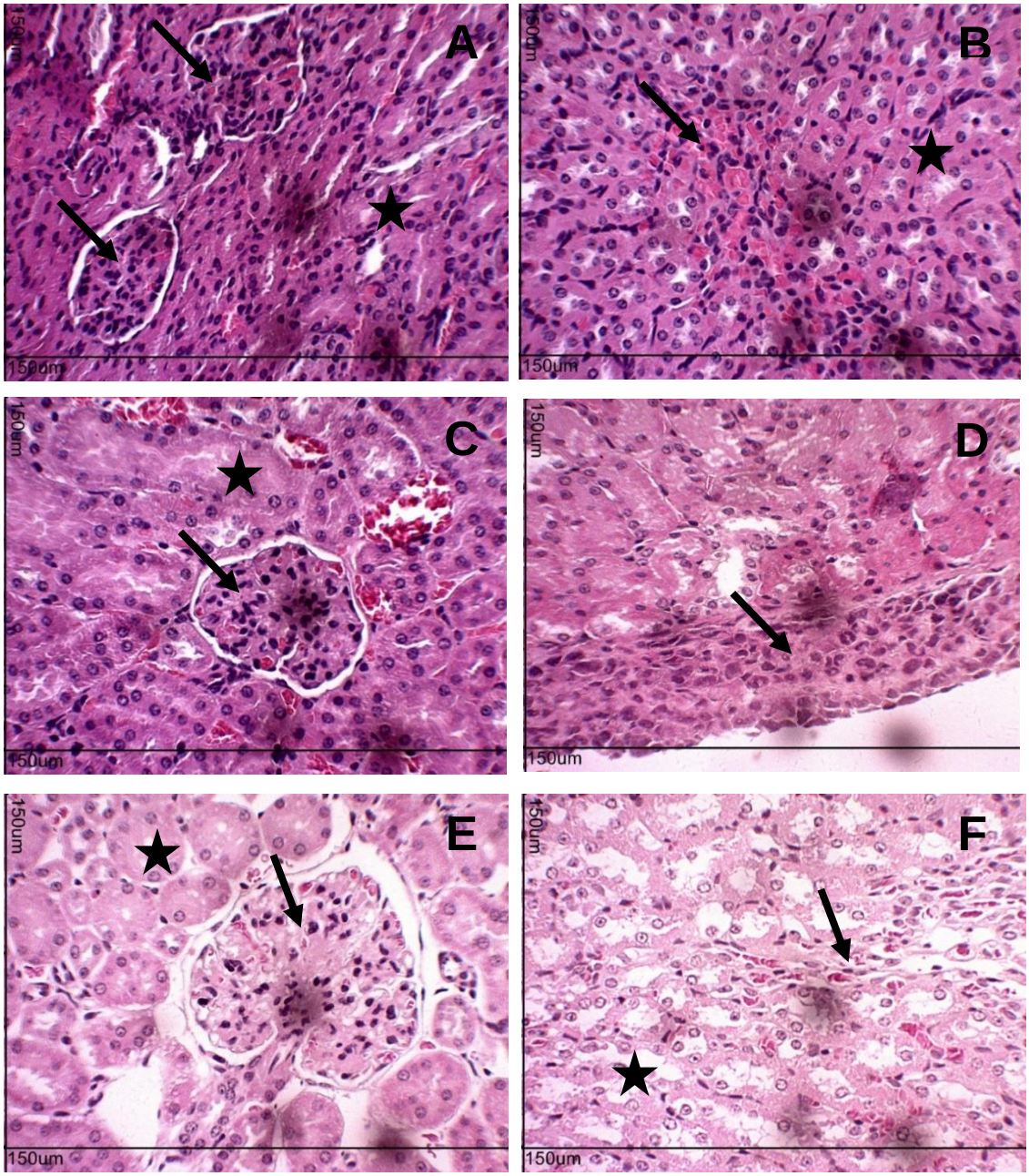
Dados apresentados como média ± erro padrão da média, analisados por ANOVA seguido de Dunnett e Tukey.
[a]*p* < 0,05 dados analisados em comparação com grupo controle

5.2.3.4 Análises histológicas

As análises dos cortes histológicos dos rins dos grupos controle transplantado e tratados com HE-02 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) apresentaram-se dentro dos limites de normalidade histológica (Figura 5).

Os lobos renais do grupo controle apresentavam-se conservados com corpúsculos renais (corpúsculo de Malpighi) e labirinto cortical preservados como demonstrado na Figura 10A. Na região medular, as alças de Henle, os ductos coletores, túbulos coletores e vasos retos se apresentavam preservados (Figura 10B). As artérias e veias interlobares encontravam-se regularmente distribuídas. Os animais do grupo 5-FU apresentaram parênquima glomerular e labirinto cortical conservados (Figura 10C), e região medular preservada. No grupo HE-02 (12,5 mg/kg) foi observada a presença de intenso infiltrado celular abaixo da cápsula renal (Figura 10D). Os lóbulos renais estavam conservados com glomérulos preservados, envolvidos por fina cápsula de Bowmann (folheto visceral e folheto parietal) e sustentados por células mesangiais (Figura 10E). O labirinto cortical, os túbulos contorcidos proximais e distais (Figura 10E), alça de Henle, ductos e túbulos coletores estavam revestidos por epitélio com altura variável, de colunar a pavimentoso, típico do tecido renal (Figura 10F).

Figura 10. Efeito do tratamento de nove dias com HE-02 (12,5 mg/kg, i.p.) e 5-FU (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

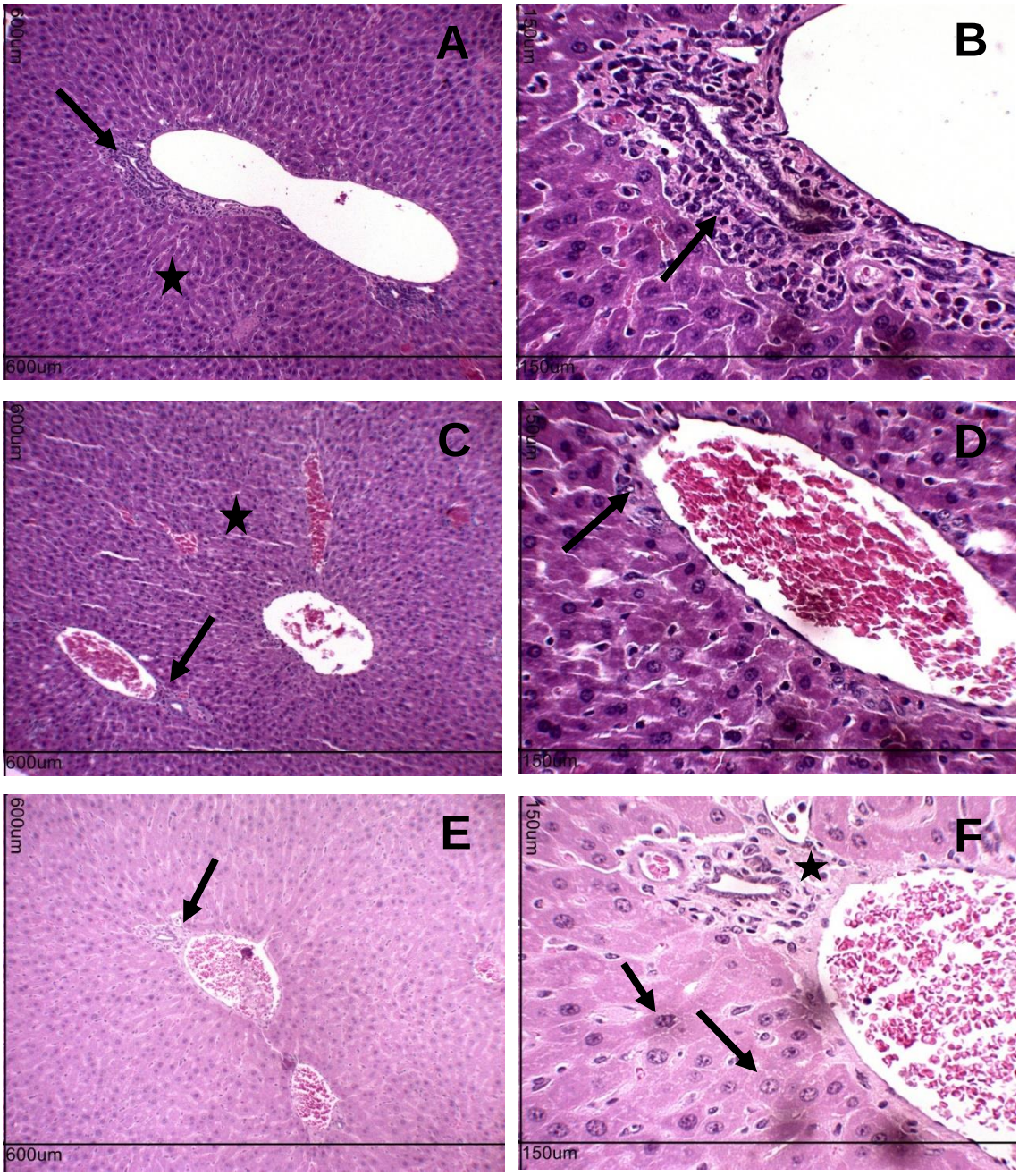


Controle, 5FU 25 mg/kg e HE-02. **(A)** Controle transplantado, região cortical, glomérulo renal (seta) e labirinto cortical (estrela). **(B)** Controle transplantado, região medular, túbulos coletores (estrela), alça de Henle e vasos retos (seta). **(C)** Grupo 5FU, região cortical, glomérulo (seta) e labirinto cortical (estrela). **(D)** Grupo HE02, região subcapsular, infiltrado celular (seta). **(E)** Grupo T12,5, região cortical, corpúsculo renal (seta) e labirinto cortical (estrela). **(F)** Grupo HE02, região medular, alça de Henle e raios medulares (seta), túbulos coletores (estrela). A, B, C, D, E e F – HE, A.T. x400.

Em relação à análise histológica do fígado, as lâminas dos animais do grupo controle apresentaram a estrutura lobular preservada, espaços portais regularmente distribuídos contendo tríades hepáticas (ducto biliar, ramos da veia

porta e ramo da artéria hepática) e hepatócitos distribuídos em placas (Figura 11A). O espaço de Möll - entre a tríade hepática – apresentou infiltrado celular (Figura 11B). O infiltrado celular diminuiu no grupo tratado com 5-FU na dose de 25 mg/kg (Figuras 11C e 11D). O grupo tratado com HE-02 (12,5 mg/kg) apresentou diminuição do infiltrado celular no espaço porta, congestão nos ramos da veia porta e hepatócitos com variação no tamanho nuclear e na coloração nuclear e citoplasmática.

