

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

TATYANNA KÉLVIA GOMES DE SOUSA

**ESTUDO DA TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO ANÁLOGO DA
PIPERINA 2-OXO-2-(4-ETILFENILAMINA)-PIPERINOATO DE ETILA**

João Pessoa – PB

2015

TATYANNA KÉLVIA GOMES DE SOUSA

**ESTUDO DA TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO ANÁLOGO DA
PIPERINA 2-OXO-2-(4-ETILFENILAMINA)-PIPERINOATO DE ETILA**

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

2015

S725e Sousa, Tatyanna Kélvia Gomes de.
 Estudo da toxicidade e potencial antitumoral do análogo da
 piperina 2-OXO-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila /
 Tatyanna Kélvia Gomes de Sousa.- João Pessoa, 2015.
 129f.
 Orientadora: Marianna Vieira Sobral
 Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
 1. Produtos naturais. 2. Farmacologia. 3. Piperina. 4. Tumor
 de Ehrlich. 5. Atividade antiangiogênica. 6. Toxicidade.

UFPB/BC

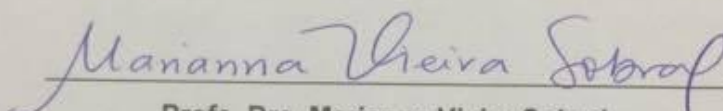
CDU: 547.9(043)

TATYANNA KÉLVIA GOMES DE SOUSA

ESTUDO DA TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO ANÁLOGO DA
PIPERINA 2-OXO-2-(4-ETILFENILAMINA)-PIPERINOATO DE ETILA

APROVADA EM / /2015

COMISSÃO EXAMINADORA

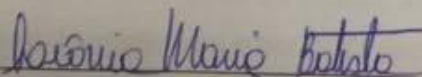


Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

(Orientadora – UFPB)

Profa. Dra. Liana Clébia de Moraes Pordeus

(Examinador Externo – UFPB)



Profa. Dra. Leônia Maria Batista

(Examinador Interno - UFPB)

*Aos meus pais, **Valter Justino de Sousa** e **Maria Salete Gomes Lima de Sousa**, tesouro mais precioso, pelo amor incondicional e por tanta dedicação, amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida, por me amar incondicionalmente e me amparar em todos os momentos, principalmente quando pensei em desistir. Obrigada Senhor!

À **Nossa Senhora das Graças** por todas as graças a mim concedidas, principalmente pela fé, força e coragem, que me levam a prosseguir.

Aos meus pais, **Maria Salete Gomes Lima de Sousa** e **Valter Justino de Sousa**, pessoas que amo incondicionalmente, que mesmo longe, nunca deixaram de estar perto. Obrigada por todo amor, carinho e dedicação, pelas renúncias e esforços que me permitiram chegar até aqui. Vocês são meus exemplos de vida, meu porto seguro, razão pelo qual estou aqui hoje. Amo muito vocês! Muito obrigada!

À minha irmã **Tacyanne Késsia Gomes de Sousa** pelo carinho, compreensão, apoio e torcida sempre. Sinto saudades da convivência diária! Te amo!

Aos meus sobrinhos, **Lucas**, **Maria Vitória** e **Ana Lívia**, pelo me oferecerem o amor mais puro que existe, pela alegria constante, por sempre terem um gesto de ânimo quando estou querendo desanimar. Vocês são meus tesouros! Tia Taty ama os três!

A minha querida avó **Francisca Iracema Gomes**, pelo exemplo de vida e incentivo, pelo cuidado e preocupação exagerados. E a meu grandioso avô, **Severino Gomes Sobrinho** (*in memoriam*), pela determinação e perseverança em tudo. Obrigada pelo amor e apoio incondicional. Vocês são referências para mim.

Aos meus tios e tias, pelo amparo que recebi quando sai de casa, por cuidarem de mim como uma filha, por compartilharem comigo alegrias e tristezas, por serem presença constante em minha vida e pela dedicação de tanto amor e carinho. Obrigada pela força!

Aos meus primos e primas por serem minha família, pelo incentivo, torcida e apoio sempre.

Ao meu cunhado **Elpídio Pereira**, pelo carinho e torcida constante.

A meu melhor amigo e amado namorado **Edgar Vágner Bezerra Silva**, pela presença constante, incentivo, amor, companheirismo e paciência em todos os momentos, sempre de prontidão para me ajudar, aguentando inclusive meus estresses. Você também foi peça chave para a realização desse sonho. Admiro e amo muito!

Aos meus sogros **Sicleide Maria** e **Valdei Cavalcanti**, como também a minha cunhada **Marília Karen**, por se preocuparem comigo e por todo carinho a mim dedicado. Vocês também são minha família!

Aos meus amigos de infância **Anna Karenyna**, **Gislenne Maciel** e **Francileudo Lucena**, pela amizade, confiança e torcida de sempre, independente da distância.

A minha eterna turma do Instituto Educacional Vera Cruz, **Airla**, **Henrique**, **Vanessa**, **Heveline**, **André**, **Aislan**, amigos pelos quais tenho muito carinho, e que apesar da distância, a nossa amizade permanece a mesma. Sinto saudades!

Aos amigos que a universidade me deu de presente, pessoas com as quais convivi durante quase 6 anos e com elas pude aprender muitas coisas, **Danielly**, **Ana Edite**, **Alan**. Obrigada pela torcida constante que me impulsionava a seguir sempre em frente. Carregarei vocês para sempre no meu coração!

A minha grande amiga e irmã **Maria Emilia**, que é minha amiga de infância, da escola, da graduação, que acompanha minha caminhada desde sempre. Obrigada pelo apoio e por estar ao meu lado nas derrotas e nas vitórias, por chorar comigo nas tristezas e vibrar nas vitórias e alegrias. Muito obrigada! Amo você.

A minha orientadora, Profa. Dra. **Marianna Vieira Sobral Castello Branco** pela orientação e principalmente pela inteira dedicação e ensinamentos transmitidos, por ter me acolhido quando ainda engatinhava e ter me ensinado a andar com minhas próprias pernas. Obrigada por ser essa pessoa múltipla: professora, amiga e muitas vezes mãe, que briga, mas que também ama. Seus “carões” e suas palavras de amor representam muito para mim e me fazem crescer. Sua inteligência e prestatividade servirão de referência para minha vida pessoal e profissional. Você é um exemplo de vida, competência e profissionalismo.

Aos amigos de pós-graduação do Laboratório de Oncofarmacologia (Oncofar), **Heloísa Mara**, **Déborah Pessoa**, **Monalisa Brito**, **Daiene Lunguinho**, **Ana Paula Gomes**, **Aline Xavier** e **João Carlos Pita** pela ajuda, incentivo e torcida durante toda essa caminhada. Especialmente às amigas **Tatianne Mota** e **Vivianne Mendes**, pela amizade e carinho além do laboratório e vida acadêmica. Agradeço também a **Renata Abrantes**, **Ryldene Marques**, **Fernando** e **Jamilly** pela torcida e disponibilidade em ajudar, seja com atitudes ou palavras, nos momentos de descrença com o futuro.

As professoras **Dra. Liana Clébia de Moraes Pordeus** e **Dra. Leonia Maria Batista** pela gentileza de participar da avaliação deste trabalho.

Aos Professores **Dr. Bruno Lira** e **Dr. Petrônio Filgueira Filho**, bem como a **Helivaldo Souza** pelo fornecimento da substância teste.

Ao prof. **Dr. Robson Veras** e **Fátima de Lourdes Assunção Azevedo**, pela receptividade no seu laboratório e presteza em nos ajudar nos experimentos, além de confortar com palavras de carinho nos momentos de angústia com os experimentos.

A todos os professores do mestrado, pelos ensinamentos científicos e lições de vida.

A minha turma de mestrado por todos os momentos de aperreios e vitórias que vivemos juntos. Agradeço pelas experiências compartilhadas e pela amizade que cultivamos. De forma especial, agradeço a **Luciano Leite**, minha eterna dupla, pela amizade e companheirismo além sala de aula.

A **Universidade Federal da Paraíba**, instituição maior, pelo desenvolvimento na minha carreira profissional.

A **Jean** pela prestatividade e constante ajuda na realização dos exames bioquímicos e hematológicos.

A todos os **funcionários** do IPeFarM, especialmente **Sr. Josué**, e as secretárias da Pós-graduação **Caroline Medeiros Mangueira** e **Dayana Rosa Brandão** pelos serviços prestados.

Ao amigo **José Crispim Duarte** pelo constante incentivo e apoio.

A **Luis Cordeiro** e **Adriano Silva**, pela disponibilidade e apoio técnico imprescindível na execução deste trabalho.

Ao **Biotério** Prof. Dr. Thomas George do IPeFarM pelo fornecimento dos animais.

Ao **CNPq** pela bolsa concedida durante o período de mestrado.

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse sonho.

Muito obrigada!

Tatyanna Kélvia Gomes de Sousa

*Tens o dom de ver estradas
Onde eu vejo o fim
Me convences quando falas:
Não é bem assim!
Se me esqueço, me recordas
Se não sei, me ensinas.
E se perco a direção
Vens me encontrar
Tens o dom de ouvir segredos
Mesmo se me calo
E se falo me escutas
Queres compreender
Se pela força da distância
Tu te ausentas
Pelo poder que há na saudade
Voltarás!
Quando a solidão doeu em mim
Quando o meu passado não passou por mim
Quando eu não soube compreender a vida
Tu vieste compreender por mim
Quando os meus olhos não podiam ver
Tua mão segura me ajudou a andar
Quando eu não tinha mais amor no peito
Teu amor me ajudou a amar
Quando os meus sonhos vi desmoronar
Me trouxeste outros pra recomeçar
Quando me esqueci que era alguém na vida
Teu amor veio me relembrar
Que Deus me ama
Que não estou só
Que Deus cuida de mim
Quando fala pela tua voz
E me diz: coragem!*

Pe. Fábio de Melo – Humano amor de Deus

SOUSA, T. K. G. **ESTUDO DA TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO ANÁLOGO DA PIPERINA 2-OXO-2-(4-ETILFENILAMINA)-PIPERINOATO DE ETILA**. 2015. 129f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS/UFPB, João Pessoa.

RESUMO

O câncer caracteriza-se pela proliferação descontrolada de células. A elevada taxa de mortalidade associada à doença, aliada aos graves efeitos indesejáveis causados pelos tratamentos convencionais e ao crescente desenvolvimento de resistência, tem impulsionado a procura por terapias mais eficazes com menor toxicidade. Nesse contexto, é de grande relevância a síntese de produtos sintéticos com estruturas baseadas em produtos naturais, que continuam a ser a principal fonte de novos medicamentos. Com o intuito de potencializar o efeito e minimizar a toxicidade da piperina, um alcaloide amida com atividade antitumoral, foram obtidos análogos sintéticos inéditos, dentre estes o 2-oxo-2-(4-etilamina)-piperinoato de etila (HE-03). Esse trabalho objetivou investigar a atividade antitumoral, bem como a toxicidade do HE-03. Os dados demonstram que HE-03 induziu pequeno percentual de hemólise até a maior concentração testada (1250 µg/mL), o que sugere baixa toxicidade nos eritrócitos. No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda, o tratamento com as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg do HE-03 não provocou mortes nos camundongos, e as alterações observadas em nível de SNC e SNA foram de curta duração (30 min.) e sem significância no tempo observado. O valor da DL₅₀ foi estimado em torno de 5000 mg/kg. HE-03 (6,25; 12,5 e 25 mg/kg) mostrou significativa atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, considerando especialmente os parâmetros viabilidade e total celular. Seu efeito nas doses de 12,5 e 25 mg/kg foi semelhante ao observado para o antineoplásico 5-fluorouracil (25 mg/kg). Na análise do perfil do ciclo celular, foi observado que o tratamento com HE-03 (12,5 mg/kg) induziu o aparecimento do pico sub-G1, que foi acompanhado por uma redução na quantidade de células nas fases G0/G1 e S, o que sugere indução de morte celular por apoptose. O tratamento com HE-03 (12,5 mg/kg) reduziu significativamente a microdensidade vascular peritumoral, o que sugere atividade antiangiogênica. As análises toxicológicas indicam que o tratamento de nove dias com HE-03, em todas as doses, induziu aumento significativo de aspartato aminotransferase (AST) e de ureia. Todavia, a histopatologia do fígado e dos rins mostrou que HE-03 não induz alterações de importância clínica. A leucopenia, acompanhada de neutropenia, observadas nos animais tratados com 25 mg/kg de HE-03 é um dos principais efeitos indesejáveis associados a terapia do câncer. Ainda, HE-03 não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados, no ensaio do micronúcleo em sangue periférico, o que indica ausência de genotoxicidade, nas condições avaliadas. Portanto, é possível inferir que o análogo sintético da piperina estudado apresenta potente atividade antitumoral *in vivo*, com mecanismo que envolve possivelmente a indução de apoptose e efeitos antiangiogênicos, bem como, baixa toxicidade.

Palavras-chave: Piperina, Tumor de Ehrlich, Atividade antiangiogênica, Toxicidade.

SOUSA, T. K. G. **ESTUDO DA TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO ANÁLOGO DA PIPERINA 2-OXO-2-(4-ETILFENILAMINA)-PIPERINOATO DE ETILA**. 2015. 129f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS/UFPB, João Pessoa.

ABSTRACT

Cancer is characterized by uncontrolled proliferation of abnormal cells. The high mortality rate associated with the disease, coupled to severe side effects caused by conventional treatments and the increasing development of resistance, has conducted to the demand for effective therapies with less toxicity. In this context, it is of great relevance the synthesis of synthetic products with structures based on natural products, which continue to be the main source of new medicines. In order to increase the effect and minimize the toxicity of piperine, an amide alkaloid with antitumor activity, it was obtained novel synthetic analogues, among them the 2-oxo-2-(4-ethylamine)-piperinoato acetate (HE-03). This study aimed to investigate the antitumor activity and toxicity of HE-03. The data demonstrate that HE-03 induced a small percentage of hemolysis to the highest concentration tested (1250 mg/mL), which suggests low toxicity to erythrocytes. In the preclinical acute toxicity study, the treatment with doses of 300 mg/kg and 2000 mg/kg of HE-03 in mice caused no deaths, and the changes observed in the CNS and ASN level were transient (30 min.). The LD50 value was estimated to be about 5000 mg/kg. HE-03 (6.25, 12.5 and 25 mg/kg) showed significant antitumor activity *in vivo* in ascites Ehrlich carcinoma model, especially considering the viability parameters and total cell. Its effect in doses of 12.5 and 25 mg/kg was similar to the one observed for the anticancer drug 5-fluorouracil (25 mg/kg). Cell cycle profile analysis showed that treatment with HE-03 (12.5 mg/kg) induced the appearance of sub-G1 peak, which was accompanied by a reduction in the number of cells in G0/G1 and S phases, suggesting induction of cell death by apoptosis. The treatment with HE-03 (12.5 mg/kg) significantly reduced peritumoral microvessels, which suggests anti-angiogenic activity. The toxicological analyzes indicate that the nine days of treatment with HE-03 at all doses, induced a significant increase in serum aspartate aminotransferase (AST) and urea. However, histopathology of the liver and kidneys showed that HE-03 does not induce changes of clinical importance. Leukopenia, accompanied by neutropenia, observed in animals treated with 25 mg/kg of HE-03 is one of the major side effects associated with cancer therapy. Furthermore, HE-03 did not induce an increase in the number of micronucleated erythrocytes in the micronucleus assay in peripheral blood, which indicates lack of genotoxicity in the evaluated conditions. Therefore, it is possible to infer that the synthetic analogue of studied piperine has potent antitumor activity *in vivo*, with mechanism that possibly involves the induction of apoptosis and antiangiogenic effects, as well as low toxicity.

Keywords: Piperine, Ehrlich tumor, anti-angiogenic activity, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do 2-oxo-2-(4-etilamina)-piperinoato de etila.....	51
Figura 2.	Reação de obtenção dos derivados da piperina.....	57
Figura 3.	Efeito do tratamento com HE-03 e 5-FU em camundongos transplantedos com CAE.....	67
Figura 4.	Percentagem de células de CAE nas diferentes fases do ciclo celular após os tratamentos com HE-03.....	68
Figura 5.	Efeito do tratamento com HE-03 e 5-FU na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantedos com CAE.....	69
Figura 6.	Figuras representativas da histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais.....	76
Figura 7.	Figuras representativas da histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais.....	78
Figura 8.	Figuras representativas da histopatologia dos fígados dos animais tratados com HE-03.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Efeitos da administração i.p. de doses únicas de HE-03 em camundongos.....	66
Tabela 2.	Consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos com HE-03 e 5-FU.....	70
Tabela 3.	Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos com HE-03 e 5-FU.....	71
Tabela 4.	Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos com HE-03 e 5-FU.....	71
Tabela 5.	Índices dos órgãos de camundongos transplantados CAE submetidos aos diferentes tratamentos com HE-03 e 5-FU.....	74
Tabela 6.	Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com HE-03 (2000 mg/kg) e ciclofosfamida (50 mg/kg – i.p.).....	80

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1.	Representação esquemática dos métodos utilizados para a avaliação da toxicidade e atividade antitumoral <i>in vivo</i> do análogo da piperina 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila.....	55
----------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluorouracil
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apaf-1	Fator de ativação de protease associada à apoptose 1
AST	Aspartato aminotransferase
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein-2-family</i>
CAE	Carcinoma Ascítico de Ehrlich
CDKs	Cinases dependentes de ciclina
CEUA	Comissão de Ética no Uso em Animais
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CH₅₀	Concentração que produz 50 % de hemólise
CH₂CH₃	Etila
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
CPQBA	Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas
DD	Domínio de morte
Dll4-Notch	<i>Delta-like 4-Notch</i>
DL₅₀	Dose que induz morte de 50% dos animais experimentais
DMF	n,n-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
EMT	Fenótipo de transição epitélio-mesenquimal
ER+	Receptor de estrógeno positivo
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Et3N	Trietilamina
FADD	Domínio de morte associado a Fas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FdUMP	5-fluoro-2'-deoxyuridina-5'-monofosfato

FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
FUTP	5-fluorouridina-5'-trifosfato
GHS	<i>Globally Harmonized Classification System</i>
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HE	Hematoxilina-eosina
HE-03	2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HFS	Solução fluorocrômica hipotônica
HPV	Papiloma vírus humano
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
i.g.	Intragástrica
ILs	Interleucinas
i.m.	Intramuscular
INFs	Interferons
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
KOH	Hidróxido de potássio
LDH	Lactato desidrogenase
mAb	Anticorpos monoclonais
NHL	Linfoma não-Hodgkin
NPN	Nitrogenados não protéicos
NO	Óxido nítrico
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OncoFar	Laboratório de Oncofarmacologia
PAP	Fosfatase ácida prostática
p/v	Peso/volume
PBS	Solução Tampão Fosfato
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PI	Iodeto de propídeo
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos

Rb	Retinoblastoma
RIP	Interação proteína receptor
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	Receptor do fator de crescimento tirosina cinase
s.c.	Subcutâneo
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
TGF	Taxa de filtração glomerular
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-R1	Receptor do fator de necrose tumoral 1
TK	Tirosina quinase
TS	Timidilato sintase
TRADD	Domínio de morte associado ao receptor TNF
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1 Câncer.....	23
2.1.1 Etiologia, epidemiologia e tratamento.....	23
2.1.2 O controle do ciclo celular e apoptose	31
2.1.3 Angiogênese tumoral.....	36
2.1.4 Toxicidade de antineoplásicos	39
2.2 Estudo da farmacologia/toxicologia de fármacos com potencial anticâncer	43
2.3 Produtos naturais e o tratamento do câncer.....	47
2.4 A piperina e seus derivados	49
3 OBJETIVOS.....	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Local da pesquisa	56
4.2 Material.....	56
4.2.1 Síntese do 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila	56
4.2.2 Linhagem de células tumorais.....	57
4.2.3 Animais.....	57
4.3 Métodos.....	58
4.3.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos	58
4.3.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda	59
4.3.3 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE).....	59
4.3.3.1 Massa tumoral, volume do tumor, viabilidade e total celular	60
4.3.3.2 Análise do ciclo celular	60
4.3.3.3 Investigação do efeito antiangiogênico	61
4.3.3.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com CAE e submetidos ao tratamento com HE-03	61
4.3.3.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração.....	61
4.3.3.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	61

4.3.3.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos	62
4.3.3.4.4 Análises histopatológicas	62
4.3.4 Avaliação da genotoxicidade	62
4.4 Análise estatística	63
5 RESULTADOS	65
5.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos	65
5.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda	65
5.3 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich	66
5.3.1 Massa tumoral, volume do tumor, viabilidade e total celular	66
5.3.2 Análise do ciclo celular	67
5.3.3 Investigação do efeito antiangiogênico	68
5.3.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com CAE e submetidos ao tratamento com HE-03	69
5.3.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração	69
5.3.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	70
5.3.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos	73
5.3.4.4 Análises histopatológicas	74
5.4 Avaliação da genotoxicidade	80
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	102
ANEXOS	128

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico utilizado para definir um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do organismo. É caracterizado especialmente pela produção rápida de células transformadas que crescem para além dos seus limites usuais, e que podem então invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos, causando as chamadas metástases, o que representa a principal causa de morte por câncer (WHO, 2010).