Figura 11. Efeito do tratamento de nove dias com HE-02 (12,5 mg/kg, i.p.) e 5-FU (25 mg/kg, i.p.) na histologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

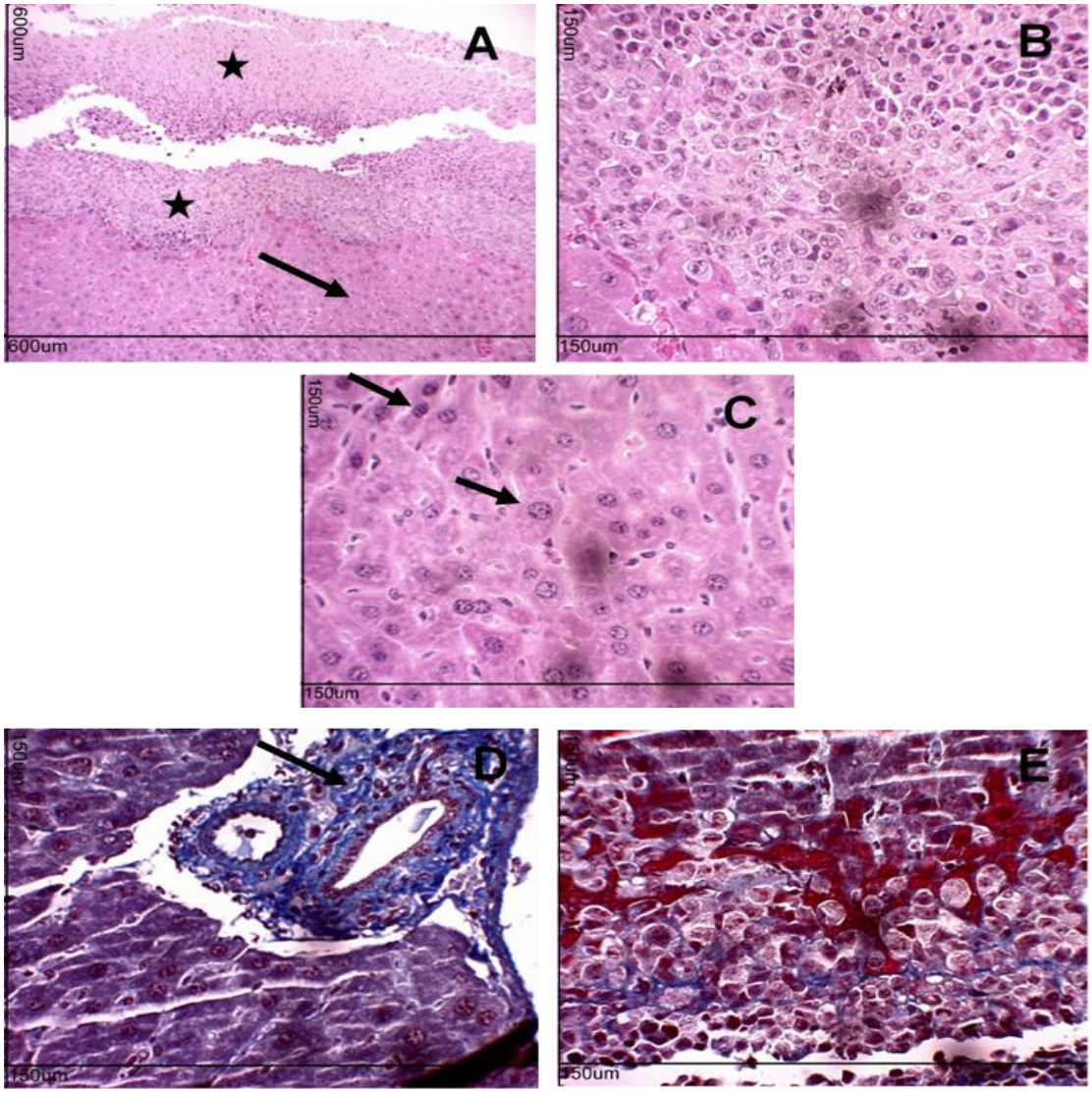


Controle, 5FU 25 mg/kg e HE02. Grupo controle: **(A)** tríade hepática, infiltrado celular (seta), placas de hepatócitos (estrela), **(B)** tríade hepática, infiltrado celular em volta do ducto hepático (seta); 5FU: **(C)** tríade hepática, infiltrado celular (seta) e placas de hepatócitos (estrela), **(D)** infiltrado celular em volta do ramo da veia porta (seta); T100: **(E)** espaço porta, infiltrado celular (seta), **(F)** tríade hepática, infiltrado celular (estrela) e hepatócitos com diferente tamanho nuclear e coloração citoplasmática (seta). A, C e E – HE, A.T. x100. B, D e F – HE, A.T. x400.

Infiltrado celular na região subcapsular da cápsula de Glisson (cápsula hepática) (Figura 12A) com presença de células mononucleares e células em apoptose formando corpos apoptóticos (Figura 12B). Hepatócitos apresentando alterações no tamanho do núcleo e na afinidade aos corantes observada pela alteração na coloração do citoplasma e do núcleo dos hepatócitos (Figura 12C).

Infiltrado celular no espaço porta (Figura 12D). O infiltrado leucocitário observado abaixo da cápsula de Glisson apresentou características de células mononucleares e hepatócitos em apoptose formando os corpos apoptóticos (Figura 12E).

Figura 12. Efeito do tratamento de nove dias com HE-02 (12,5 mg/kg, i.p.) e 5-FU (25 mg/kg, i.p.) na histologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



(A) infiltrado celular na região subcapsular (estrela) e placa de hepatócitos (seta); **(B)** infiltrado celular subcapsular caracterizado pela presença de macrófagos e hepatócitos em apoptose; **(C)** hepatócitos com afinidade variada aos corantes tanto nuclear quanto citoplasmática e alteração no tamanho nuclear (seta); **(D)** infiltrado celular no espaço porta (seta) e **(E)** infiltrado celular subcapsular com hepatócitos em apoptose e presença de macrófagos (estrela). A, B, C, D e E – HE, A.T. x400.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Considerando o potencial farmacológico da piperina, análogos desse composto vêm sendo sintetizados na perspectiva de potencializar a sua atividade antitumoral, bem como reduzir sua toxicidade. Nesse sentido, no presente trabalho, o análogo sintético inédito da piperina 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE-02), foi testado em relação a toxicidade e atividade antitumoral em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Inicialmente foi realizado o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos de camundongos, que permite avaliar o potencial de um fármaco de causar danos a membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou alteração na permeabilidade da célula (SALES et al., 2015). Além disso, sabe-se que os eritrócitos são células alvos da citotoxicidade de fármacos antineoplásicos, tais como bleomicina e gencitabina, que estão associados a hemólise secundária à terapêutica, além de púpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítica urêmica (MIMS et al., 2012). A partir dessa problemática, esse teste representa um importante modelo de avaliação da citotoxicidade de novos candidatos a fármacos antitumorais.

Tendo em vista que a CH_{50} do HE-02 não foi determinada, considerando o baixo percentual de hemólise produzido, pode-se inferir que HE02 não induziu danos na membrana celular, produzindo baixa citotoxicidade em eritrócitos de camundongos. Em comparação com os dados da literatura, um estudo realizado por Bezerra e colaboradores (2005) demonstrou que a piperina não foi capaz de induzir hemólise em camundongos até a concentração de 200 µg/mL.

Em seguida, a citotoxicidade do HE02 foi avaliada em linhagem de macrófagos RAW264.7 por meio do ensaio do MTT (KOH et al., 2010). O ensaio do MTT é amplamente utilizado para avaliação de estudos de toxicidade, viabilidade e proliferação celular, considerando que o MTT deve ser reduzido nas mitocôndrias formando o formazan, pela succinato desidrogenase em células viáveis, tornando-se um método confiável para avaliação da viabilidade celular (STOCKERT et al., 2012). Apesar da CI_{50} do HE02 não ter sido determinada, pode-se observar que a substância induziu citotoxicidade já a partir da menor concentração testada (10 µg/mL), indicando um efeito citotóxico moderado

nesse tipo celular. Para a piperina, dados da literatura demonstram que essa substância não induziu citotoxicidade em células RAW 264.7 em concentrações até 100 µg/mL (YING et al., 2013).

Os estudos *in vivo* com o HE02 iniciaram-se com o ensaio de toxicidade pré-clínica aguda em camundongos, com o objetivo de determinar doses seguras a serem utilizadas nos ensaios farmacológicos. Além disso, essa investigação é necessária para verificar uma possível toxicidade do composto, uma vez que, é a primeira etapa no estudo de toxicidade não clínica para a seleção de novos candidatos a fármacos (IMINJAN et al., 2014). Ainda, no estudo de toxicidade aguda foi realizada a triagem psicofarmacológica, que representa um teste preliminar de fácil execução, com objetivo de detectar de forma qualitativa algumas importantes ações do HE02 sobre o SNC e SNA (ALMEIDA et al., 1999).

Considerando a DL_{50} em torno de 1000 mg/kg, a classificação na categoria 4 de acordo com o GHS, bem como o fato de que o único efeito observado, a diarreia, desapareceu após 4 horas do tratamento com a maior dose testada (2000 mg/kg), pode-se inferir que HE02 possui baixa toxicidade pré-clínica aguda em camundongos, por via intraperitoneal.

Ainda, dados da literatura mostram que, em geral, se a DL_{50} de uma substância é três vezes maior do que a dose mínima eficaz, a substância é considerada como um bom candidato para estudos posteriores (ODEGHE; UWAKWE; MONAGO, 2012; AMELO; NAGPAL; MAKONNEN, 2014).

Em comparação com a literatura, o HE02 demonstrou menor toxicidade quando comparado com a piperina, para a qual a DL_{50} foi em torno de 43 mg/kg (i.p.) para machos e 60 mg/kg para fêmeas de camundongos Swiss. Além disso, a maioria dos camundongos tratados com a piperina morreram em até 14 minutos após a administração. Ainda, diferentemente do HE02, a piperina induziu alterações significativas em nível de SNC, sendo evidenciado excitação, hiperatividade e convulsão (PIYACHATURAWAT; GLINSUKIN; TOSKULKAO, 1983).

Com relação ao análogo da piperina HE03, a DL50 foi estimada em 5000 mg/kg e este composto foi classificado na categoria 5 de acordo com o GHS, no entanto, ele induziu alterações no SNC, como contorções abdominais e abdução

das patas do trem posterior, e também do SNA, como força para agarrar reduzida (SOUSA, 2015). Assim, os dados para o HE02, em conjunto, demonstram a segurança toxicológica do composto, permitindo a escolha das doses utilizadas na avaliação da atividade antitumoral *in vivo*.

Para a realização dos ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizou-se a linhagem de Carcinoma ascítico de Ehrlich, um carcinoma indiferenciado e originalmente hiperdiploide, com alta capacidade de transplante, não regressivo, de rápida proliferação, curto tempo de vida, 100% maligno e não apresenta o antígeno de transplante tumor específico (TSTA), antígeno presente em alguns tipos de tumores responsável pelo reconhecimento das células tumorais pelo sistema imune. Nesse modelo, o acúmulo de fluido ascítico se dá paralelamente a proliferação das células tumorais, além disso, esse modelo é semelhante a tumores humanos (OZASLAN et al., 2011). Ele tem sido bastante utilizado como modelo de neoplasia experimental *in vivo* para investigar efeitos antineoplásicos de muitas substâncias (VIEIRA et al., 2010).

O fármaco padrão utilizado neste ensaio foi o antimetabólito 5-FU. Os antimetabólitos atuam inibindo processos biossintéticos essenciais para a síntese de DNA e RNA. O 5-FU é um análogo da uracila com um átomo de flúor na posição C-5 no lugar do hidrogênio. O 5-FU é convertido intracelularmente em vários metabólitos ativos: monofosfato de fluorodesoxiuridina Trifosfato (FdUMP), fluorpdesoxiuridina Trifosfato (FdUTP) e fluoruridina trifosfato (FUTP), esses metabólitos interferem na síntese de RNA e inibem a timidalato sintetase. A timidalato sintetase catalisa a metilação redutiva do monofosfato de desoxiuridina (dUMP) em monofosfato de soxitimidina (dTMP), sendo essa redução a única fonte de timidalato disponível para a replicação e reparo do DNA (LONGLEY et al., 2003).

Após nove dias de tratamento com HE02, pode-se observar que não houve alteração nos parâmetros volume e massa tumorais, o que sugere que HE02 não foi capaz de reverter a ascite peritoneal induzida pelo tumor. Porém, foi observada significativa inibição do crescimento tumoral considerando os parâmetros viabilidade celular e total celular, especialmente para as doses de 12,5 e 25 mg/kg. Todavia, como não foi observado diferença significativa entre estas doses, para a avaliação dos possíveis mecanismos de ação de HE02 foi

selecionada a dose de 12,5 mg/kg, considerando que foi a menor dose que produziu o efeito máximo.

Dados da literatura mostram que alcaloides do gênero *Piper* apresentam significante atividade antitumoral *in vivo* frente a linhagem celular de Sarcoma 180, nesses estudos a piperlonguminina apresentou atividade antitumoral na dose de 25 mg/kg e a piperina e pirplatina na dose de 50 mg/kg (BEZERRA et al., 2006; BEZERRA et al., 2008). Em estudo realizado por Sunila e colaboradores (2003) foi demonstrado que o extrato etanólico de *Piper longum* e a piperina, em modelo de tumor sólido de Linfoma de Dalton ascítico em animais BALB/c, foram capazes de reduzir significativamente o volume do tumor. Ainda, Lai e colaboradores (2012), demonstraram que a piperina foi capaz de inibir o crescimento tumoral em modelo de carcinoma mamário 4T1 em camundongos.

Com relação aos tumores humanos, a piperina foi capaz de induzir citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7 que superexpressam HER2 (Receptor do Fator de Crescimento epidérmico Humano 2) (DO et al., 2013). Além disso, a piperina também foi capaz de inibir o crescimento das linhagens LNCaP, DU145 e PC-3, além de ter efeito sobre a linhagem de RWPE-1, todas linhagens de tumores prostáticos (OUYANG et al., 2013).