Dados epidemiológicos apontam que uma em cada três pessoas irão desenvolver a doença em algum momento de sua vida (THORLEY; TETLEY, 2013). Em 2030, a incidência estimada é de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer no mundo (BRASIL, 2014; TAVAKOLI et al., 2012). Isso reflete a eficácia limitada que acontece, muitas vezes, na terapia antineoplásica convencional, o que produz os altos índices de mortalidade (GAO et al., 2014).

Muitos agentes quimioterápicos são usados para tratar diferentes tipos de câncer, porém, um obstáculo comum das terapias atuais é a incapacidade de atingir elevadas concentrações do agente antineoplásico no tumor, sem causar efeitos secundários graves nas células normais do organismo (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014; THORLEY; TETLEY, 2013). Nesse contexto, estratégias para garantir a citotoxicidade diferencial, reduzir o desenvolvimento de resistência aos antineoplásicos e a frequência de administração são essenciais (WU; ZHOU, 2015).

Historicamente, compostos derivados de plantas têm desempenhado um importante papel no desenvolvimento de vários agentes antineoplásicos. No século XX observou-se um avanço significativo na pesquisa de produtos naturais no campo da oncologia, relacionados a plantas, organismos marinhos e micro-organismos, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. Cerca de 60% dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais. Dentre esses se destacam a vimblastina e a vincristina e os análogos vindesina e vinorelbina; o paclitaxel e o análogo docetaxel; a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo e teniposídeo; e a camptotecina e os análogos, topotecano e irinotecano. Estes fármacos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares

(COSTA-LOTUFO et al., 2010; CRAGG; NEWMAN, 2013). Ainda, novos agentes promissores, naturais ou sintéticos com estruturas baseadas em produtos naturais, estão nos ensaios de fase clínica, como exemplo pode ser citada a combretastina A4 fosfato (KAPOOR, 2013).

Estudos relatados na literatura mostram que o alcaloide amida piperina (amida piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(E)-4(E)-pentadienoico) isolado originalmente de frutos da pimenta preta (*Piper nigrum* Linn) e pimenta longa (*Piper longum* Linn) (MADHAVI et al., 2009; MEGHWAL; GOSWAMI, 2013) 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, apesar da significativa atividade *in vivo*, a piperina apresenta grande toxicidade, visto que a dose que produz morte de 50% dos animais experimentais (DL₅₀) foi calculada em torno de 43 mg/kg (i.p.) para camundongos machos e 60 mg/kg (i.p.) para fêmeas (PIYACHATURAWAT et al., 1983).

No final do século XIX, a busca por medicamentos menos tóxicos resultou na introdução de substâncias sintéticas na terapêutica e seu uso foi amplamente disseminado no século XX (OLIVEIRA et al., 2010). Nesta conjuntura, várias substâncias sintéticas podem ser obtidas por meio da síntese de novos compostos ou por modificações na estrutura de moléculas já conhecidas, direcionada pela relação estrutura química e ação biológica (ATHAYDE-FILHO, 2007).

Assim, com o objetivo de maximizar os efeitos farmacológicos e minimizar a toxicidade da piperina, foi sintetizado o análogo 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila (HE-03), para o qual não existem relatos na literatura de descrição química ou de atividade biológica.

Diante desse contexto, o presente trabalho objetiva contribuir para a pesquisa científica no que se refere à investigação da toxicologia e atividade farmacológica de produtos sintéticos, como o HE-03, um análogo sintético inédito da piperina, por meio da avaliação de sua toxicidade e atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Referencial teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer

2.1.1 Etiologia, epidemiologia e tratamento

Neoplasia é uma proliferação anormal do tecido, que foge parcial ou totalmente ao controle do organismo e tende à autonomia e à perpetuação, com efeitos agressivos sobre o hospedeiro. As neoplasias correspondem as formas de crescimento não controladas e são denominadas de tumores (JÚNIOR et al., 2014). De acordo com o comportamento biológico os tumores podem ser agrupados em benignos ou malignos.

Os tumores benignos tendem a apresentar crescimento lento e expansivo determinando a compressão dos tecidos vizinhos, o que leva a formação de uma cápsula fibrosa, são não invasivos e reproduzem o aspecto das células do tecido que lhes deu origem. Já nos tumores malignos, o crescimento é rápido, desordenado, infiltrativo e destrutivo, o que não permite a formação da cápsula fibrosa, têm graus variados de diferenciação e, portanto, guardam pouca semelhança com as células que os originaram (TALMADGE; FIDLER, 2010). O termo câncer, que corresponde ao tumor maligno, é utilizado para caracterizar centenas de doenças heterogêneas de origem multifatorial (OUYANG et al., 2013). Estas doenças ocorrem como consequência de danos ao DNA e, por isso, são consideradas doenças genéticas.

O DNA, material genético de todas as células, age como modelador na produção de formas específicas de RNA transportador, RNA ribossômico e RNA mensageiro e, deste modo, determina qual proteína/enzima será sintetizada pela célula. As proteínas/enzimas são responsáveis pela maioria das funções celulares, e a interferência nesses processos irá afetar a função e a proliferação celular (BOGO, 2009).

Nesse contexto, diferentes agentes físicos (ultravioleta e radiação ionizante), químicos (constituintes da fumaça do cigarro, por exemplo) e biológicos (infecções por determinados vírus, bactérias e parasitas), além dos produtos tóxicos da própria célula (radicais livres, por exemplo) podem causar mutações no DNA que culminam com alterações nos processos de proliferação, diferenciação e/ou morte. Por sua vez,

estas alterações podem desencadear a carcinogênese, o processo de formação de um câncer, que pode durar de 1 a 30 anos (VIJAY AVIN et al., 2014).

A carcinogênese é um processo de múltiplos estágios ou mecanismos. A fase inicial do câncer inclui alterações celulares irreversíveis. A fase de promoção é quando ocorre a proliferação clonal das células, e a fase de progressão inclui a fase agressiva e metastática da doença. Nesse caso, a massa celular mutada pode permanecer no interior do tecido a partir do qual se originou ou pode ser distribuída para os outros tecidos, causando metástase (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Mais de 100 tipos de câncer têm sido reconhecidos (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo e às alterações nelas apresentadas. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2011), os diferentes tipos de câncer são classificados da seguinte forma: carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, e câncer do sistema nervoso central (JENA, 2012; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Já se a doença inicia em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Linfoma é o nome genérico usado para designar todo tipo de câncer do sistema linfático, e leucemia refere-se ao câncer nas células jovens sanguíneas que se acumulam na medula óssea (BRANDÃO et al., 2010).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. A incidência do câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Nestes, os tipos de câncer mais frequentes na população masculina foram próstata, pulmão e cólon e reto; e entre as mulheres foram mama, cólon e reto e pulmão. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; enquanto que mama, colo do útero e pulmão foram mais prevalentes nas mulheres (BRASIL, 2014). Em 2030, as estimativas apontam para a incidência de 21,4 milhões

de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer (BRASIL, 2014; TAVAKOLI et al., 2012).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2015 aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (BRASIL, 2014). Por todos os dados apresentados, o câncer é considerado atualmente uma tragédia humana e uma das doenças mais prevalentes na população (TAVAKOLI et al., 2012).

No câncer, as células tumorais compartilham várias características em comum, incluindo um potencial ilimitado de proliferação, acompanhado de transformação metabólica, uma vez que o metabolismo dessas células é reprogramado a fim de apoiar a rápida proliferação; autossuficiência em sinais de crescimento e resistência aos mecanismos antiproliferativos e apoptóticos; aquisição de imortalidade replicativa; instabilidade do genoma e inflamação promotora de tumor. Além disso, os tumores evoluem para angariar apoio a partir de células do estroma ao redor e atrair novos vasos sanguíneos (angiogênese) para levar nutrientes e oxigênio, bem como escapam da detecção imunológica, e, finalmente, produzem metástase em órgãos distantes (HANAHA; WEINBERG, 2011).

A promoção da angiogênese e a resistência a apoptose estão entre as características mais importantes do câncer (HANAHA; WEINBERG, 2011). O crescimento e expansão tumoral requerem não apenas habilidade proliferativa, mas também modulação negativa da morte celular e ativação angiogênica para produzir a neovasculatura tumoral, que irá suprir o tumor de oxigênio e nutrientes. Assim, a indução de apoptose e estratégias antiangiogênicas são importantes focos na terapia do câncer (BERGERS; HANAHA; COUSSENS, 1998 *apud* VIJAY AVIN et al., 2014).

Os tratamentos utilizados no câncer têm como objetivos a cura, evitar a recidiva, e aumentar a sobrevida com qualidade para o paciente. Cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, terapia alvo, hormonioterapia, criocirurgia e vacinas são alguns dos métodos utilizados no tratamento do câncer (YANG et al., 2012). Dependendo do tipo de câncer e do estágio da doença, pode ser feito a

combinação de dois ou mais tipos de tratamento (DA SILVA et al., 2012). Apesar da diversidade em relação aos métodos de tratamento, os resultados clínicos nem sempre são úteis e aceitáveis. Cirurgia, quimioterapia e radioterapia são considerados os métodos mais comuns de tratamento do câncer (YANG et al., 2012).

A cirurgia é a primeira linha de ação para eliminar o tumor, embora a quimioterapia sistêmica, radioterapia, ou uma combinação dos dois seja essencial, no caso da disseminação de metástases em todo o corpo (PRADOS et al., 2012).

A radioterapia é o procedimento mais utilizado para tumores localizados, que não podem ser retirados por cirurgia, ou para tumores que costumam retornar ao mesmo local após a cirurgia (LAWRENCE; TEM; GIACCIA, 2008).

Já a hormonioterapia é um tratamento que tem como objetivo impedir a ação dos hormônios que fazem as células cancerígenas crescerem. A hormonioterapia age bloqueando ou suprimindo os efeitos do hormônio sobre o órgão alvo (LÓPEZ et al., 2012; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Outro tipo de terapia usada é a imunoterapia, que consiste em estimular as células de defesa do organismo para atacarem as células cancerígenas. Tal reação pode ser provocada de várias maneiras, sendo uma delas a vacina (KANTOFF et al., 2010).

A quimioterapia é utilizada na terapia do câncer por ser um tratamento destinado a eliminar células de rápido crescimento, com o objetivo de destruir, controlar ou inibir o crescimento das células doentes. No entanto, ela também acaba afetando células saudáveis, dentre estas, as células capilares, as responsáveis por ações no trato gastrointestinal, no sangue e no sistema imunológico, o que culmina com o aparecimento de algumas reações tais como queda de cabelo, náuseas, vômitos e mielossupressão (BRANDÃO et al., 2010).

Embora muitas vezes a quimioterapia e a radioterapia sejam métodos eficazes para o tratamento do câncer, estes exercem efeitos secundários graves, que comprometem a saúde e a qualidade de vida dos pacientes (WANG et al., 2012). No entanto, além da toxicidade, consequência da baixa especificidade do tratamento, um problema crescente em relação à terapia antineoplásica é o desenvolvimento de resistência gradual das células cancerígenas, o que leva ao insucesso do tratamento (PAVELIC, 2014).