Uma maneira de estudar o mecanismo de ação dos fármacos antineoplásicos se dá por meio da análise do ciclo celular, avaliando se o fármaco é capaz de induzir a parada do ciclo, e, portanto, a inibição da proliferação celular e ativação de mecanismos de morte (XIAO et al., 2011). O método mais comum para avaliar o ciclo celular é a citometria de fluxo, durante esse processo um corante fluorescente (iodeto de propídeo) se liga ao DNA, e uma vez ligado, a quantidade de sinal fluorescente é diretamente proporcional à quantidade de DNA (COBB, 2015).

A citometria de fluxo é utilizada como uma ferramenta analítica para quantificar a ploidia do DNA, bem como para avaliar alterações nos perfis do ciclo celular característicos de fragmentação do DNA (necrose) em comparação com a clivagem de DNA padronizada (apoptose). Os tipos de informação obtidos por análise de fluxo incluem a visualização de subpopulações de células com diferentes conteúdos de DNA. Para cada subpopulação de núcleos identificados,

os parâmetros de tamanho de população, frações de núcleos em cada fase do ciclo celular e computação de razões de DNA podem ser discernidos (EVANS et al., 2000).

A análise do ciclo celular, fundamenta-se na diferenciação de células nos diversos estágios do ciclo celular pela marcação do DNA com a sonda fluorescênte iodeto de propídio (PI), uma molécula no qual tem a capacidade de intercala-se em qualquer DNA, desde que a membrana da célula esteja permeável. As células na fase G0/G1 apresentam ploidia típica (2n) de células que ainda não entraram em mitose. Já as células na fase S, apresentam uma maior quantidade de DNA (>2n) e, consequentemente, uma maior intensidade de marcação. As células que já tiveram seu material genético duplicado (4n) e estão prestes a sofrer citocinese (fase G2/M), apresentam o dobro de fluorescência quando comparada com a população G0/G1. As células situadas no pico hipodiplóide (sub-G1) possuem conteúdo de DNA menor que 2n e podem representar aumento na ocorrência de debri celulares ou DNA fragmentado, característico de apoptose (MONTEIRO, 2012; SHIRALI et al., 2014). E esse conteúdo acaba sendo representado nos histogramas pelo pico sub-G1 (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

Com o objetivo de estudar o possível mecanismo de ação envolvido na atividade antitumoral do HE02, foi investigada a distribuição das células tumorais nas diferentes fases do ciclo celular dos animais tratados com HE02 durante nove dias.

HE02 induziu apenas um discreto aumento do pico sub-G1 (10% maior que o grupo controle), sugerindo que a substância não atua por induzir alterações no perfil do ciclo celular. Todavia, considerando que o modelo estudado, carcinoma ascítico de Ehrlich, é um modelo de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, e ainda que, células em processo de morte são fagocitadas *in vivo*, o que pode ter ocorrido durante os nove dias de tratamento com HE02, se faz necessário uma avaliação dos efeitos de HE02 no ciclo de linhagens celulares *in vitro* para descartar a atuação da substância no ciclo celular como parte do seu mecanismo de ação antitumoral.

Os dados da literatura mostram que a piperina foi capaz de induzir a parada do ciclo celular em linhagem de células de carcinoma mamário 4T1 na fase

G2/M, além de diminuição de células na fase G0/G1 (LAI et al., 2012). Já em células de câncer de próstata das linhagens LNCaP, DU145 e PC-3, a piperina foi capaz de induzir a parada do ciclo celular nas fases G0/G1 e diminuir a proporção de células na fase S nas linhagens LNCaP e DU145 (OUYANG et al., 2013). Quando testada em modelos de melanomas nas linhagens SK MEL 28 e B16F0, foi demonstrado que a piperina foi capaz de parar o ciclo celular na fase G1, com concomitante diminuição do percentual de células na fase S e G2/M (FOFARIA et al., 2014). Por fim, em estudo realizado por Yaffe e colaboradores (2013), utilizando linhagens de câncer retal HRT-18, foi demostrado que a piperina parou o ciclo na fase G0/G1 e reduziu o percentual de células em G2/M.

A terapia antiangiogênica é uma estratégia que visa impedir o crescimento de novos vasos que fornecem oxigênio e nutrientes para que as células tumorais possam proliferar continuamente. Atualmente, a abordagem mais bem estabelecida para limitar a angiogênese é o bloqueio da via do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (KUBOTA, 2011). Uma vez que a angiogênese é necessária para o surgimento de metástases em diversos locais do corpo, presume-se então que a terapia antiangiogênica deve ser benéfica para evitar o desenvolvimento de metástases, o que representa a principal causa de morte associada ao câncer (VASUDEV; REYNNOLDS, 2014).

Considerando que HE02 foi capaz de reduzir a microdensidade dos vasos peritumorais, pode-se sugerir que esta substância exerce sua atividade antitumoral, pelo menos parcialmente, via mecanismos antiangiogênicos. Dados da literatura demonstram que a piperina também apresenta efeitos antiangiogênicos, onde foi capaz de reduzir em até 50% a angiogênese induzida pela linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 inoculadas em embriões de pinto (DOUCETTE et al., 2013).

Vários mediadores contribuem para a angiogênese durante o desenvolvimento tumoral, incluindo citocinas e quimiocinas (TECCHIO; CASSATELLA, 2013), espécies reativas de oxigênio (ROS) (LI et al., 2013) e o óxido nítrico (NO) (HALDER et al., 2016).

Sendo assim, no presente estudo foram realizadas quantificações de citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrito, para verificar as

alterações que o HE02 promove no estado inflamatório e na modulação do sistema imune.

A IL-1β é produzida por células inflamatórias e, juntamente com o TNF-α, INF-γ e IL-18, tem função de ativação de macrófagos e neutrófilos para fagocitose e liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NETEA et al., 2010).

Considerando o aumento nas concentrações de IL-1β e TNF-α observados após tratamento com HE02, é possível inferir que este composto modula a resposta inflamatória por meio da expressão destas citocinas, o que pode explicar o efeito antitumoral do HE02 a partir da ativação de macrófagos e neutrófilos que estariam produzindo ROS e NO para induzir citotoxicidade nas células tumorais, o que foi confirmado nos ensaios de determinação destes mediadores, a serem explicados a seguir.

Relatos da literatura com relação a influência de derivados de *Piper longum* na quantificação de citocinas são, de forma geral, escassos. Contrário aos resultados produzidos pelo HE02, nos quais pode-se observar aumento de TNF-α, alguns dados da literatura mostram que a piperina, em modelos de estudo de inflamação, inibe a estimulação do TNF-α para produção das moléculas de adesão VCAM-1, E-selectine e ICAM-1, o que culmina com a redução da adesão de neutrófilos a células endoteliais, o que, consequentemente, interfere na migração celular (KUMAR et al., 2007).

Adicionalmente, em relação a influência da piperina sobre mediadores inflamatórios, dados preliminares indicam que a piperina inibe fatores de transcrição, tais como o NF-κB (KUMAR et al., 2007), reduz a expressão de INF-γ em células mononucleadas de sangue periférico humano (CHUCHAWANKUL; POOVORAWAN, 2012), e de IL-12 em células dendrítricas derivadas de medula óssea estimuladas com LPS (Bae et al., 2012).

Em relação especificamente a IL-12, HE02, diferentemente do efeito observado em células dendrítricas derivadas de medula óssea (Bae et al., 2012), induziu um aumento na concentração desta citocina. Nesse caso, considerando o efeito antiangiogênico da IL-12 bem descrito na literatura (TUGUES et al., 2015), pode-se inferir que o aumento desta citocina está associado a redução da microdensidade vascular peritumoral observada após tratamento com HE02.

Ainda, a IL-12 é bem descrita como uma citocina que orquestra a resposta imune do tipo Th1 (LASEK et al., 2013), o que reforça, juntamente com o aumento de IL-1β e TNF-α, que HE02 estimula um perfil Th1 citotóxico contra células tumorais.

Considerando que HE02 não induziu alteração nos níveis de CCL2, uma quimiocina reconhecidamente pró-angiogênica (IZHAK et al., 2012), é possível inferir que o mecanismo antiangiogênico do HE02 não está relacionado com a redução das concentrações de CCL2.

Dados da literatura mostram atividade antimetastática e antiangiogênica para a piperlongumine, um análogo da piperina. Nesse estudo foi demonstrado que a atividade antiangiogênica do composto está relacionada a uma desregulação do proto-oncogene c-MYC em modelo de carcinoma renal. O c-MYC está relacionado com o crescimento, motilidade, migração, invasividade, proliferação e angiogênese (GOLOVINE et al., 2015). Sendo assim, faz-se necessário estudos adicionais para identificar possíveis alvos moleculares envolvidos na atividade antiangiogênica de HE02.

Em relação as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4, sabe-se que estes mediadores estão envolvidos na manutenção de um perfil de resposta Th2, que produz um microambiente favorável ao crescimento dos tumores, e na supressão de uma resposta Th1, citotóxica para as células tumorais (SACHIN et al., 2016; SATO et al., 2011). No presente estudo, considerando que HE02 promoveu a redução da concentração destas duas citocinas, pode-se sugerir que HE02 apresenta sua atividade para polarização do perfil Th1 produzindo sua citotoxicidade.

Foram encontrados dados da literatura relacionados aos efeitos da piperina nos níveis de IL-10 e IL-4 apenas em modelos de inflamação. A piperina foi capaz de induzir aumento da concentração de IL-10 em um modelo animal de artrite (UMAR et al., 2013). Em outro estudo, foi demonstrado que a piperina apresenta atividade anti-inflamatória em modelos de inflamação aguda e crônica (MUJUMDAR et al., 1990). Em um estudo realizado por Douccette e colaboradores (2015), foi demonstrado que a piperina foi capaz de diminuir a síntese de IL-4 em linfócitos T em modelo de lavado broncoalveolar induzido por ovalbumina (OVA).

Como relatado por Liu; Wang (2015), o excesso de ROS em células tumorais pode promover a morte da célula tumoral. Muitos agentes antineoplásicos compartilham essa propriedade, como por exemplo, os taxanos e os alcaloides da vinca (BARREIRA et al., 2012). No presente estudo, foi observado que HE02 induziu estresse oxidativo, o que permite sugerir que o acúmulo de ROS está envolvido na citotoxicidade contra as células tumorais. Dados da literatura corroboram com estes dados obtidos experimentalmente para o HE02, uma vez que demonstram que a piperina e análogos induzem estresse oxidativo em células tumorais. Por exemplo, a piperina, em linhagem SK MEL 28, foi capaz de induzir dano ao DNA e parada do ciclo celular por induzir a produção de ROS (FOFARIA et al., 2014).

Ainda, sabe-se que a piperlonguminina causa aumento de ROS em diversas linhagens tumorais (RAJ et al., 2011). Em um estudo realizado por Dhillon e colaboradores (2015), foi demonstrado que a piperlongumina foi capaz de aumentar a concentração de ROS, avaliada pelo método do DCFH, nas linhagens de câncer pancreático PANC-1, MIA PaCa-2 e BxPC-3. Outro estudo demonstra que a piperlongumina promove aumento dos níveis de ROS intracelular em modelos de U2OS, MEF e HELa, contribuindo para autofagia dessas células (WANG et al., 2013).

O óxido nítrico apresenta atividade citotóxica, e é produzido por células NK, macrófagos e células de Kupffer. Além da atividade citotóxica direta, o NO também promove supressão da síntese de DNA e regulação da apoptose (CHOUDHARI et al., 2013). Considerando esses aspectos, foi realizado o ensaio de quantificação de NO após tratamento com HE02. Uma vez que HE02 induziu aumento nas concentrações de nitrito no fluido ascítico peritoneal dos animais experimentais, pode-se sugerir que, de forma semelhante ao que acontece com as ROS, HE02 promove sua atividade citotóxica também pelo estímulo da produção de NO. Esses dados corroboram dados anteriores da quantificação de citocinas, principalmente IL-1β, TNF-α e IL-12, que, em conjunto, sugerem que a atividade citotóxica do HE02 se dá provavelmente por estímulo do sistema imune, polarizando um perfil Th1.

Um estudo realizado por Raj e colaboradores (2011) demonstrou que a piperlonguminina promove morte das células de linhagem EJ, MDA-MB-231,

U2OS e MDA-MB-435 por aumento do óxido nítrico, bem como de outras espécies reativas como o peróxido de hidrogênio.