O desenvolvimento de novos compostos efetivos e menos tóxicos com ação para terapia alvo contra o câncer tem sido uma busca constante, e muitas pesquisas tem sido direcionadas para descoberta de agentes anticancerígenos com ação citotóxica seletiva para células tumorais (VIJAY AVIN et al., 2014). Baseadas em avanços significativos no conhecimento da biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo da enfermidade, como inibição da polimerização da tubulina, atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares (BRANDÃO et al., 2010).

Um dos pontos críticos para a avaliação da eficácia do tratamento é a diversidade de respostas observadas entre diferentes doentes com o mesmo tipo de tumor, devido a heterogeneidade dos tumores (DOMINIETTO; TSINOREMAS; CAPOBIANCO, 2014). Até mesmo os cânceres que surgem a partir do mesmo tipo de célula podem abrigar uma gama de diferentes alterações genéticas que facilitam a sua expansão desenfreada e eventual metástase. Como resultado, o comportamento de tumores individuais - como se evoluem e, eventualmente, respondem a terapia - pode ser variado e difícil de prever (EIFERT; POWERS, 2012).

Nos últimos anos os avanços científicos tem favorecido uma melhor compreensão da biologia do câncer. Consequentemente vários alvos novos têm sido identificados, como por exemplo o receptor do fator de crescimento tirosina cinase (RTK) e a via de sinalização da serina/treonina cinase; alvos no ciclo celular; alvos relacionados a apoptose; a matriz extracelular; a angiogênese do tumor e metástase, e o tempo de vida celular (ALAPATI et al., 2012).

A maioria dos fármacos utilizados na quimioterapia antineoplásica interfere de algum modo no progresso do ciclo celular, assim, os antineoplásicos podem ser classificados conforme a sua atuação sobre o ciclo celular em fármacos ciclo-específicos, que exercem sua ação somente nas células que se encontram no ciclo celular, e fármacos ciclo-inespecíficos, quando atuam nas células independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G0 (ALMEIDA et al., 2005).

Os fármacos ciclo-específicos incluem, por exemplo, os agentes antimetabólitos que exercem seus efeitos principalmente por bloquearem bioquimicamente a síntese do DNA e, portanto, são restritos à fase S do ciclo celular. Alguns exemplos são os análogos do ácido fólico: Metotrexato (MXT); análogos das

pirimidinas: Fluorouracil (5-Fluorouracil; 5-FU); Floxuridina (5-Fluorodesoxiuridina; FUDR); Citarabina (citosina arabinosídeo, ara-C); e análogos das purinas: Mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP). Outros fármacos ciclo-específicos incluem os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) e taxanos (paclitaxel, docetaxel) que são considerados agentes antimitóticos por atuarem especificamente na fase M do ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005).

Já os fármacos ciclo-inespecíficos podem ser subclassificados, de acordo com o mecanismo de ação no DNA, já que eles podem agir de diferentes maneiras, em: fármacos que interagem diretamente com o DNA, como os agentes alquilantes, dentre eles, mostardas nitrogenadas, nitrossuréis e complexos de coordenação de platina; fármacos que formam radicais livres e destroem o DNA através da fragmentação de suas hélices, como a bleomicina; fármacos que interagem com a fenda menor do DNA, como berenil, pentamidina e análogos; fármacos que alteram as propriedades de pareamento das bases, como os agentes intercalantes proflavina, acridina, amsacrina; e fármacos que inibem a topoisomerase, como a doxorubicina (ALMEIDA et al., 2005).

O tratamento para o câncer é bastante heterogêneo devido ao grande número de vias de sinalização oncogênicas, que desempenham um papel importante no crescimento e progressão tumoral, como por exemplo: receptores tirosina cinase, que inclui os receptores de fator de crescimento (receptor do fator de crescimento endotelial vascular – VEGFR; receptor do fator de crescimento epidermal – EGFR; receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta - PDGFR, receptor do fator de crescimento de insulina tipo 1, proteína cinase ativada por mitógeno – Ras/Raf, ERK), receptor acoplado a proteína G, proteína retinoblastoma, entre outras (WEINBERG, 2014).

O primeiro alvo molecular para a terapia do câncer foi o receptor de estrógeno no câncer de mama. Muitas drogas têm sido aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do câncer de mama receptor de estrógeno positivo (ER+), incluindo tamoxifeno, fulvestrante e toremifeno (JAITAK, 2014). Estes fármacos competem pelo sítio de ligação no receptor do estradiol endógeno localizado no tumor, reprimindo desta forma os sinais de crescimento por ele promovido (LEAL; CUBERO; DEL GIGLIO, 2010).

A família do receptor tirosina cinase (TK) desempenha um importante papel na regulação do câncer (XIA et al., 1999 *apud* CEKANOVA; RATHORE, 2014). O EGFR, o PDGFR, PI3K/AKT/mTOR, e VEGFR são comumente super-expressos e são alvos moleculares importantes no tratamento do câncer (CEKANOVA; RATHORE, 2014). Os medicamentos que atuam nessas vias são chamados de inibidores de transdução de sinal e incluem mesilato de imatinibe (TK), desatinibe (TK), nilotinibe (TK), pertuzumabe (HER-2), gefitinibe (EGFR), erlotinibe (EGFR), vandetanibe (VEGFR), e sorafenibe (VEGFR) (LEITE et al., 2012).

Outras opções terapêuticas são as que modificam a função das proteínas que regulam a expressão gênica e outras funções celulares, por exemplo, o vorinostate, que é um inibidor da histona desacetilase. Existem também os fármacos que induzem apoptose da célula tumoral, como bortezomibe, que é um inibidor de proteassoma (CHEN et al., 2011), este também bloqueia os efeitos das citocinas, angiogênese e reverte a resistência aos medicamentos de células de mieloma múltiplo no microambiente celular (MEDINGERA; PASSWEG, 2014).

Outra classe de fármacos na terapêutica do câncer inclui os anticorpos monoclonais (mAb), que entregam moléculas tóxicas especificamente para células tumorais (CEKANOVA; RATHORE, 2014). Quando os anticorpos monoclonais se ligam aos seus alvos específicos podem estabilizar, diminuir, inibir a proliferação celular ou até induzir a morte (MCCARRON et al., 2005; ANDRADY et al., 2011). Rituximab, um mAb quimérico anti-CD20 IgG1, específico para o antígeno de superfície CD20, presente em neoplasias linfoides de células B como a leucemia linfóide crônica e linfomas não-Hodgkin (NHL) de células B, foi o primeiro mAb aprovado pelo FDA para o tratamento de tumores resistentes a quimioterapia convencional (MALONEY et al., 1997; ANDRADY et al., 2011; KAUMAYA; FOY, 2012; CEKANOVA; RATHORE, 2014). Depois surgiu o ibritumomab, que também é específico para o CD20 presente em linfomas não-Hodgkin de células B (MILENIC; BRADY; BRECHBIEL, 2004; CEKANOVA; RATHORE, 2014), o trastuzumab, que age contra o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e é utilizado para tratar pacientes com câncer de mama que expressam o antígeno HER2, o cetuximab e o panitumumab, que se ligam ao EGFR (STROME et al., 2007), sendo o panitumumab utilizado para o tratamento de cânceres que superexpressam EGFR, como o câncer de colorretal (RUTHANN et al., 2007; AURISICCHIO et al., 2012).

Além das classes já citadas, existem também os inibidores da angiogênese, que é um processo essencial para o desenvolvimento e disseminação de tumores sólidos e hematológicos. A maioria das terapias antiangiogênicas são baseadas na inibição da ligação do VEGF ao seu receptor usando anticorpos neutralizantes contra o ligante ou receptor, pequenas moléculas inibidoras ou terapias diretas contra a atividade da tirosina cinase dos receptores de VEGF (MEDINGERA; PASSWEG, 2014).

O primeiro fármaco antiangiogênico aprovado pelo FDA foi o bevacizumab, um anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra o VEGF, utilizado atualmente para tratamento de glioblastoma e em combinação com outros medicamentos, para os tumores metastáticos de pulmão, mama, rins e coloretal (GIULIANO; PAGÈS, 2013; GOTINK; VERHEUL, 2010). Outros inibidores angiogênicos são o sorafenib e sunitinib, que se ligam nos receptores de superfície das células endoteliais ou em outras proteínas da via de sinalização e bloqueiam suas atividades. O sorafenib é utilizado para o carcinoma hepatocelular e o sunitinib também é utilizado para câncer de fígado e tumores neuroendócrinos (GOTINK; VERHEUL, 2010).

Ainda em relação às modalidades terapêuticas usadas no tratamento do câncer, podem ser citadas as citocinas interferons (INFs) e interleucinas (ILs) (TRIOZZI; TUTHILL; BORDEN, 2011). O uso dessa abordagem terapêutica está relacionado ao fato da inflamação ser considerada uma das características do câncer e tem mostrado desempenhar um importante papel na iniciação e progressão da doença (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Citocinas são proteínas de sinalização que são produzidas por células brancas do sangue. Elas ajudam a mediar e regular respostas imunes, inflamação e hematopoiese (TRIOZZI; TUTHILL; BORDEN, 2011).

Pesquisas têm mostrado que INF-alfa pode melhorar a resposta imune de pacientes com câncer por meio da ativação de glóbulos brancos, como células *natural killer* e células dendríticas (SUTLU; ALICI, 2009; KANTOFF, 2010), além de inibir o crescimento de células cancerígenas ou promover a sua morte (JOSHI et al., 2009; TRIOZZI; TUTHILL; BORDEN, 2011). Atualmente, o IFN-alfa está aprovado para o tratamento de melanoma, sarcoma de Kaposi e diversos cânceres hematológicos (KANTOFF, 2010).

Como INFs, ILs desempenham importante papel na resposta imune do corpo e na capacidade do sistema imunológico para responder ao câncer. IL-2 é produzida

pelas células T ativadas e aumenta a proliferação de glóbulos brancos, incluindo os linfócitos T citotóxicos e células *natural killer*, levando a um aumento da resposta imune contra o câncer (LI et al., 2009). IL-2 também facilita a produção de anticorpos pelas células B, que é mais um alvo para as células cancerígenas. Aldesleucin, uma IL-2 feita em laboratório, foi aprovada para o tratamento de câncer renal metastático (McDERMOTT et al., 2010) e melanoma metastático (WEISS; SHANNON, 20003).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos, as vacinas são consideradas terapias alvo específicas, uma vez que interferem com o crescimento de células cancerosas específicas (CEKANOVA; RATHORE, 2014) e têm sido utilizadas principalmente na quimioprevenção, como por exemplo, as vacinas contra os tipos 16 e 18 do HPV (Papiloma Vírus Humano), que causam aproximadamente 70% de todos os casos de câncer cervical no mundo (SCHLOM, 2012); mas também podem ser utilizadas como adjuvante no tratamento de neoplasias, por fortalecer as defesas naturais do organismo contra o câncer (GULLEY et al., 2010). Em 2010 o FDA aprovou a primeira vacina para o tratamento do câncer, sipuleucel-T, indicada para câncer de próstata metastático. Essa vacina estimula uma resposta imune contra a fosfatase ácida prostática (PAP), um antígeno que se encontra na maioria das células de câncer da próstata (KANTOFF et al., 2010).