Após o estudo de possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antitumoral do HE02, o estudo prosseguiu com a avaliação da sua toxicidade. Os antineoplásicos são fármacos que apresentam o índice terapêutico mais baixo que qualquer outro, e, em consequência disso, causam toxicidade múltipla e previsível. Em geral, tecidos com alta capacidade de proliferação são susceptíveis a terapia antineoplásica. Entre as toxicidades mais comuns está a toxicidade hematológica, do sistema nervoso central, hepática, cardíaca e anormalidades metabólicas (REMESH, 2012). A partir dessa observação, é fundamental o estudo da toxicidade dos potenciais medicamentos a fim de caracterizar os seus possíveis efeitos tóxicos.

Assim, durante a realização do experimento de avaliação de atividade antitumoral *in vivo*, foram também investigados os possíveis efeitos tóxicos do HE-02 nas doses farmacológicas testadas nesse modelo.

O primeiro parâmetro avaliado foi o consumo de água e ração, além da evolução ponderal. Considerando que HE02 induziu redução no consumo de água e de ração, bem como redução no peso final dos animais, pode-se sugerir que este análogo da piperina induz uma possível toxicidade gastrintestinal, que precisa ser melhor caracterizada.

Dados da literatura demonstram que a extrato etanólico de *Piper longum* na dose de 100 mg/kg/dia em teste de toxicidade crônica, não reduziu o peso final dos animais (SHAH et al., 1998). Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, com o HE03, ficou evidenciado que essa substância não causou alteração no consumo de ração e peso final dos animais. Isso sugere que o perfil de toxicidade dos novos análogos da piperina sintetizados, HE01, HE02 e HE03, pode ser diferente. Diversas drogas antineoplásicas causam alterações gastrointestinais (TALMADGE et al., 2007; OLIVEIRA, 2010), como é o caso do 5-FU, que no modelo testado promoveu redução do peso final dos animais. Portanto, o aparecimento desse efeito indesejável não significa *per se* um fator limitante para a continuação dos estudos não clínicos com HE02.

O fígado é um órgão vital que cumpre funções diversas que estão intimamente ligadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, a

eliminação de toxinas e patógenos, bem como a regulação de respostas imunes (PROTZER et al., 2012). Ele é responsável pelo metabolismo e eliminação de muitos agentes antineoplásicos (MAES et al., 2016).

A toxicidade hepática é um problema comum na quimioterapia do câncer. Praticamente a maioria dos pacientes submetidos a quimioterapia têm exposição a hepatotoxinas, incluindo medicamentos e álcool. Alguns podem ter doença hepática coexistente, e outros, por causa do estado imunocomprometido, podem ser propensos à infecção. As reações de hepatotoxicidade podem ocorrer em um padrão variável incluindo lesão de células parenquimatosas com necrose, fibrose, lesão dutal com colestase, e doença hepática venoclusiva. Os agentes quimioterápicos que causam hepatotoxicidade produzem um padrão previsível de lesão onde o mecanismo é direto ou idiossincrático (REMESH, 2012).

As enzimas aminotransferases, AST e ALT, catalisam a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o α-cetoglutarato, formando cetoácido e ácido glutâmico. São encontradas em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam estas enzimas para a circulação. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, com isso pode ser considerada marcador específico de dano hepático, enquanto 80% da AST estão presentes na mitocôndria das células hepáticas, além de estarem presentes no músculo esquelético e cardíaco, rins, pulmões, eritrócitos, entre outros, sendo assim um marcador inespecífico da lesão hepática (AQUINO et al., 2014).

Alguns fármacos antineoplásicos como a cisplatina podem provocar hepatotoxicidade; nesse caso, já foi demonstrado que o estresse oxidativo causado pela cisplatina leva a uma depleção da glutationa reduzida. Como efeito final, ocorre degeneração e necrose dos hepatócitos (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

A administração do HE02 em doses farmacológicas não foi capaz de alterar a concentração das enzimas hepáticas AST e ALT, mantendo as mesmas dentro dos valores de normalidade para os camundongos da referida espécie, o que sugere que HE02 não induz dano hepático nas condições avaliadas. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa também demonstraram que HE03 não causa alterações nos níveis de AST e ALT, corroborando com os dados do seu

análogo. Ainda, esses dados corroboram dados da literatura que mostram que pirplatina e piperina, em modelo de Sarcoma 180 transplantados em camundongos, também não induzem danos hepáticos, o que foi avaliado por meio da determinação de AST e ALT (BEZERRA et al., 2008).

Para o HE02, os dados bioquímicos de AST e ALT são suportados pela ausência de alteração no índice do fígado, e pela ausência de evidência de danos aos hepatócitos avaliados por meio da análise histológica. No entanto, foi observado congestão dos ramos da veia porta, que tem relação com a pressão portal. Vários fatores podem alterar o índice de congestão portal, desde o aumento da pressão na veia porta, resistência intra-hepática, aumento do fluxo de sangue portal e circulação colateral portossistêmica. Em geral esse quadro pode levar a ascite (FERREIRA et al., 2005). Esse dado sugere que a ausência de efeito do HE02 sobre o volume intra-abdominal, mesmo com a redução da viabilidade das células tumorais, pode estar relacionada a ascite induzida pelo dano hepático, ou seja, a essa congestão portal. Dados da literatura demonstraram que camundongos tratados com pirplatina e a piperina não foram capazes de alterar a massa hepática. E com relação ao histopatológico, o mesmo estudo demonstrou que a piperina e pirplatina causaram extensas áreas de coagulação e necrose no fígado desses animais (BEZERRA et al., 2008). Já o tratamento com o análogo da piperina, o HE-03 (25 mg/kg) induziu alterações histopatológicas como, hepatotóxicidade, discreto infiltrado linfo-histiocitário perivascular e subcapsular, esteatose macrovesicular e microvesicular, e lesões de etiologia metabólica (SOUSA, 2015). Esses dados em conjunto sugerem que o HE02 apresenta melhor perfil de segurança hepática que seus análogos.

Os rins exercem múltiplas funções que podem ser didaticamente caracterizadas como filtração, reabsorção, homeostase, funções endocrinológicas e metabólicas. A ureia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo, é produzida pelo fígado, sendo que 90% da ureia produzida é excretada pelos rins (GOWDA; DESAI; VERNKAR, 2010). A principal utilidade clínica da ureia parece estar na determinação em conjunto com a creatinina. A razão ureia sérica/creatinina sérica pode indicar estados patológicos diferentes. Em valor abaixo do esperado ela pode ser encontrada em afecções como a necrose tubular aguda, baixa

ingestão de proteínas, condições de privação alimentar ou redução da síntese de ureia por insuficiência hepática. A análise dessa razão elevada pode ser feita de forma dicotomizada com a creatinina dentro do valor de referência, indicando processos que levam a diminuição do fluxo sanguíneo renal, aumento na ingestão proteica, ou sangramento gastrintestinal; e com a creatinina acima do valor normal, denotando processos obstrutivos pós-renais, como tumores ou estenose de vias urinárias (SODRÉ et al., 2007).

A creatinina é um produto residual da creatina. A transformação de creatina em creatinina acontece no tecido muscular, no qual 1-2% da creatina livre se converte espontânea e irreversivelmente em creatinina todos os dias. Logo, a quantidade de creatinina produzida é dependente da massa muscular e não apresenta grandes variações diárias. A creatinina é filtrada livremente no glomérulo. Ao contrário da ureia, a creatinina é ativamente secretada em uma pequena parcela, mas o suficiente para superestimar a TFG (Taxa de Filtração Glomerular). A quantidade secretada não é constante e depende do indivíduo e da concentração plasmática desse analito, dificultando sobremaneira a determinação de uma constante de secreção. Em termos gerais, 7-10% da creatinina presente na urina é secretada. Apesar de superestimar a TFG e depender da massa muscular, o *clearance* de creatinina continua sendo um dos marcadores mais usados na avaliação da função renal (SODRÉ et al., 2007).

Antineoplásicos como a cisplatina apresentam importantes efeitos adversos que limitam sua dose, como é o caso da nefrotoxicidade (BALIGA et al., 2008). A nefrotoxicidade é um efeito adverso inerente de certos agentes antitumorais. Eles podem causar lesão renal por meio da vasconstricção intrarrenal, danos aos vasos, toxicidade tubular direta e obstrução intratubular (FUKASAWA et al., 2014).

HE02 nas doses farmacológicas testadas induziu aumento apenas na concentração de ureia no modelo testado. Como houve apenas aumento nos níveis de ureia, não é possível afirmar que o HE02 possa causar danos renais. A ureia sozinha é considerada um indicador fraco da taxa de filtração glomerular, pois sua produção depende de outros fatores não renais, incluindo a dieta. Aumento da ureia no sangue é associado com doença renal ou falha, bloqueio do trato urinário, insuficiência cardíaca congestiva, desidratação, febre, choque

e sangramento no trato digestivo (GOWDA; DESAI; VERNEKAR; 2010). Corroborando os dados do HE03, HE02 também promoveu aumento apenas das concentrações de ureia. Dados da literatura demonstram que os níveis séricos de ureia, em camundongos implantados com Sarcoma 180 e tratados com piplartina e piperina, não foram alterados (BEZERRA et al., 2008).

Para confirmação do perfil de toxicidade do HE02, foi realizado o estudo histológico renal, o qual, corroborando os dados bioquímicos, e os dados de ausência de alteração no índice dos rins, indicou a preservação das estruturas renais. Dados da literatura de Bezerra e colaboradores (2006), demonstram que a administração de 100 mg/kg da piperina foi capaz de produzir discretas mudanças no epitélio tubular proximal, e hemorragia tubular e proximal. Ainda, observou-se que esses tratamentos não induzem alteração da massa renal (BEZERRA et al., 2006). Portanto, para o HE02, os dados em conjunto sugerem que este análogo da piperina não induz toxicidade renal.

O baço é o segundo maior órgão linfoide do organismo (ROSA et al., 2010). As funções básicas do baço são fundamentalmente hematológicas e imunológicas (SABISTON et al., 1999). Do ponto de vista hematológico, pode-se ressaltar que o órgão age como um filtro, por meio da remoção com destruição dos eritrócitos senescentes ou defeituosos. Este órgão age ainda na regulação do fluxo sanguíneo para o fígado, e reciclagem do ferro endógeno (HENRY; LONGO, 1998). Uma das atividades importantes é iniciar a reatividade imunológica a antígenos drenados para esse sítio. Nele, os componentes da reatividade imune inata e adaptativa podem ser eficientemente ativados tornando-o um órgão importante para a homeostase imunológica (MEBIUS; KRAAL, 2005).

HE02 foi capaz de causar hipotrofia do baço no modelo testado. Quando comparado ao HE03, pode-se observar efeito oposto, pois, para este análogo da piperina, foi evidenciado hipertrofia desse órgão. No entanto, dados da literatura indicam a diminuição do baço, quando os animais foram tratados com a piperina nas doses de 4,5 e 100 mg/kg (BEZERRA et al., 2006). Em outro estudo realizado por Dogra e colaboradores (2004), foi demonstrado que a piperina reduziu o peso do baço na dose de 4,5 mg/kg. Esse resultado pode demonstrar uma diminuição na população de células periarteriolar da bainha linfoide, como

ocorre com os animais tratados com a piperina. Isso pode reprsentar uma atividade reduzida dos linfócitos T, levando a uma redução dos títulos de anticorpos (DOGRA et al., 2004).

O timo é o local primário de maturação dos linfócitos T, em exame histológico ele é organizado em múltiplos lóbulos que estão dispostos em um córtex externo e medula interna. O córtex é composto por linfócitos T imaturos e células epiteliais tímicas, já a medula contém linfócitos em maturação (GOLDSTEIN et al., 2014).

O tratamento com HE02 foi capaz de reduzir a massa do timo, resultado este que foi corroborado ao resultado obtido para o análogo HE03, que também promoveu redução do timo neste mesmo modelo experimental. Dados da literatura demonstram que a piperina na dose de 4,5 mg/kg foi capaz de reduzir a massa do timo (DOGRA et al., 2004). Estudo realizado por Meghwal; Goswami (2013) também relata que a piperina reduz a massa do timo. Ainda, segundo Dogra e colaboradores (2004), a piperina causa diminuição da população de células da região cortical do timo, levando a uma supressão da maturação dos linfócitos T. Com base nesses achados, pode-se sugerir que o HE02 pode induzir a uma supressão da diferenciação celular do timo, levando assim a uma diminuição da massa tímica.

Quase todos os quimioterápicos exercem toxicidade sobre a formação do tecido hematopoiético, sendo assim chamados de mielossupressores ou mielotóxicos, e é esta a toxicidade mais importante relacionada ao uso destas drogas. Essa toxicidade pode levar a incapacitação da medula óssea de repor os elementos figurados do sangue, levando a quadros de leucopenia, trombocitopenia e/ou anemia, ou pancitopenia. A mielossupressão não ocorre de forma uniforme na terapia antineoplásica, onde varia de acordo com o medicamento utilizado e também de indivíduo para indivíduo (ÁVILA; SOARES; SILVA, 2013).

A avaliação dos parâmetros hematológicos após tratamento com HE02 indicou redução da concentração de hemoglobina e, consequentemente, do hematócrito. Em estudo realizado por Dogra e colaboradores (2004), ficou demonstrado que a piperina provocou diminuição dos parâmetros de eritrócitos, hemoglobina e leucócitos, caracterizando toxicidade medular. Dados obtidos por

nosso grupo de pesquisa haviam demonstrado que o HE03 não provocou alterações no eritrograma. Dados da literatura trazem que pacientes portadores de doenças neoplásicas apresentam alta frequência de anormalidades das células sanguíneas relatadas na literatura como anemia e trombocitopenia (DIETL et al., 2007; CONNOLLY et al., 2010; Da SILVA et al., 2014). A anemia é a alteração mais comum encontrada em pacientes com câncer (GASPAR et al., 2014). A partir disso, é possível inferir que a anemia detectada no grupo tratado não teria relação com o tratamento, podendo está relacionada à própria doença neoplasia, visto que, o grupo controle também apresentou um quadro de anemia.

As alterações em nível de leucograma para o HE02 incluíram leucocitose, acompanhada de redução de linfócitos e aumento de neutrófilos. A leucocitose e, consequentemente, a neutrocitose pode estar relacionada ao mecanismo citotóxico do HE02. A linfopenia nesse caso, corrobora com os dados da massa do timo, uma vez que esses dados são complementares para a redução da maturação dos linfócitos nesse órgão linfoide.

Já o HE03, análogo da piperina estudado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, induziu leucopenia, acompanhado de neutropenia. Contraditoriamente, Dogra e colaboradores (2004) demonstraram que a piperina levou a redução da concentração de leucócitos. Esses dados demonstram que análogos da piperina podem ter diferentes perfis de toxicidade hematológica.

Esse trabalho apresenta, em conjunto, o potencial farmacológico do HE02 relacionado à sua atividade antitumoral via mecanismos antiangiogênicos e imunomoduladores no sentido de induzir uma resposta Th1 citotóxica, além da caracterização de possíveis efeitos tóxicos decorrentes de sua administração, o que subsidiam a realização de testes pré-clínicos adicionais na perspectiva de contribuir com o estudo de novos candidatos a fármacos antitumorais.

Conclusão

7 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados com o análogo da piperina 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE02), foi possível concluir que:

- HE02 apresentou baixa citotoxicidade em eritrócitos de camundongos

- HE02 apresentou moderada citotoxicidade em linhagem de células de macrófagos RAW 264.7

- HE02 apresentou baixa toxicidade aguda em camundongos, quando administrado por via intraperitoneal

- HE02 apresentou atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

- HE02 exerceu seu efeito antitumoral por modular o sistema imune a um perfil Th1 citotóxico, levando a produção de NO e ROS que promovem danos celulares diretos, além de induzir efeitos antiangiogênicos

- HE02 apresentou baixa toxicidade *in vivo*, em animais com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos ao tratamento farmacológico de doses repetidas;

Referências

8 REFERÊNCIAS

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. **Nat. Immunol**, v3, p 549–557, 2002.

AFKARIAN, M., SEDY, J. R., YANG, J., JACOBSON, N. G., CEREB, N., YANG, S. Y. T-bet is a STAT1- induced regulator of IL-12R expression in naive CD4þ T cells. **Nat Immunol,** v 3, p 549–557, 2002.

AFONINA, I. S., MÜLLER, C., MARTIN, S. J., BEYAERT, R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. **Cell Press,** v 42, p 991-1004, 2015.

AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C. & KIM, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis fator and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood,** v 119, p 651–665, 2012.

AL-HUSEIN, B., ABDALLA, M., TREPTE, M., DEREMER, D. L., PAYANINGAL, R., SOMANTH. Antiangiogenic Therapy for Cancer: An update. **Reviews of Therapeutics,** v 32, p 1095-1111, 2012.

ALMEIDA, V. K., LEITÃO, A., REINA, L. D. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L. Cancer e antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim Nova,** v 28, p 118-129, 2005.

ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L. D. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que intereagem com o DNA: Uma introdução. **Quim Nova,** Vol. 28, p.118-129, 2005.

AMELO, W.; NAGPAL, P.; MAKONNEN, E. Antiplasmodial activity of solvent fractions of methanolic root extract of Dodonaea angustifolia in *Plasmodium berghei* infected mice. **BMC complementary and alternative medicine,** 2014.

American Cancer Society. The History of Cancer.. Disponível em http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/index. Acessado

ANTONUZZO, A., VASILE, E., SBRANA, A., LUCCHESI, M., GALLI, L., BRUNETTI, I. M., MUSETTINI, G., FARNESI, A., BIASCO, E., VIRGILI, N., FALCONE, A., RICCI, S. Impact of a supportive care service for cancer outpatients: management and reduction of hospitalizations. Preliminary results of an integrated model of care. **Support Care Cancer,** v 25, p 209-212, 2017.

ANVISA, Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, 2013.

BACON CM, MCVICAR DW, ORTALDO JR, REES RC, O'SHEA JJ, JOHNSTON JA. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. **J Exp Med,** v 181, p 399–404, 2002.

BAE, G. S.; KIM, J. J.; PARK, K. C.; KOO, B. S.; JO, I. J.; CHOI, S. B.; LEE, C. H.; JUNG, W. S.; HONG, S. H.; SONG, H. J.; SHIN, Y. K.; PARK, S. J. Piperine Inhibits Lipopolysaccharide-induced Maturation of Bone-marrow-derived Dendritic Cells Through Inhibition of ERK and JNK Activation. **Phytotherapy research,** v 26, p 1893,1897, 2012.

LIOU, G. Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radic Res,** v 44, 2010.

BALIGA, T.; ZHANG, Z.; BALIGA, M.; UEDA, N.; SHAH, S. V. *In vitro* and *in vivo* evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Kidney International,** v 53, p 394-401, 1998.

BARLETTA, D. V. Radioterapia no câncer de mama. In: BOFF, R. A.; WISINTAINER, F. **Mastologia moderna: abordagem multidisciplinar.** 1ª ed. Caxias do Sul: Editora Mesa Redonda, p. 165-174, 2006.

BEKISZ, J., SATO, Y., JOHNSON, S., HUSAIN, S. R., PURI, R. K., ZOON, K. C. Immunomodulatory effects of interferons in malignancies. **J Interferon Cytokines Res,** v 33, p 154-161, 2013.

BELLORA, F., CASTRICONI, R., DONI, A., CANTONI, C., MORETTA, L., MANTOVANI, A., MORETTA, A., BOTTINO, C. M-CSF Induces the Expression of a Membrane-bound Form of IL-18 in a Subset of Human Monocytes Differentiating *in vitro* Toward Macrophages. **Eur J Immunol**., v 42, p 1618–1626, 2012.

BERDA-HADDAD, Y., ROBERT, S., SALERS, P., ZEKRAOUI, L., FARNARIER, C., DINARELLO, C. A., DIGNAT-GEORGE, F., KAPLANSKI, G. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v 108, p 20684–20689, 2011.

BERTOLI, C., SKOTEHIM, J. M., DE BRUIN, R. A. M., Controle of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nat Ver Mol Cell Bio.** v. 14, p.518-528, 2013.

BERTOLI, C., SKOTHEIM, J. M. BRUIN, R. A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature,** v 14, p 518-529, 2013.

BISSELL, M. J., HINES, W. C. Why don't we get more câncer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nature,** v 17, p 320-329, 2011.

BOGDAN, C., VODOVOTZ, Y., NATHAN, C. Macrophage deactivation by Interleukin 10. **J Exp Med,** v 174, p 1549-1555, 1991.

BOYA, P., ESPINET, E., PALOMO-PONCE, S., CODOGNO, P. Emerging regulation and functions of autophagy. **Nat Cell Biol,** v. 22, p. 713-720, 2013.

BRINDHA, E., RAJASEKARAN, R., ARUNA, P. KOTEESWARAN, D., GANESAN, S. High wavenumber Raman spectroscopy in the characterization of urinary metabolites of normal subjects, oral premalignant and malignant patients. **Spechtromimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,** v. 171, p. 52-59, 2016.

BROMBERG, J. F., HORVATH, C. M., WEN, Z., SCHREIBER, J. E., DARNELL, JR. Transcriptionally active Stat 1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. **Proc Natl Acad Sci USA,** v 93, p 7673-7678, 1996.

BURKE, A. J.; SULLIVAN, F. J.; GILES, F. J.; GLYANN, S. A. The yin and yang of nitric oxide in cancer progession. **Carcinogenesis,** v 34, p 503-512, 2013.

BURKHOLDER, B., HUANG, R. Y., BURGESS, R., LUO, S., JONES, V. S., ZHANG, W., ZHI-QIANG, L. V., GAO, C. Y., WANG, B. L., ZHANG, Y. M., HUANG, R. P. Tumor-induced pertubations of cytokines and imune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta,** v 18455, p 182-201, 2014.

BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Prf Exp Tumor Res.,** v 13, p 1-27, 1970.

CALLARD, R. E., MATTHEWS, D. J., HIBBERT, L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? **Immunol Today,** v 17, p 108-110, 1996.

CALIXTO-CAMPOS, C., ZARPELON, A. C., CORRÊA, M., CARDOSO, R. D. R., PINHO-RIBEIRO, F. A., CECCHINI, R., MOREIRA, E. G., CRESPIGIO, J., BERNARDY, C. C. F., CASAGRANDE, R., VERRI, W. A. The Ehrlich Tumor

Induces Pain-Like Behavior in Mice: A Novel Model of Cancer Pain for Pathophysiological Studies and Pharmacological Screening. **BioMed Research International.** 2013.

CANAVESE, M., SANTO, L., RAJE, N. Cycin depende kinases in cancer: potencial for therapeutic intervention. **Cancer Biol Ther.** v. 14, p. 518-528, 2013.

CANCER RESERCH UK, acessado em 10 de janeiro de 2017 <www. http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer#lymphomas>.

CASTAÑEDA-GILL, J. M. & VISHWANATHA, J. K. Antiangiogenic mechanisms and factors in breast cancer treatment. **J Carcinog,** v 15, 2016.

CETINTAS, V. B., ACIKGOZ, E., YIGITTURK, G., DEMIR, K., OKTEM, G., KAYMAZ, B. T., OLTULU, F. AKTUG, H. Effects of flavopiridol on critical regulation pathways of $CD133^{high}/CD44^{high}$ lung cancer stem cells. **Clinical Trial/Experimental Study,** v 95, 2016.

CHAABANE, W., USER, S. D., EL-GAZZAH, M., JAKSIK, R., SAJJADI, E., WOLNY-RZESZOWKA, J., LOS, M. J. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer.

CHEN, N., WEI, F., WANG, L., CUI, S., WAN, Y., LIU, S. Tumor Necrosis Factor Alpha Induces Neural Stem Cell Apoptosis Through Activating p38 MAPK Pathway. **Neurochem Res,** 2016.

CHOUDHARI, S. K.; CHAUDHARY, M.; BAGDE, S.; GABBAIL, S.; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology,** v 11, 2013.

CHRISTIAENS, V., LIJNEN, H. R. Angiogenesis and development of adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol**., v 318, p2–9, 2010.

CHU, W. M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters,** v 328, p 222-225, 2013.

CHUCHAWANKUL, S.; KHORANA, N.; POOVORAWAN, Y. Piperine inhibits cytokine production by human peripheral bood mononuclear cells. **Genetics and Molecular Research,** v 11, p 617-627, 2012.

CHUNG, A. S., FERRARA, N. Developmental and Pathological Angiogenesis. **Annu ver Cell Dev Biol,** v 27, p 563-584, 2011.

CLARKE, J. M. & HURWTIZ, H. I. Understanding and targeting resistance to anti-angiogenic therapies. **J Gastrointest Oncol,** v 4, p 253-263, 2013.

CLEATOR, S.; PARTON, M.; DOWSETT, M. The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 9, p. 183-195, 2002.

COBB, L. Cell Based Assays: the Cell Cycle, Cell Proliferation and Cell Death. 2015.