Diante de todos os aspectos abordados de epidemiologia e tratamento do câncer, é possível observar que, apesar do grande progresso na quimioterapia do câncer, muitos tumores ainda são de difícil remissão, tornando-se necessária a procura de novos agentes antitumorais (RIVA, 2012). Assim, é crescente o interesse na pesquisa e a busca para o desenvolvimento de produtos com atividade antitumoral, de fácil administração, alta eficácia e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

2.1.2 O controle do ciclo celular e apoptose

Existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna, mas a maior parte deles interfere na divisão celular e, assim, o conhecimento do ciclo celular ou dos seus mecanismos é importante para que haja a compreensão da etiologia do câncer, bem como dos seus possíveis tratamentos (ALMEIDA et al., 2005).

O ciclo celular é um processo coordenado pelo qual uma série de eventos conduz a célula à divisão celular e replicação por mitose. É constituído por quatro fases: G1, S, G2 e M, e a ativação de cada fase depende da boa execução da anterior (HARTWELL; WEINERT, 1989 *apud* KIM et al., 2011).

Esse processo de divisão celular inicia na fase G1, considerada uma fase pré-sintética, pois antecede a duplicação do DNA. Nessa fase, ocorre aumento do tamanho da célula, ativação de proto-oncogenes e síntese de RNA e proteínas diversas, necessárias para a fase seguinte. Durante a fase S ocorre a duplicação do DNA. A fase G2 antecede a mitose e por isso é chamada de fase pré-mitótica, nela ocorre a síntese de proteínas necessárias para a divisão celular. Finalmente, durante a fase M, ocorre a divisão do núcleo e citocinese, que é a divisão celular propriamente dita (a célula mãe se divide formando as duas células filhas, com todos os constituintes celulares). As células que temporariamente pararam de se dividir entram numa fase de repouso denominada G0, onde o DNA encontra-se superenovelado e a atividade nuclear é baixa (SCHWEITZER et al., 2005; KIM et al., 2011; FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

A origem e o desenvolvimento de neoplasias estão associados a problemas na regulação do ciclo celular e à perda de controle da mitose. Em uma célula normal, se em alguma das fases for detectada alguma anomalia, por exemplo, um dano no DNA, o ciclo é interrompido até que o defeito seja reparado e o ciclo celular possa continuar. Caso contrário, a célula é conduzida à apoptose (YE et al., 2003; ALEXANDRE et al., 2014).

Assim, existem pontos de verificação nas fases G1 e G2 do ciclo que são responsáveis pelo prosseguimento ou parada do mesmo. Ao fim dessas fases, após um momento definido como ponto de checagem, o sistema que regula a progressão do ciclo torna-se independente da sinalização extracelular, passando a ser controlado por mecanismos intracelulares que envolvem a sequencial ativação de uma família de proteínas chamadas de cinases dependentes de ciclina (CDKs), as quais tornam-se ativas mediante a formação do complexo ciclina-CDK ativo (PARDEE, 1974 *apud* HIRSCHI et al., 2010). No entanto, a ligação de proteínas inibidoras de CDKs limitam a sua atividade. A expressão elevada de inibidores CDKs resulta na parada do ciclo celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009; GOPINATHAN; RATNACARAM; KALDIS,

2011; ORTEGA; MALUMBRES; BARBACID, 2002; ALBRECHT et al., 1998; PUJOL et al., 2000; ILYIN et al., 2003; BISTEAU; CALDEZ; KALDIS, 2014).

Dentre as proteínas que rigorosamente controlam o ciclo celular, a proteína p53 exerce importante função na atividade supressora de tumor por dois mecanismos: interrupção da proliferação e indução da morte celular programada (ROOS et al., 2007; ROOS; KAINA, 2013). Assim, a p53 atua na proliferação celular, permitindo que sejam reparados danos espontâneos ou induzidos durante as fases G1/S do ciclo celular (PENG et al., 1998; BISTEAU; CALDEZ; KALDIS, 2014). Se houver falha dos mecanismos de reparo, os níveis de p53 aumentam e as células são direcionadas para a apoptose. Nos tumores, mutações no gene p53 resultam na tradução de proteínas mutantes incapazes de corrigir danos genômicos e/ou direcionar a célula a apoptose (VAGUNDA et al., 2003; FURGASON; BAHASSI, 2013).

Outra proteína importante nesse processo é a proteína retinoblastoma (Rb), que controla negativamente o ciclo celular. No estado normal, ela ocorre em uma forma hipofosforilada. No início do ciclo, a proteína Rb está ligada a um fator, o E2F, o que evita a continuação do ciclo. Conforme o ciclo avança e a célula progride rumo à transição G1/S, a proteína Rb é fosforilada por complexos ciclina/CDK, liberando o fator E2F. O E2F atua como fator de transcrição, estimulando a transcrição de genes que controlam a entrada na fase S. Assim, a proteína Rb está diretamente envolvida com a regulação da proliferação celular (EZHEVSKY et al., 1997; HENLEY; DICK, 2012; BISTEAU; CALDEZ; KALDIS, 2014).

No câncer, as células são incapazes de pausar em um ou ambos os pontos de verificação, resultando em desregulação do ciclo celular (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Muitos fármacos eficazes no tratamento do câncer ativam vias de sinalização que levam ao bloqueio ou retardo no ciclo celular, a exemplo dos antimetabólitos, como o 5-fluorouracil, e dos alcaloides da vinca como a vincristina (ALMEIDA et al., 2005).

Tem sido demonstrado que compostos naturais, bem como compostos sintéticos derivados de compostos naturais, podem ativar vias apoptóticas que são bloqueadas em células cancerosas e induzir alterações morfológicas e bioquímicas nas células que exibem características de morte celular por apoptose, como por exemplo fragmentação internucleossômica do DNA, resultando no aparecimento de uma população de células em uma fase denominada sub-G1 (HAN et al., 2014;

PARSAEE et al., 2013). O acúmulo de células nesta fase, caracterizada por células com menor conteúdo de DNA, também caracteriza a indução de apoptose (WLODKOWIC et al., 2011).

O controle da sobrevivência e a indução de morte de células cancerosas são estratégias importantes na terapia do câncer. Agentes anticancerígenos devem matar as células tumorais, com o mínimo de efeitos secundários sobre as células normais, e um dos mecanismos mais utilizados para isso é a indução seletiva de morte por apoptose (STRASSER; CORY; ADAMS, 2011; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Apoptose é considerada como morte celular programada, em ambos os tecidos (normais e danificados), altamente regulada e desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos. É essencial para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imune, formação das vilosidades intestinais, entre outros processos (BRAS et al., 2005; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Esse tipo de morte celular é reconhecido por características morfológicas marcantes e coordenadas que incluem a retração das células, formação de prolongamentos na membrana celular (“blebs” de membrana), fragmentação de membrana nuclear, condensação cromatínica e fragmentação internucleossômica do DNA (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; MEGAN; RICHARD, 2011). As alterações celulares incluem também a ativação de caspases (*cystein-dependent aspartate-specific protease*), que possuem cisteína no sítio ativo e clivam substratos com resíduos de aspartato, como as pró-caspases, tornando-as ativas, e estão envolvidas especificamente nos mecanismos moleculares dessa forma de morte celular. Sua ativação é acompanhada por subsequente proteólise de seus substratos, externalização de fosfatidilserina e várias alterações mitocondriais, tais como perda da diferença de potencial de membrana, liberação de fatores pró-apoptóticos e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ARAVINDARAM; YANG, 2010).

No final do processo, ocorre a formação dos corpos apoptóticos, que devido à sinalização decorrente da externalização da fosfatidilserina, são rapidamente reconhecidos e fagocitados por macrófagos, antes que se desintegrem (YANG et al., 2006; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Assim, não ocorre extravasamento do conteúdo celular e nem inflamação, permitindo o funcionamento normal do tecido (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A apoptose pode ser ativada pela via extrínseca ou via receptores de morte, que é promovida por receptores como CD95 (Fas ou Apo-1) ou TNF-R1 (receptor do fator de necrose tumoral). Esses receptores possuem um domínio de morte (DD) (PENNARUN et al., 2010), que é responsável pelo recrutamento de outras proteínas que contêm DD, como TRADD (Domínio de morte associado ao receptor TNF), FADD (Domínio de morte associado a Fas) e RIP (Interação proteína receptor), que podem se ligar à caspases iniciadoras (como a pró-caspase -8 ou -10), promover a trimerização do receptor e consequentemente a ativação. O complexo formado pelo receptor, proteínas que contêm DD e caspases-8 e -10 é chamado de complexo de sinalização indutor de morte (DISC) (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2008). Após a ativação desse complexo, caspases iniciadoras clivam e ativam as caspases efetoras, -3, -6 e -7, (GIANANTI; TORRIGLIA; SCOVASSI, 2011) que clivam substratos específicos, produzindo assim as alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose (LIU et al., 2006; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Outra forma de ativação da apoptose envolve a mitocôndria, chamada de via intrínseca ou mitocondrial, que depende da liberação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma. Esse processo é regulado pelos membros pró-apoptóticos (Bax e Bak) e anti-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-xl) da família de proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein-2-family*). Estes são ativados por sinais internos (danos ao DNA, oncogenes ativados ou privação de fatores de crescimento) os quais são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequentemente liberação do citocromo c e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (DUNCAN et al., 2010). Após liberação do citocromo c, este forma um complexo protéico indutor de apoptose, denominado apoptossomo, que é formado por monômeros de Apaf-1 (Fator de ativação de protease associada à apoptose 1) com moléculas de caspase 9 e citocromo c que ativam as caspases efetoras (-3, -6 e -7), responsáveis pela execução da morte celular por apoptose (ROOS; KAINA, 2013).

Muitas substâncias antineoplásicas exercem seus efeitos citotóxicos por indução de apoptose (BERNARDI et al., 2003). Nesse caso, danos no DNA produzidos pelo fármaco e reconhecidos pela célula causam parada do ciclo celular, com posterior reparo do dano, favorecendo o aparecimento de células que transportam mutações e causando resistência celular à terapia, ou indução de morte

celular. As consequências dos danos do DNA dependem do tipo de célula e da gravidade do dano (SUROVA; ZHIVOTOVSKY, 2013). Assim, a indução de apoptose é um dos marcadores mais importantes de agentes citotóxicos antitumorais (DE ARAUJO et al., 2012).