CONNOLLY, G. C., KHORANA, A. A., KUDERE, N. M., CULAKOVA, E., FRANCIS, C. W., LYMAN, G. H. Leukocytosis, thrombosis and early mortality in cancer patients initiating chemotherapy. **Thrombosis Research**. Vol. 126 no. 2 pp. 113-118, 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V., MONTENEGRO, R. C., ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F., PESSOA, C., MORAES, M. E. A. AND MORAES, M. O. 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 Quimica**, Vol.2 No.1, pp.47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads, **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n.6, p. 3670-95, 2013.

CULIG, Z. Cytokine disbalance in common human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta.** V 1813, p 308-314, 2011.

DANIAL, N. N., AND KORSMEYERS, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, p. 205-219, 2004.

DAVID, J., KLNKE, L. L. A multiscale systems perspective on cancer, immunotherapy, and interleukin-12. **Klinke Molecular Cancer,** v 9, 2010.

DE WALL, M. R., HAANEN, J., SPITS, H., RONCAROLO, M. G., VELDE, A., FIGDOR, C., JOHNSON, K., KASTELEIN R., YSSEL, H., VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) and virak IL-10 strongly reduce antigen specific human T cell proliferarion by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via downregularion of class II major histocompatibility complex expression. **J exp Med,** v 174, 915-24, 1991.

DEGTEREV, A., YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes, Nat. **Ver Mol Cell,** v. 8, p. 378-390, 2008.

DEMAIN, A. L., VALSHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology,** v 4, p 687-699, 2011.

DHILLON, H.; CHIKARA, S.; REINDL, K. M.; Piperlongumine induces pancreatic cancer cell death by enhancing reactive oxygen species and DNA damage. **Toxicol Rep,** v 1, p 309-3018, 2014.

DIAZ-MORALLI, S., TARRADO-CASTELARNAU, M., MIRANDA, A. CASCANTE, M. Targeting cell Cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeytics,** v 138, p 255-271, 2013.

DIETL, B., MARIENHAGEN, J., SCHÄFE, C., KÖLBL, O. The Prognostic Value of Anaemia at Different Treatment Times in Patients with Locally Advanced Head

and Neck Cancer Treated with Surgery and Postoperative Radiotherapy. **Clinical Oncology**. Vol. 19, no. 4, pp. 228-233, 2007.

DINARELLO, C., AREND, W., SIMS, J., SMITH, D., BLUMBERG, H., O'NEILL, L., GOLDBACH-MANSKY, R., PIZARRO, T., HOFFMAN, H., BUFLER, P., IL-1 Family Nomenclature. **Nat Immunol**., p. 911:973, 2010

DING, L., LINSLEY, P.S., HUANG, L. Y., GERMAIN, R. N., SHEVACH, E. M. I-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **J immunol.,** v 151, p 1224-1234, 1993.

DO, M. T., KIM, H. G., CHOI, J. H., KHANAL, T., PARK, B. H., TRAN, T. P. JEONG, T. C., JEONG, H. G. Antitumor efficacy of piperne in the treatment of human HER2-overexpression breast cancer cells. **Food Chemistry**, v 141, 2591-2599, 2013.

DOKKA, S., SHI, X., LEONARD, S., WANG, L., CASTRANOVA, V., ROJANASAKUL, Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages, **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,** v 280, p L1196-L1202, 2001.

DOLAI, N., KARMAKAR, I., KUMAR, R. B. S., KAR, B., BALA, A.; HALDAR, P. K. Evaluation of antitumor activity and in vivo antioxidant status of Anthocephalus cadamba on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 865-870, 2012.

DONCIC, A., FALLEUR-FETTIG, M., SKOTHEIM, J. M. Distinct interactions select and maintain a specific cell fate. **Mol Cell.** vol. 43, p. 528-539, 2011.

DOUCCETTE, C. D.; RODGERS, G.; LIWSKI, R. S.; HOSKIN, D. W. Piperine From Black Pepper Inhibits Activation-Induced Proliferation and Effector Function of T Lymphocyte. **Journal of Cellular Biochemistry,** v 166, 2577-2588, 2015.

DUNN, G. P., SCHREIBER, R. D. The immunobiology of câncer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity,** v 21, p 137-148, 2004.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Immunobiology

ELINAV, E., NOWARSKI, R., THAISS, C. A., HU, B., JIN, C., FLAVELL, R. A. Inflammation-induced câncer: crosstalk between tumours, imune cells and microorganisms. **Nature Reviews,** v 13, p 759-771, 2013.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol,** v. 35, p. 495-516, 2007.

EVANS, D. L., BISHOP, G. R., JASO-FRIEDMANN, L. Methods for cell cycle analysis and detection of apoptosis of teleost cells. **Cell Science,** v 22, p 225-231, 2000.

FANTUZZI, G. DINARELLO, C. A. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokines substrates for ICE (caspase-1). **Journal of clinical immunology,** v 19, p 1-11, 1999.

FASTAIA, J., and DUMONT, A. E., Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 56, no. 3, pp. 547–550, 1976.

FERNANDES, P. D., GUERRA, F. S., SALES, N. M., SARDELLA, T. B., JANCAR, S., NEVES, J. S. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor developmente. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods,** v 71, p 83-89, 2015.

FERREIRA, F. G.; CHIN, E. W. K.; SANTOS, M. F.; MOREIRA, D. L.; JUNIOR, A. C. Índice de congestão portal e a ocorrência de trombose portal pós-dape. **Rev Assoc Med Bras,** v 51, p 233-236, 2005.

FIGG, W. D. F. J., Angiogenesis: na integrative approach form Science to medicine. **New York:Springer,** 2008.

FINLEY, S. D., CHU, L. H., POPEL, A. S. Computational systems biology approaches to anti-angiogenic cancer therapeutics. **Drug discovery today,** v 20, p 187-198, 2015.

FINN, R. S., ALESHIN, A., SLAMON, D. J. Targerting the cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 in estrogen receptor-positive breast cancers. **Breast Cancer Research,** 2016.

FIORENTINO, D. F., BOND, M. W., MOSMANN, T. R., Two Types of mouse T helper cell. IV The2 clones secrete a fator that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med.,** v 148, p 2081-2095, 1992.

FIORENTINO, D. F., ZLOTNIK, A., VIEIRA, T. R., MOSMANN, M., HOWARD, M., MOORE, K. W., et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cell. **J Immunol,** v 146, p 3444-3451, 1991.

FOFARIA, N. M., KIM, S. H., SRIVASTAVA, S. K. Piperine Causes G1 Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Melanoma Cells through Checkpoint Kinase-1 Activation. **Plos One**, v 9, 2014.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug Discovery? **Nat Ver Drug Discov.,** v 6, p 27,-286, 2007.

FREIRE, M. E. M., SAWADA, N. O., FRANÇA, I. S. X., COSTA, S. F. G., OLIVEIRA, C. D. B. Qualidade de vida relaciona à saúde de pacientes com câncer avançado: uma revisão integrativa. **Revista da escola de enfermagem da USP,** vol. 48(2), p. 357-367, 2014.

FUKASAWA, H.; FURUYA, R.; YASUDA, H.; TAMAMOTO, T.; HISHIDA, A.; KITAGAWA, M. Anti-cancer Agent-Induced Nephrotoxicity. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry,** v 14, p 921-927, 2014.

Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity,** v 39, p 1003–1018, 2013.

GAUR, U., AGGARWAL, B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Biochem Pharmacol**, v 66, p 1403-1408, 2003.

GENINAT, J., LARGHI, P., PARONI, M., NIZZOLI, G., PENATTI, A., PAGANI, M., GAGLIANI, N., MERONI, P., ABRIGNANI, S., FLAVELL., R. A. The ligth and the dark sides of Interleukin-10 in imune-mediated diseases and câncer. **Cytokine & Growth Factor Reviews,** v 30, p 87-93, 2016.

GERHARDT, H., GOLDING, M., FRUTTIGER, M., RUHRBERG, C., LUNDKVIST, A., ABRMSSOM, A. et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endotelial tip cell filopodia. **J Cell Biol,** v 161, p 1163-1177, 2003.

GHAVAMI, S. ESHARAGI, M., ANDE, S. R. S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3. **Cell Res.,** v. 20, p. 314-331, 2010.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews,** v 12, p 931-948, 2013.

GOTTESMAN, M.M., LAVI, O., HALL, M.D., GILLET, J.P. Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. **Rev. Pharmacol. Toxicol.,** 2016.

GREEN, D. S., NUNES, A. T., ANNUNZIATA, C. M., ZOON, K. C. Monocyte nad interferon based therapy for the treatment of ovarian cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews,** v 29, p 109-115, 2016.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v.126, p.131-138, 1982.

GRIVENNIKOV, S. I., GRETEN, F. R., KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell,** v 140, p 883-899, 2010.

HALAMA, A., MÖLLER, G. ADAMSKI, J. Metabolic Signatures in Apoptotic Human Cancer Cell Lines, v. 15, 2011.

HANAHAN, D., COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the microenvironment. **Cancer Cell,** v 21, p 309-322, 2012.

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

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods,** v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.

Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A., Kolodner, R. D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. **Nat Genet**. V 29, p 301–305, 2001.

HOWARD, M. J., FARRAR, M., HILFIKER, B., JOHNSON, K., TAKATSU, T., HAMAOKA, PAUL, W. E. Identification of a T cell-derived b cell growth fator distinct from interleukin 2. **J Exp Med,** v 155, p 914-923, 1982.

HUBER, S., GAGLIANI, N., ZENEWICZ, L. A., HUBER, F. J., BOSURGI, L., HU, B., et al. Il-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. **Nature,** v 491, p 259-563, 2012.

HUERTA, S. Nitric oxide for cancer therapy. **Future Science,** 2015.

HYDBRING, P., MALUMBRES, M., SICINSKI, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. **Nature,** v 17, p 280-293, 2016.

ISSAAD, F. Z., TOMÉ, L. I. N., MARQUES, N. V., MOUATS, C., DICULESCU, V. C. OLIVEIRA-BRETT, A. M. Bevacizumab anticarncer monoclona antibody: native and denatured redox behaviour. **Electrochimica Acta**, v 206, p 246-253, 2016.

ITOH, K., HIROHATA, S. The role of IL-10 in human B cell activation proliferarion, and differentiation. **J Immunol,** v 154, p 4341-4351, 1995.

IZHAK, L.; WILDBAUM, G.; JUNG, S.; STEIN, A.; SHAKED, Y.; KARIN, N. Dissecting the Autocrine and Paracrine Roles of the CCR2-CCL2 Axis in Tumor Survival and Angiogenesis. **Plos One,** v 7, 2012.

JAIN, R.K. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. **J. Clin. Oncol**., v 31, p 2205–2218, 2013.

JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E., and FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, Vol 61 No 2, pp. 69-90, 2011.

JEMAL, A.; BRAY, F.; GREY, N.; FERLAY, J.; FORMAN, D. Global cancer transitions according to the Human Development index (2008-2030): a population-based study. **Lancet Oncology,** v. 13, p. 790-801, 2012.

JESUS, L. G., CICCHELLI, M., MARTINS, G. B., PEREIRA, M. C. C., LIMA, H. C., MEDRADO, A. R. A. P. Repercussões orais de drogas antineoplásicos: uma revisão de literature. **RFO,** v 21, p 130-135, 2016.

JOSEPHSON, K., LOGSDON, N. J., WALTER, M. R. Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. **Immunity,** v 15, p 35-46, 2001.

KALASA, E. R.; BODDULURU, L. N.; MADANA, R. M.; ATHIRA, K. V.; GOGOI, R.; BARUA, C. C. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in câncer: mechanistic perspectives. **Toxicology Letters,** v. 233, p. 214-225, 2015.

KALLIOLIAS, G. D., IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutics strategies. **Rheumatology,** v 12, p 49-62, 2016.

KAMETANI, S., OIKAWA, A. T., KOJIMA-YUASA et al., “Mechanism of growth inhibitory effect of cape aloe extract in Ehrlich ascites tumor cells”. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology,** vol. 53, no. 6, pp. 540–546, 2007

KARIN, M. AND DHAR, D. Liver Carcinogenesis: From Natugthy Chemcals to Soothing Fat- and the Surprising Role of NRF2. **Carcinogenesis Advanced Access**, 2016.

KASALA, E. R., BODDULURU, L. N., MADANA, R. M., ATHIRA, K. V., GOGOI, R., BARUA, C. C. CHEMOPREVENTIVE AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF CHRYSIN IN CANCER: MECHANISTIC PERSPECTIVES. **Toxicology letters**, 2015.

KENNEDY, R., CELIS, E. Multiple roles for CD41 T cells in antitumor immune responses. **Immunological Reviews**, v 222, 2008.

KHAZAIE, K., BONERTZ, A., BECKHOVE, P., Current developments with peptide-based tumor vacines. **Curr Opin Oncol.,** b 21, p 524-530, 2009.

KHAZAIE, K., VON BOEHMER, H. The impact of CD4(+)CD25(+) Treg on tumor specific CD8(+) T cell cytotoxicity and câncer. **Semin Cancer Biol,** v 16, p 124-136, 2009.

KIEUHOA,T., KATHERINE, K. MATTHAY, STEVEN, G. D. Targeted antiangiogenic agents in combination with cytotoxic chemotherapy in preclinical and clinical studies in sarcoma. **Clinical Sarcoma Research**, v.6, n.9, 2016.

KOH, Y. J., CHA, D. S., KO, J. S., PARK, H. J., CHOI H. D. Anti-Inflammatory effect of Taraxacum officinale leaves on lipopolysaccharide-Induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. **J Med Food**, v 13: p 870–877, 2010

KRISTEN, L. D., NICHOLE, R. B., FOTINI, G., KHASHAYARSHA, K. Current status of IL-10 and regulatory T-cells in câncer. **Curr Opin Oncol,** v 25, p 637-645, 2013.

KROCK, B. L., SKULI, N., SIMON, C. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. **Genes & Cancer,** v 2, p 1117-1133, 2011.

KUBOTA, Y. Tumor Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy. 2011.

LAI, L. H., FU, Q. H., LIU, Y., JIANG, K., GUO, Q. M., CHEN, Q.Y., YAN, B., WANG, Q. Q. AND SHEN, J. G. Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta Pharmacol Sin**, Vol. 33 No.4, pp. 523-530, 2012.

LAI, L., FU, Q., LIU, Y., GUO, Q. M., CHEN, Q. Y., YAN, B., WANG, Q. Q., SHEN, J. G. Piperine suppresses tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta Pharmacologia Sinica,** v 33, p 523-530, 2012.

LARKIN, J. L. L. L., AHMED, C. M., WILSON, T. D., JOHNSON, H. M. Regulation of interferon gamma signaling by suppressors of cytokine signaling and regulatory T cells. **Frontiers in Immunology**, v 4, p 1-8, 2013.

LASEK, W., ZAGOZDZON, R., JAKOBISIAK, M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? **Cancer Immunol Immunother,** v 63, p 419-435, 2014.

LASEK, W.; ZAGOZDZON, R.; JAKOBISIAK, M. Interleukin 12: stil a promising candidate for tumor immunotherapy. **Cancer Immunol Immunother,** v 63, p 419-435, 2014.

LEBEL-HAZIV, Y.; MESHEL, T.; SORIA, G.; YEHESKEL, A., MAMON, E.; BEN-BARUCH, A. Breast Cancer: Coordinated Regulation of CCL2 Secretion by Intracellular Glycosaminoglycans and Chemokine. **Neoplasia,** v 16, p 723-740, 2014.

LEIST, M., JAATTELA, M., Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nat Ver Mol Cell Biol,** v. 2, p. 589-59, 2001.

LI, Z., CHEN, L., QIN, Z., Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. **Cell Mol Immunol.** v 6, p 415-422, 2009.

LIM, S. Y.; YUZHALIN, A. E.; GORDON-WEEKS, A. N.; MUSCHEL, R. J. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. **Oncotarget,** v 7, p 1-14, 2016.

LIU, J. & WANG, Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity,** 2015.

LIU, Z. J., SHIRAKAWA, T., LI, Y., SOMA, A., OKA, M., DOTTO, G. P. et al. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endotelial growth fator in arterial

endotelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. **Mol Cell Biol.,** v 23, p 14-25, 2003.

LONGLEY, D. B., HARKIN, D. P., JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature,** v 3, 2003.

LOS, M., MOZOLUK, M. FERRARI, D., STEPCZYNSKA, A., STROH, C., RENZ, A. HERCEG, Z.Q. WANG, M., SCHULZE-OSTHOFF, K. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch beteween fibroblastos necrosis and apoptosis in death receptor signaling. **Mol Biol Cell,** v. 13, p. 798-988, 2002.

LUZINA, I. G., ACHASAH, D. K., NICOLA, M. H., GRAGAM, A. W. R., TEREZ, S. D., SERGEI, P. A. Regulation of inflammation by interleukin-4 a review of “alternatives”. **Journal of Leukocyte Biology**, v 92, p 753-764, 2012.

LYER. S. S., PULSKENS, W. P., SADLER, J. J., BUTTER, L. M., TESKE, G. J., ULLAND, T. K., Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. **Proc Natl Acad Sci USA.** V. 106, p. 20388-20393.

MADHAVI, B. B., NATH, A. R., BANJI, D., MADHU, M. N., RAMALINGAM, R. AND SWETHAM, D. Extraction, identification, formulation and evaluation of piperine in alginate beads, **Int. J. Pharm. Sci**, Vol.1 pp. 156–161, 2009.

MALUMBRES, C., BARBACID, M. Cell Cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews,** v 9, p 153-168, 2009.

MANNINO, M. H., ZHU, Z., XIAO, H., BAI, Q., WAKEFIELD, M. R., FANG, Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and câncer. **Cancer Letters,** v 367, p 103-107, 2015.

MANNINO, M. H.; ZHU, Z.; XIAO, H.; BAI, Q.; WAKEFIELD, M. R; FANG, Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters,** v 367, p 103-107, 2015.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. **Nature,** v 454, p 436-444, 2008.

MARTINON, F & TSCHOPP, J. Infammatory caspases and inflammasomes: máster switcher of inflammation. **Cell death and differenctiation.** V 14, p 10-22, 2017.

MARTIN-OROZCO, N., MURANSKI, P., YANG, X. O., YAMAZAKI, T., LU, S., HWU, P., RESTIFO, N. P., OVERWIJK, W. W., DONG, C. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. **Immunity,** v 31, p 787-798, 2009.

MATSUZAWA, T., FUJIWARA, E., WASHI, Y. Autophagy activation by interferon-g via the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway is involved in macrophage bactericidal activity. **Immunology,** v 141, p 61–69, 2014.

MEGHWAL, M., GOSWAMI, T.K., Piper nigrum and piperine: an update. **Phytother. Res**, Vol. 27, pp. 1121–1130, 2003.

MEHRPOUR, M., ESCLATINE, A., BEAU, I. Autophagy in the stress-induced myocardium. **Front Biosci,** v. 4, p. 2131-2141, 2010.

MEIJER, A. J., CODOGNO, P. Autophagy: regulation and role in diseae. **Crit Ver Clin Lab Sci,** v.46, p. 210-240, 2009.

MIZUSHIMA, N. YOSHIMORI, T., OHSUMI, Y. The role of Atg proteins in autophagossome formation. **Annu Ver Cell Dex Biol,** v. 15, p. 107-132, 2011.

MONNEY, L., et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of na autoimune disease. **Nature,** v 415, p 536-541, 2002.

MORGAN, D. O. Cyclin-dependent kinases, engines, clocks, and microprocessors. **Annu Tev Cell Dev Biol.** V. 13, p. 451-457, 1997.

MUJUMDAR, A. M.; DHULEY, J. N.; DESHMUKH, V. K.; RAMAN, P. H.; NAIK, S. R. Anti-inflammatory activity of piperine. **Jpn J Med Sci Biol,** v 43, p 95-100, 1990.

NACIONAL CANCER INSTITUTE, acessado em 10 de janeiro de 2017 em https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html#myeloma.

NELMS, K., KEEGAN, A. D., ZAMORANO, H., RYAN, J. J., PAUL, W. E. The IL-4 receptor: sinaling mechanisms and biologic functions. **Annu Rev Immunol,** v 17, p 701-738, 1999.

NELMS, K., KEEGAN, A. D., ZAMORANO, J., RYAN, J. J., PAUL, W. E. D., The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annu Rev Immunol,** v 17, p 701–738, 1999.

NETEA, M. G., SIMON, A., VEERDONK, F. V., KULLBERG, B. J., MEER J. W. M. V. D., JOOSTEN, L. A. B. IL-1β Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. v 8, p 1-9, 2010.

NETEA, M. G.; SIMON, A.; VEERDONK, F. V.; KULBERG, B. J.; MEER, V. D.; JOOSTEN, L. A. B. IL-1β Processing in Host Defense1; Beyond the inflammasomes. **Plos Pathogens,** v 6, 2010.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat**. Prod. 75:311–35, 2016.

NIKOLETOPOULOU, V., MARKAKI, M., KONSTANTINOS, P., TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1833, p. 3448-3459, 2013.

OFT, M. IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity. **Cancer Immunology Research,** v 2, p 194-201, 2014.

OGINO, A., YOSHINO, A., KATAYAMA, Y, WATANABLE, T., OTA, T., KOMINE, C. The p15INK4b/p16INK4a/RB1 Pathway is Frequently Deregulated in Human Pituitary Adenomas. **J Neuropathol Exp Neurol,** ed. 64, p. 398-403, 2005.

OLDHAM, R. K., DILLMAN, R. O. Monoclonal Antibodies in Cancer Therap: 25 Years of Progress. **J Clinical Oncology**, v 26, 2008.

OLIVEIRA, L. B. O., GOMES, C. F., BAMPI, V., RHEINGANTZ, M. G., SOUZA, M. A. L. Angiogênese e Tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapia. **Vittale,** v 22, p 11-22, 2010.

OUYANG, D. Y., ZENG, L. H., PAN, H., XU, L. H., LIU, K. P., HE, X. H. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest autophagy. **Food and Chemical Toxicology,** v 60, p 424-430, 2013.

OZASLAN, M., KARAGOZ, I. D., KILIC, I. H., GULDUR, M. E. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology,** v 10, p 2375-2378, 2011.

PATRA, S., MUTHURAMAN, M. S., MEENU, M., PRIYA, P., PEMAIAH, B. Anfi-inflammatory effects of royal poinciana through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. **International Immunipharmacology,** v. 34, p 199-211, 2016.

PAULOVICH, A. G., TOCZYSKI, D. P., HARTWELL, L. H., When Checkpoints Fail. **Cell.** Ed. 88, p. 315-321, 1997.

PHUMEETHAM, S., CHAT-UTHAI, N., MANAVATHONGCHAI, M., VIPRAKASIT, V. Genetic association study of tumor necrosis factor-alpha with sepsis and septic shock in Thai pediatric patients. **J Pediatr (Rio J)**, v 88 :p 417-422, 2012.

PIYACHATURAWAT, P., GLINSUKON, T. AND TOSKULKAO, C. Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. ***Toxicology Letters***, Vol. 16, pp. 351-359, 1983.

PORTT, L., NORMAN, G., CLAPP, C., GREENWOOD, M., GREENWOOD, M. T. Anti-apoptosis and cell survival: A review. **Molecular Cell Research,** v. 1813, p. 238-259, 2011.

POTENTE, M., GERHARDT, H., CARMELIET, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. **Cell,** v 146, p 873-888, 2011.

POZAROWSKI, P. & DARZYNKIEWICZ, Z. Analyses of Cell Cycle by Flow Cytometry. **Methods in Molecular Biology,** v 281, p 301-313, 2004.

PROSKURYAKOV, S. Y., KONOPLYANNIKOV, A. G., GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exp Cell Res**, v. 283, p. 1-16, 2003.

RAMALINGAM, T. R., PESCE, J. T., SHEIKH, F., CHEEVER, A. W., MENTINK-KANE, M. M., WILSON, M. S., STEVENS, S., VALENZUELA, D. M. Unique funcions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receotir alpha1 chain. **Nat Immunol,** v 9, p 25-33, 2008.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radic Biol Med,** v 49, p 1603-1616, 2010.

RIDER, P., CARMI, Y., GUTTMAN, O., BRAIMAN, A., COHEN, I., VORONOV, E., WHITE, M. R., DINARELLO, C.A., APTE, R. N. IL-1α and IL-1β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. **J Immunol**. v 187, p 4835–4843, 2011.

ROBINS & COTRAN. Patologia: Bases Patológicas das doenças. 8ªed. 2010.

ROCA, H., CRAIG, M. J., VARSOS, Z. S., CZARNIESKI, P., ALVA, A. S., HERNANDEZ, J., FULLER, D., DAIGNAULT, S., HEALY, P. N., PIENTA, K. J. IL-4 induces proliferation in prostate cancer PC3 cells under nutriente-depletion stress through the activation of the JNK-pathway and survivin upregulation. **J Cell Biochem,** v 113, p 1569-1580, 2012.