2.1.3 Angiogênese tumoral

Para que ocorra o desenvolvimento celular, seja de células saudáveis ou tumorais, o fornecimento de nutrientes e oxigênio é de fundamental importância. Sem o fornecimento adequado ocorre morte celular (FOLKMAN; SHING, 1992; YANG et al., 2014). Durante a embriogênese, o desenvolvimento da vasculatura envolve o nascimento de novas células endoteliais e sua montagem em tubos (vasculogênese), em adição ao surgimento (angiogênese) de novos vasos a partir de capilares pré-existent (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Nesse processo, as células endoteliais são as mais importantes.

Para iniciar o crescimento dos vasos sanguíneos, as células endoteliais precisam estar ativas, uma vez que o volume delas é baixo. A ativação endotelial desencadeia uma cascata de sinalização celular rigidamente regulada, incluindo a degradação da matriz extracelular, brotamento, proliferação, migração e formação do tubo. Diante disto, novos vasos são formados e o processo de angiogênese termina com a deposição de nova matriz extracelular, atração de pericitos para a estabilização do vaso e retorno do fenótipo das células endoteliais ao repouso (GRIFFIOEN, MOLEMA, 2000; POTENTE et al., 2011; GRIFFIOEN; THIJSEN, 2014). Assim, a angiogênese é essencial para o desenvolvimento de eventos fisiológicos, como crescimento, reprodução e cicatrização de feridas (GUPTA; ZHANG, 2005; VINAYAK, et al., 2014).

O processo de angiogênese é controlado por um equilíbrio de fatores promotores e inibidores angiogênicos (MOSERLE et al., 2009; RIBATTI et al., 2007; LIU et al., 2014). Quando o corpo é incapaz de controlar a angiogênese, devido a fatores pró-angiogênicos tornarem-se dominantes sobre os fatores anti-angiogênicos, doenças, tais como a degeneração macular relacionada com a idade, artrite reumatoide e psoríase, podem ocorrer (GUPTA; ZHANG, 2005; VINAYAK et al., 2014).

A formação de novos vasos sanguíneos é um passo essencial no desenvolvimento de tumores considerando que, sem o suprimento sanguíneo, o volume do tumor não excederá mais do que 1-2 mm³ (FOLKMAN; COTRAN, 1976 *apud* YANG, et al., 2014).

Os novos vasos sanguíneos "alimentam" o crescimento dos tumores com oxigênio e nutrientes, permitindo as células cancerígenas se proliferarem, invadirem tecidos próximos, se moverem por todo o corpo, e formarem novas colônias de células de câncer, que são as metástases (FOLKMAN, 2007; ELMASRI et al., 2012). Ainda, os tumores secretam uma variedade de fatores angiogênicos capazes de continuar estimulando a formação de novos vasos (SHCHORS; EVAN, 2007; ALAEDDINI et al., 2013). Assim, a angiogênese tumoral desempenha um importante papel na progressão e patogênese de tumores sólidos e hematológicos (MEDINGER; PASSWEG, 2014).

Os vasos sanguíneos do tumor apresentam várias anomalias em comparação com os vasos fisiológicas normais, incluindo muitas vezes uma proporção relativamente alta de proliferação de células endoteliais, aumento da tortuosidade, deficiência em pericitos (células que dão um suporte mecânico e fisiológico para as células endoteliais), formação de membrana basal aberrante e alta permeabilidade vascular (BABAN; SEYMOUR, 1998; BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2012).

A angiogênese é regulada por várias moléculas que são liberadas pelas células, como por exemplo, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), a bradicinina, o óxido nítrico, as prostaglandinas, as metaloproteinasas, dentre outras (MAEDA, 2001; BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2012).

Dentre os fatores pró-angiogênicos, o VEGF está envolvido em muitos dos processos necessários para a angiogênese, incluindo a migração de células endoteliais por meio de uma variedade de vias de sinalização (FOLKMAN; SHING, 1992 *apud* VINAYAK, et al., 2014), como por exemplo se ligando a receptores VEGFR-1/Flt-1 (*c-fms-like tyrosine kinase*) e VEGFR-2/KDR/Flk-1 (*kinase domain receptor*), que estão expressos na superfície de células endoteliais (MILLAUER et al., 1996; DE VRIES; JAIME, 1992; AGRAWAL et al., 2011), além de ser um componente crítico da angiogênese tumoral, amplamente expresso na maioria dos cânceres, pois estimula

a progressão do tumor, invasão e metástase (SARASWATI; AGRAWAL; ALHAIDER, 2013).

Muitas drogas anti-VEGF já são aprovadas e utilizadas em vários tipos de câncer, entretanto, estudos mostram que o crescimento tumoral e angiogênico de alguns modelos pré-clínicos não foram alterados com a interrupção dessa via, sugerindo a ocorrência de resistência (EBOS; LEE; KERBEL, 2009; BERGER; HANAHAN, 2008; HANAHAN; COUSSENS, 2012; LIU et al., 2014). Entretanto, é relatado na literatura que quando a quimioterapia citotóxica é associada a anticorpos anti-VEGF a resistência é diminuída. Isso pode ocorrer devido ao extravasamento dos capilares, com permeabilidade aumentada, dentro do tumor, causando aumento da pressão intersticial tumoral. Esse aumento da pressão inibe o fluxo sanguíneo, inibindo a oxigenação e impedindo a liberação do fármaco dentro do tumor. Os anticorpos dirigidos contra os fatores angiogênicos revertem as alterações de oxigenação e fluxo sanguíneo. Ao normalizar a pressão intersticial e ao melhorar o fluxo sanguíneo, os agentes antiangiogênicos aumentam a capacidade dos quimioterápicos alcançarem o tumor. Ainda, o aumento dos níveis de oxigênio pode sensibilizar as células cancerígenas a radioterapia e a várias drogas quimioterápicas, além de aumentar a resposta imune do tumor (JAIN, 2009).

Citocinas e quimiocinas também estão sendo relacionadas como reguladores da angiogênese (STRIETER et al., 2005; AGRAWAL et al., 2011). Estudos mostraram que o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) tem aumentado a expressão de VEGF e seus receptores, e ainda que a interleucina-8 (IL-8) e fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) (GIRAUDO et al., 1998; AGRAWAL et al., 2011) atuam na promoção do câncer por uma variedade de mecanismos, incluindo a indução de angiogênese (SIDDIQUI et al., 2006; AGRAWAL et al., 2011).

Outra via recém descrita na literatura, é a *Delta-like 4-Notch* (Dll4-Notch), que desempenha um papel relevante na angiogênese e é um dos novos alvos terapêuticos mais promissores no tratamento do câncer. Dll4-Notch foi previamente conhecida por desempenhar importante papel na sinalização da angiogênese fisiológica, como por exemplo, na cicatrização de feridas e na gravidez. Contudo, muitos trabalhos têm mostrado que a via *Notch* está envolvida também na angiogênese patológica, como a angiogênese tumoral (LIU et al., 2014), estando associada com muitos cânceres humanos (REAL; FERRANDO, 2009; QIAO; WONG, 2009; SANDY; MAILLARD,

2009). Além disso, essa via pode contribuir para a aquisição do fenótipo de transição epitélio-mesenquimal (EMT), que estão estritamente associados com resistência à drogas (WANG et al., 2009).

Modelos experimentais revelaram o envolvimento de *Notch* na resistência às drogas anticâncer, indicando que pode ser uma nova abordagem terapêutica para o tratamento do câncer, superando a resistência de células tumorais aos medicamentos convencionais (LIU et al., 2014).

Assim, como a angiogênese é iniciada pela proliferação endotelial celular, seguida de migração, invasão e então, a formação do vaso (FAN et al., 2006; YANG et al., 2014), a supressão em qualquer etapa do processo angiogênico irá inibir a formação de novos vasos sanguíneos (TOURNAIRE et al., 2004; YANG et al., 2014). Até hoje, aproximadamente 300 inibidores angiogênicos têm sido relatados e mais de 80 fármacos derivados a partir deles estão em diferentes etapas de ensaios clínicos (MADHUSUDAN; HARRIS, 2002; VINAYAK, et al., 2014).

Uma das principais causas de mortalidade por câncer é a propagação metastática de células tumorais por meio da vasculatura sanguínea (ZHANG et al., 2010). Dessa forma, terapias antiangiogênicas estão sendo utilizadas como uma forma de diminuir o suprimento nutricional e energético para as células tumorais, levando à morte celular (ØSTERGAARD et al., 2013).

2.1.4 Toxicidade de antineoplásicos

A estratégia para a descoberta de fármacos contra o câncer sofreu uma notável transformação, devido, em parte, aos avanços na elucidação da base molecular da transformação maligna. Essa explosão de conhecimentos permitiu um grande progresso na terapia oncológica, demonstrado pela ampla diversidade farmacológica surgida nos últimos anos.

Porém, apesar do sucesso terapêutico, poucas categorias de fármacos apresentam um índice terapêutico mais estreito e maior potencial de causar efeitos prejudiciais do que os agentes antineoplásicos. Ou seja, em muitas situações, as etapas passíveis de bloqueio da reprodução celular são comuns às células malignas e células normais do hospedeiro, resultando em baixo índice terapêutico, elevado

dano a tecidos funcionais, o que resulta em expressiva toxicidade (CHABNER; ROBERTS, 2005; RIVA et al., 2012).

Nem todos os pacientes conseguem tolerar fármacos, e nem todos os esquemas farmacológicos são apropriados para determinado paciente. As funções renal e hepática, a reserva da medula óssea, o estado físico geral e os problemas clínicos concomitantes devem ser todos considerados na realização do plano terapêutico. Além disso, outras considerações importantes são a história natural do tumor, bem como, a tolerância física e emocional do paciente quanto aos efeitos colaterais do tratamento instituído. Sendo assim, um dos maiores desafios da terapia antineoplásica consiste em ajustar os esquemas de fármacos para obter um resultado terapêutico, porém com baixa toxicidade, tornando imperativo o reconhecimento precoce dos efeitos tóxicos da terapia, a alteração das doses ou interrupção do medicamento agressor para aliviar os sintomas e reduzir os riscos (MARTINS; ROSA, 2004; SCHEIN et al., 2006).

Os antineoplásicos clássicos são, na sua maioria, agentes antiproliferativos, desse modo, os tumores mais sensíveis são aqueles que apresentam uma alta taxa de células em fase de proliferação. Como consequência, os tecidos normais que proliferam rapidamente (medula óssea, folículos pilosos e epitélio intestinal) mostram-se altamente suscetíveis a lesão por agentes citotóxicos. Isso provoca os efeitos indesejáveis clássicos da quimioterapia (BRANDÃO et al., 2010).