SAFARZADEH, E., SANDOGHCHIAN, S. S., BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment, **Adv Pharm Bull**, Vol 4, pp. 421-427. 2014.

SATO, T., TERAI, M., TAMURA, Y., ALEXEEV, V., MASTRANGELO, M. J., SELVAN, R, S. Interleukin 10 in the tumor microenvironmment: a target for anticâncer immunotherapy. **Immunol Res,** v 51, 170-182, 2011.

SEMENZA, G. L. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast câncer progression. **Biochimica et Biophysica Acta,** v 1863, p 382-391, 2016.

SHALAPOUR, S. & KARIN, M. Immunity, inflammation, and câncer: na eternal figth between good ande evil. **The Journal of Clinical Investigation,** v 125, p 3347-3355, 2015.

SHANTHINI, M. C. & BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agentes. **Nature,** v 15, p 584-597, 2015.

SIDDIQUI, I. A., SANNA, V., AHMAD, N., SECHI, M., MUKHTAR, H. REsveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences.** P. 1-12, 2015.

SILVA, A. H. C.; SILVA2, D. M., RIBAS, C. R., DITTRICH, R. L., DORNBUSCH, P. T., GUÉRIOS, S. D. ALTERAÇÕES NO HEMOGRAMA DE CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA. **Ciencia Animal Brasileira**., v.15, n.1, p. 87-92, 2014

SILVA-FILHO, J. L., CARUSO-NEVES, C., PINHEIRO, A. A. S. IL-4: an important cytokine in determining the fate of T cells. **Biophys Rev,** v 6, p 111-118, 2014.

SKOTHEIM, J. M., DI TALIA, S., SIGGIA, E. D., CROSS, F. R. Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell ceycle entry. **Nature,** vol. 454, p. 291-296, 2011.

SMITH, M. T., GUYTON, K. Z., GIBBONS, C. F., FRITZ, J. M., PORTIER, C. J., RUSYN, I., DEMARINI, D. M., CALDWELL, J. C., KAVLOCK, R. J., HECHT, S. S., BUCHER, J. R., STEWART, B. W., BANN, R. A. COGLIANO, V. J., STRAIF, K. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. **Environmental Health Perspectiver,** v 124, p 713-722, 2016.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H. Oxidative stress and cancer: An overreview. **Ageing Research Reviews,** v 12, p 376-390, 2013.

STAMATOVIC, S. M.; KEEP, R. F.; MOSTARICA-STOJKOVIC, M.; ANDJELKOVIC, A. V. CCL2 Regulates Angiogenesis via Activation of Ets-1 Transcription Factor. **Vaccine Adjuvants,** v 177, p 2651-2661, 2006.

STEWART, B. W., BRAY, F., FORMAN, D., OHGAKI, H., STRAIF, K., ULLRICH, A., WILD, C. P. Cancer prevention as part of precision medicine: “plenty to be done”. **Carcinogenesis,** vol. 37, p. 2-9, 2016.

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

STREINBRINK, K., JONULEIT, G., SCHULER, J., KNOP, A. H., ENK. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specifc anergy in $CD8^+$ T cells resultindo in a failure to lyse tumor cells, **Blood,** v 93, p 1634-1642, 1999.

SUNILA, E. S. & KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn and piperine. **Journal of Ethnopharmacology,** v 90, p 339-346, 2004.

TAGA, K., TOSATO, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. **K Immunol.,** v 148, p 1143-1148, 1992.

TAGERGORABI, Z., KHAZAEI, M. A Review on Angiogenesis and Its Assays. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences,** v 15, p 1110-1126, 2012.

THIEL, A., BUSKENS, C., WORHRLE, T., ETHEVE, S., SCHOENMAKERS, A., FEHR, M., BEILSTEIN, P. Black pepper constituient piperine: Genotoxicity stuies *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology,** v 66, p 350-357, 2014.

TIAN, M., YUAN, Y. C., LI, J. Y., GIONFRIDDO, M. R., HUANG, R. C. Tumor Necosis fator-α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. **Chronic Diseases and Translational Medicine,** v 1, p 18-26, 2015.

TIEZZI, D. G. Cirurgia conservadora no câncer de mama. **Revista brasileira de Ginecologia e Obstetrícia,** v. 25, n.6, p. 428-434, 2007.

TODARO M, ZERILLI M, RICCI-VITIANI L, BINI M, PEREZ ALEA M, MARIA FLORENA A, MICELI L, CONDORELLI G, BONVENTRE S, DI GESU G, DE MARIA R, STASSI G. Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells. **Cancer research**. V 66, p 1491–1499, 2006.

TRINCHIERI, G. Cancer and Inflammation: And Old Intuition with Rapidly Evolving New Concepts. **Annu Ver Immunol,** v 30, p 677-706, 2012.

VASUDEV, N. S. & REYNOLDS, A. R. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. **Angiogenesis,** v 17, p 471-494, 2014.

VERBEKE, H,M STRUYF, S., LAUREYS, G., VAN, D. J. The expression. And role of CXC chemokines in colorectal câncer. **Cytokine Growth Factor Rev.,** v 22, p 345, 2011.

VIEIRA, P. M., PAULA, J. R.; CHEN-CHEN, L. *Solanum paniculatum* L. Leaf and Fruit Extracts: assessment of modulation of cytotoxicity and genotoxicity by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology,** v 70, n 3, p 601-606, 2010.

WAJANT, H. The role of TNF in cancer. In: Death Receptors and Cognate Ligands in Cancer. **Springer Berlin Heidelberg**, p. 1-15, 2009

WANG, Z., FAN, M., CANDAS, D., ZHANG, T. Q., ELDRIDGE, A., WACHSMANN-HOGIU, S., AHRMED, K. M., CHROMY, B. A., NANTAJIT, D., DURU, N., HE, F., CHEN, M., FINKEL, T., WEINSTEIN, L. S., LI, J. J. Cyclin B1/Cdk1 Coordinates Mitochondrial Respiration for Cell-Cycle G2/M Progression. **Developmental Cell,** v 29, p 217-232, 2014.

WATERS, J. P.; POBER, J. S.; BRADLEY, J. R; Tumour necrosis factor and cancer. **Journal of Pathology,** v 230, p 241-248, 2013.

WORLD HEALH ORGANIZATION – WHO 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> acessado em: 21 de fevereiro de 2016.

WYLLIE, A. H. Apoptosis: na overview. **Br Med Bull,** v. 53, p.451-465, 1997.

YAFFE, P. B., DOUCETTE, C. D., WALSH, M., HOSKIN, D. W. Piperine impairs cell cycle progression and causese reactive oxygen species-dependent

apoptosis in cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology,** v 94, p 109-114, 2013.

YAMADA, T. Therapeutic Monoclonal Antibodies. **The Keio Journal of Medicine,** p 37-47, 2010.

YING, X., YU, K., CHEN, X., CHEN, H., HONG, J. CHENG, S., PENG, L. Piperine inhibits LPS induced expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. **Cellular Immunology,** v 285, p 49-54, 2013.

YOSHIDA, T. ; OKA, S.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; YODOJ, J. The role thioredoxin in the aging processo: involvement of oxidative stress. **Antioxidants & Redox signaling,** v 5, p 2064-2075, 2003.

ZAIDI, M. R. & MERLINO, G. Two Faces of Interferon-γ in cancer. **Clin Cancer Res.,** v 17, p 6118-6124, 2011.

ZHENYI, S. YANG, Z., XU, Y. CHEN, Y. YU, Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer,** p.14-48, 2015.

ZHU, J., JANKOVIC, D., OLER, A. J., WEI, G., SHARMA, S., HU, G., GUO, L., YAMANE, H., PUNKOSDY, G., FEIGENBAUM, L., ZHAO, K, PAUL, W. E. The transcription fator T-bet is induced by multiple pathways and prevents and endogenous T helper-2 program during T helper-1 responses. **Immunity,** v 37, p 660-673, 2012.

ZITVOGEL, L.; KEPP, O.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Inflammasome in carcinogenesis and anticancer immune responses. **Nature immunology,** v 13, p 343-352, 2012.

Anexos

ANEXO A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**ESTUDO DA TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL ANÁLOGO DA 2-OXO-2-(4 NITROFENILAMINA)-PIPERINOATO DE ETILA**", protocolo **nº 005/2016** sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. **Marianna Vieira Sobral** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2016 a 2018
Espécie/linhagem	Camundongos Swiss
Número de animais	140 animais
Peso/idade	60 dias (28 a 30 g)
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George

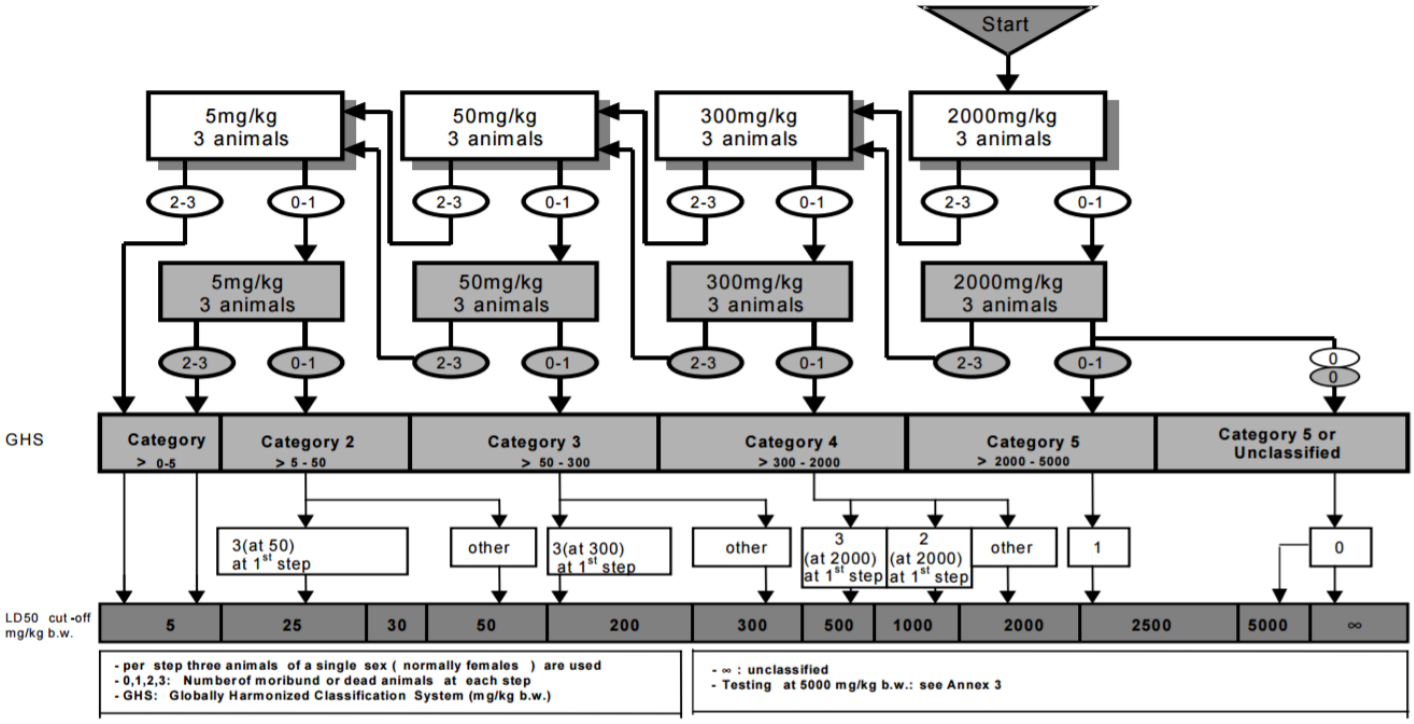
Islania Giselia Albuquerque Gonçalves

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

Prof. Dra. Islania G. A. Gonçalves
Coordenadora CEUA/UFPB
SIAPE 3366301

CEUA-UFPB – Campus I – Reitoria - 1º andar - E-mail: ceua@ufpb.br – Site: www.ufpb.br/ceua/

ANEXO B – Fluxograma de realização de toxicidade aguda com uma dose inicial de 2000 mg/kg



ANEXO A – Ficha de triagem farmacológica comportamental (tempos adaptados)

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras_____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonia					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo comeal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Observações complementares.:_____

_____

_____

FONTE: ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos,1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 11, p. 131-137.