Pacientes portadores de doenças neoplásicas apresentam alta frequência de anormalidades das células sanguíneas. Uma diminuição nos níveis de hemoglobina e hemácias é uma complicação comumente observada em pacientes oncológicos. Frequentemente pode não existir sinais de infiltração neoplásica da medula óssea, perdas sanguíneas, hemólise, distúrbios endócrinos, renais ou hepáticos, nem de deficiências nutritivas que justifiquem a anemia. Quando nenhum desses fatores estiver presente, a anemia pode dever-se, exclusivamente, à presença do próprio tumor (MAGALHÃES et al., 2010; Da SILVA et al., 2014).

Faz-se necessário enfatizar que a supressão da hematopoiese é uma das consequências mais comuns da quimioterapia antineoplásica e um dos mais incapacitantes efeitos colaterais no tratamento do câncer, além de limitar, com frequência, o uso da quimioterapia em esquemas e nas doses prescritas (MAGALHÃES et al., 2010; Da SILVA et al., 2014). Os principais efeitos tóxicos do

bussulfano (alquilsulfonato) estão relacionados às suas propriedades mielossupressoras, e a ocorrência de trombocitopenia prolongada pode constituir um risco (TIRGAR; SHAH; THUMBER, 2011). Há relatos, entre população pediátrica, de surgimento de mielotoxicidade, principalmente plaquetopenia e neutropenia, durante o uso da hidroxiureia, porém, na sua maioria reversível após suspensão da droga (HOPPE et al., 2000).

Outros efeitos tóxicos também são reconhecidos com a utilização de agentes antineoplásicos, a exemplo da cardiotoxicidade, efeito peculiar observado com a Doxorubicina (PRADOS et al., 2012). Metotrexato, docetaxel e cisplatina podem desencadear algum tipo de toxicidade renal (BEZERRA et al., 2008; KOROLKOVAS, 2010). Efeito nefrotóxico notável também é reconhecido com o uso da ciclofosfamida, ocasionado pela liberação do metabólito nefrotóxico e urotóxico acroleína (GERMANAS; PANDYA, 2002). O 5-Fluoruracil (5-FU), por sua vez, apresenta como efeitos colaterais mielossupressão, alterações gastrointestinais, alterações hematológicas e também está associado a reações cardíacas (ESPÍRITO SANTO, 2006; ROQUE; FORONES, 2006; STEGER; HAUTMANN; KOLBL, 2012). Mecloretamina, carmustina, mitoxantrona, paclitaxel, estreptozocina, vimblastina são alguns exemplos de fármacos com propriedades vesicantes acentuadas, causam lesão das veias com uso repetido e, se houver extravasamento, provocam ulceração (SAUERLAND et al., 2006; MASLOVSKY, 2007).

As toxicidades que afetam o coração, os pulmões ou os rins podem ser irreversíveis se forem reconhecidas em uma fase tardia de sua evolução, produzindo lesão orgânica permanente ou morte. Felizmente, essas toxicidades podem ser minimizadas com o reconhecimento precoce e adesão aos protocolos padronizados e diretrizes para uso de fármacos (GOODMAN; GILMAN, 2012).

Náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, perda de peso, mucosite, estomatite, desnudação intestinal, alopecia, fotossensibilidade, hemorragias nos pulmões e intestinos, bem como hepatotoxicidade são outros exemplos de efeitos tóxicos compartilhados por muitos agentes antineoplásicos (MARTINS; ROSA, 2004; LOHR, 2008; MCGOWAN, 2008; EL-SAYYAD et al., 2009; BRANDÃO et al., 2010).

Os efeitos sobre o trato gastrointestinal são clássicos e, portanto, observados no tratamento com a maioria dos antineoplásicos. Os mesmos podem estar relacionados ao catabolismo da doença ou ao seu tratamento, sendo motivados seja

por mecanismo direto sobre os neurotransmissores determinantes do Sistema Nervoso Central ou mecanismo indireto influenciando os receptores do trato gastrointestinal com a liberação de neuromoduladores que agiriam complementarmente em nível central (SCHEIN et al., 2006).

Além das lesões supracitadas, os antineoplásicos podem apresentar outros efeitos tóxicos de destacada importância, como: neurotoxicidade (alteração do estado mental, coma, neuropatia periférica, convulsões generalizadas, ataxia cerebelar) observada com a ifosfamida (PRACCHIA; LINARDI; BUCCHERI, 2007), bem como, toxicidade reprodutiva (amenorreia, azoospermia irreversível, aborto) e leucemogênese, observados com o uso de agentes alquilantes (GERMANAS; PANDYA, 2002). O fato de alguns agentes citotóxicos produzirem dano tanto em células malignas como em células normais, pode também produzir mutações genéticas em células normais que podem transformar-se em clones malignos, o que leva a mutagênese e possivelmente, carcinogênese (BRANDÃO et al., 2010; GERMANAS; PANDYA, 2002; MONTALEMBERT; DAVIS, 2001).

Na tentativa de minimizar os efeitos colaterais clássicos dos antineoplásicos, novas modalidades terapêuticas que visam atingir especificamente o tumor e com toxicidade reduzida estão em constante estudo. Muitos dos fármacos recentemente aprovados ou que se encontram em estágios finais de avaliação foram planejados para bloquear as mutações fundamentais que causam cânceres específicos: receptores aberrantes de fatores de crescimento, desregulação de vias de sinalização intracelular, defeito no reparo do DNA e na apoptose e angiogênese tumoral. Esses agentes, atuando em nível de membrana celular ou no ambiente intracelular, induzem morte celular maligna com pouco efeito deletério residual, beneficiando, sem dúvida, os pacientes acometidos pelas diversas neoplasias malignas (GIULIANO; PAGES, 2013; ANDRADY; SHARMA; CHESTER, 2011).

Desse modo, novas drogas se traduzem em avanços terapêuticos que levam a ganho em qualidade de vida e aumento dos índices de cura. Todavia, o conhecimento prévio da toxicocinética e toxicodinâmica, somado a realização de avaliações toxicológicas periódicas serão sempre importantes, na tentativa de prover informações sobre doses seguras a serem utilizadas em humanos.

2.2 Estudo da farmacologia/toxicologia de fármacos com potencial anticâncer

Devido à grande problemática que o câncer representa para a sociedade e o fato de muitos tumores ainda apresentarem respostas modestas aos protocolos clínicos, limitando a indicação e a eficácia do tratamento tanto para os tumores primários quanto para as metástases, torna-se imperativo a necessidade de encontrar, desenvolver, e introduzir no arsenal médico, modalidades terapêuticas mais eficientes que possam oferecer ao número crescente de pacientes com doenças malignas disseminadas, oportunidades reais de controle das células neoplásicas (COSTA-LOTUFO, 2010).

O desenvolvimento de modelos experimentais tem contribuído para o estudo e a compreensão do mecanismo de ação de muitos compostos antineoplásicos (LONGATO et al., 2011). Para a descoberta de quimioterápicos, tanto os testes *in vitro* quanto os *in vivo* são amplamente utilizados. Os modelos animais são bem conhecidos, e são frequentemente utilizados para a investigação do câncer. Modelos em roedores tem favorecido a capacidade de estudar as funções dos genes e proteínas *in vivo* e um melhor entendimento de suas vias e mecanismos moleculares (CHEON; ORSULIC, 2011). Além disso, os animais têm uma incidência de câncer relativamente alta, com comportamento biológico, resposta a terapia e resposta aos agentes citotóxicos semelhantes aos humanos (CEKANOVA; RATHORE, 2014).

O carcinoma ascítico de Ehrlich foi descrito primeiramente por Paul Ehrlich em 1906, como um adenocarcinoma mamário de camundongo. É um tumor maligno, transplantável e pouco diferenciado. Até hoje é mantido por transplantes sucessivos no tecido subcutâneo ou no peritônio de camundongos, desenvolvendo-se na forma sólida e ascítica, respectivamente (SIGIURA, 1965; VIEIRA et al., 2010). Quando inoculado para crescer na forma ascítica, desenvolve uma carcinomatose peritoneal, com grande acúmulo de fluido no abdome (ascite). Quando as células tumorais crescem na forma sólida, apresentam-se como uma massa palpável e de consistência firme, com extensas áreas de necrose e hemorragia (PORTUGAL, 2012).

Na forma ascítica, tem sido utilizado como um modelo murino para investigar a tumorigênese e efeitos antitumorais de várias substâncias químicas naturais e sintéticas, mostrando resultados precisos e reprodutíveis (CHEN; WATKINS, 1970; SEGURA et al., 2000; BHATTACHARY; HALDAR, 2011).

Este tipo de tumor é descrito morfologicamente pela presença de células pleomórficas, com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo/citoplasma maior que a das células normais (NASCIMENTO et al., 2006; SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006). É um carcinoma de rápido crescimento, com um comportamento muito agressivo e é capaz de crescer em quase todas as espécies de camundongos (BHATTACHARYA; HALDAR, 2011).

A agressividade deste carcinoma não depende do grau de hemorragia e não é alterada pela espécie do camundongo onde são inoculadas as células, porém, cada espécie reage de maneira específica, podendo apresentar maior ou menor tempo de sobrevivência. Em camundongos Suíços, estudos demonstraram que o tumor de Ehrlich, quando inoculado na cavidade peritoneal, desencadeia uma resposta inflamatória local e ascite, gerando aumento da permeabilidade vascular que resulta na formação de edema, migração celular e formação progressiva do líquido ascítico (KODAMA; SENDO; KOBAYASHI, 1974; FECCHIO et al., 1990; NASCIMENTO et al., 2006).

Após a inoculação intraperitoneal dessas células, o volume da ascite e o número de células aumentam progressiva e rapidamente (VIEIRA et al., 2010). O exame macroscópico da forma ascítica, depois de aproximadamente sete dias de implante na cavidade peritoneal, revela a presença de grande quantidade de fluido discretamente viscoso e de aspecto leitoso. Após o décimo dia de inoculação intraperitoneal do tumor, cerca de 90% das células peritoneais são células tumorais (GUERRA, 1983; FECCHIO et al., 1990; SANTOS-BERGAMI; MARIO; BARBUTO, 2004). A formação do fluido ascítico é essencial para o crescimento do tumor, afinal seus constituintes servem de fonte nutricional para as células tumorais (FECCHIO et al., 1990; NASCIMENTO et al., 2006).

A ascite provavelmente é desencadeada pela indução de inflamação, com o aumento da permeabilidade vascular do peritônio (FASTAIA; DUMONT, 1976 *apud* VIEIRA, et al., 2010). Assim, camundongos com esse tumor morrem após um curto período de tempo devido a diversos fatores como a pressão mecânica exercida pelo fluido ascítico e a hemorragia intraperitoneal. Além disso, a progressão do tumor de Ehrlich é caracterizada por profundas alterações na resposta imune, levando a um quadro de declínio da imunocompetência do organismo (MELO et al., 2004; MARCHETTI, 2008), entretanto, o influxo de células polimorfonucleares para a

cavidade é tardio, só ocorrendo a partir do sexto dia após a inoculação (FECCHIO et al., 1990; PALERMO-NETO et al., 2008).

Uma das vantagens da utilização deste modelo é a possibilidade da padronização do número de células a serem inoculadas em animais, tanto para o crescimento na forma ascítica como sólida, pois as células presentes no fluido ascítico podem ser facilmente quantificadas (MATSUZAKI, 2004; VIEIRA et al., 2010).

Devido a toxicidade causada pelas drogas antineoplásicas, é de grande importância a realização de estudos experimentais pré-clínicos *in vivo*, para a obtenção de informações sobre toxicidade (TALMADGE; FIDLER, 2010).

Há séculos, os animais são utilizados como modelos de estudo de toxicidade, com a finalidade de obter informações sobre possíveis danos causados ao homem (GAD, 2007).

As substâncias teste são administradas pela via que se espera ser usada em humanos e são realizados de forma a se aumentar gradativamente o tempo de utilização da substância, iniciando-se pelos estudos de toxicidade aguda, que fornece informações úteis para continuar com estudos de maior duração de tempo (GAD, 2007; ANVISA, 2013).

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. Segundo o Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, estudos para a determinação de DL₅₀ (dose que induz morte 50% dos animais experimentais) não são necessários (ANVISA, 2013). Podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) “Guidelines for Testing of Chemicals”, como por exemplo o Guia de nº 423 (OECD, 2001).

Os estudos de toxicidade aguda baseados na OECD são realizados administrando-se uma dose da substância teste a um grupo de animais, e dependendo da quantidade de animais vivos nesse grupo, o estudo é repetido com outros animais recebendo doses maiores ou menores da mesma substância. 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. Quando não existe qualquer informação sobre a substância a ser testada, por razões de proteção dos animais, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg.

Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL_{50} , apesar de fornecer uma estimativa do seu valor, entretanto, permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” – GHS, um documento com definição dos perigos dos produtos químicos, que contém instruções que fornecem um mecanismo para atender à exigência básica de qualquer sistema de comunicação de perigos, que é decidir se o produto químico fabricado ou fornecido é perigoso e preparar um rótulo e/ou uma FISPQ (Fichas de Informação de Segurança para Produtos Químicos) apropriada.

A taxa de sobrevivência dos animais e os sinais gerais de toxicidade são observados durante um período de tempo pré-determinado, por meio de um protocolo abrangente de observações e análise dos animais após a administração da substância. Isso ajuda a evidenciar o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las, permitindo dessa forma, conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste, os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte, além de ajudar a estabelecer categorias de risco e a escolha de doses a serem utilizadas em estudos clínicos (LARINI, 1999; ALMEIDA, 2006; ANVISA, 2013).

Grande parte dos trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais e sintéticos, baseados em regulamentações nacionais e internacionais, utilizam parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade (OLIVEIRA et al., 2010, MAGALHÃES et al., 2010). Dessa forma, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, como as transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); função renal, como ureia e creatinina, bem como nos parâmetros hematológicos como o eritrograma, leucograma e plaquetograma. Ainda, exames histopatológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função do órgão em nível celular.

Em âmbito mundial, tem-se encontrado forte relação entre a exposição a agentes genotóxicos e o desenvolvimento de diversos efeitos nocivos à saúde. Os

agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente por possuírem a habilidade de alterar a replicação do DNA e transmissão genética. Desta forma, as medidas de toxicidade genética incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (ABDA et al., 2015).

Uma das metodologias amplamente utilizadas como biomarcador de efeito da genotoxicidade é o teste do micronúcleo, um ensaio *in vivo*, que utiliza medula óssea ou sangue periférico para quantificar os danos no DNA (FACTORI et al., 2014). A investigação de dano no DNA é de grande importância, pois danos em células germinativas podem levar a mutações genéticas que são passadas para as próximas gerações (HINTZSCHE; RIESE; STOPPER, 2012; HAGIO et al., 2014).

O micronúcleo é um corpúsculo cromatínico adicional e separado do núcleo de uma célula durante a divisão celular constituído por cromossomos inteiros (aneugênese) ou seus fragmentos (clastogênese) que se atrasam em relação aos demais (ALBAS et al., 2014). O teste baseia-se na observação de células que sofrem alterações na distribuição de suas cromátides ou quebra de cromátides. Durante a anáfase, momento em que há a segregação dos cromossomos, os fragmentos provenientes das quebras e de cromossomos inteiros, e que não estão ligados pelo fuso, não acompanham a migração para os pólos da célula. Após a telófase, tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (FENECH, 2000; FERIGOLO; SAGRILLO, 2013).

Assim, o teste de micronúcleo é uma das ferramentas amplamente utilizadas para a pesquisa e investigação da segurança de inúmeras substâncias, classificando-as ou não como genotóxicas e potencialmente carcinogênicas (FENECH et al., 1999; ALBAS et al., 2014).

2.3 Produtos naturais e o tratamento do câncer

Produtos naturais são compostos químicos ou substâncias produzidas naturalmente por organismos vivos (OUYANG et al., 2013). Os medicamentos à base de produtos naturais, principalmente plantas, são utilizados pela população desde os primórdios até os dias atuais, mesmo com a existência das drogas modernas (PAL; SHUKLA, 2003; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Com o desenvolvimento da tecnologia moderna, o estudo destes produtos tem contribuído muito para o desenvolvimento de diversos fármacos com importantes aplicações terapêuticas, correntemente utilizadas na medicina moderna (CALIXTO et al., 2005; CARNEVALLIA; DE ARAÚJO, 2013), aumentado assim o interesse desses produtos pelas indústrias farmacêuticas (SAKLANI; KUTTY, 2008; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Como resultado, os produtos naturais, particularmente aqueles derivados de plantas, são amplamente utilizados na quimioterapia (KINGHORN et al., 2009).

Segundo o FDA, 60% dos medicamentos disponibilizados no mercado nas últimas décadas foram isolados a partir de fontes naturais, especialmente plantas (NAVEEN et al., 2012). De 121 medicamentos prescritos para o tratamento do câncer, 90 são derivados de plantas medicinais (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Ainda, relato da literatura mostra que entre os 65 novos medicamentos registrados para o tratamento do câncer, durante 1981-2002, 48 foram obtidos a partir de produtos naturais, incluindo os alcaloides da vinca, extraídos de *Catharrantus roseus* (vinblastina, vincristina) (ISHIKAWA et al., 2009); os taxanos, isolados da casca do teixo (*Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt), paclitaxel (JORDAN; WILSON, 2004); a camptotecina, um alcaloide extraído e isolado de uma árvore ornamental chinesa, *Camptotheca acuminata* Decne e seus derivados topotecano e irinotecano; as podofilotoxinas, extraídas da raiz de uma planta indiana *Podophyllum peltatum* e seus derivados etoposídeo e teniposídeo (CRAGG; NEWMAN, 2004); as antraciclinas isoladas a partir de culturas de *Sreptomyces peucetius* (doxorubicina e daunorubicina) (MUKHERJEE et al., 2001; WANG et al., 2012); a salvicina, uma naftoquinona de estrutura diterpenoide constituinte da planta chinesa *Salvia prionitis* (MENG; ZHANG; DING, 2001).

Além desses, um total de 13 fármacos derivados de produtos naturais foram aprovados para utilização clínica entre 2005 e 2007 (HARVEY, 2008; COSTA-LOTUFO et al., 2010). Economicamente, estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (COSTA-LOTUFO et al., 2010; CRAGG; NEWMAN, 2013).

Além disso, muitos compostos presentes na dieta alimentar, incluindo flavonoides, terpenoides, alcaloides, compostos fenólicos, lecitinas e vitaminas antioxidantes podem ser utilizadas na prevenção ou tratamento do câncer, por ajudar

na criação de um ambiente desfavorável para o crescimento de células cancerígenas, estimular o sistema imune, exercer função antioxidante, induzir parada do ciclo celular e promover apoptose (YANG et al., 2006; WHEAT; CURRIE, 2008; QI et al., 2010; GIBELLINI et al., 2011).

2.4 A piperina e seus análogos

Dentre os produtos naturais estudados em relação à atividade antitumoral encontra-se a piperina (amida piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(E)-4(E)-pentadienóico), um alcaloide amida, isolado originalmente de frutos da pimenta preta (*Piper nigrum* Linn) e pimenta longa (*Piper longum* Linn) (GREENSHIELDS et al., 2014; MADHAVI et al., 2009; MEGHWAL; GOSWAMI, 2013).

Piper nigrum L. e *Piper longum* L., são espécies perenes, do tipo trepadeira, arbustífera, pertencentes à família Piperaceae (FANI, 1992; GARCIA et al., 2000; PISSINATE, 2006; CARNEVALLIA; DE ARAÚJO, 2013), originária das regiões tropicais e subtropicais da Índia (PISSINATE, 2006; ZAVERI et al., 2010; CARNEVALLIA; DE ARAÚJO, 2013).

Piper nigrum L. é uma planta rica em retinol (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), e em minerais como cálcio e ferro. Além disso, investigações fitoquímicas realizadas nas últimas décadas têm revelado que esta planta possui uma variedade de metabólitos que se distribuem em diferentes classes de compostos: amidas/alcaloides, propenilfenalinas, lignanas, neolignanas, terpenos, flavonas, cumarinas, pironas, flavonoides, fenilpropanoides, os quais têm apresentado importantes ações biológicas, especialmente anti-inflamatória e antioxidante, atuando na prevenção de doenças crônicas, em especial, as doenças cardiovasculares e o câncer (DIGNANI, 2009; CARNEVALLIA; DE ARAÚJO, 2013).

Os constituintes químicos majoritários de *Piper longum* L. são alcaloides, amidas, lignanas e ésteres (SHANKARACHARYA et al., 1997; MADHUSUDAN; VANDANA, 2001; ZAVERI et al., 2010). Estudos mostraram diversas atividades biológicas para esta espécie, como atividade antifúngica (LEE et al., 2001; ZAVERI et al., 2010), antimicrobiana (KHAN; SIDDIQUI, 2007; ZAVERI et al., 2010), antiasmática (KULSHRESTA et al., 1971 *apud* ZAVERI et al., 2010) anti-inflamatória (SHARMA; SINGH, 1980 *apud* ZAVERI et al., 2010) anticancerígena (MIN et al., 2004; PATHAK;

KHANDELWAL, 2006; ZAVERI et al., 2010) efeitos no sistema cardiovascular (IWASHITA et al., 2007; ZAVERI et al., 2010), relaxamento da tensão muscular (SINGH; MENTHAL, 1997), e atividade ansiolítica (SINGH, 1992).

A piperina exerce efeito terapêutico, podendo promover ação imunoestimulante, como no caso de doenças ou situações que levam a imunossupressão, como na quimioterapia e radioterapia associadas ao tratamento de câncer (CARDOSO et al., 2005; CARNEVALLIA; DE ARAÚJO, 2013).

Várias atividades farmacológicas já foram descritas para a piperina, dentre elas, atividade antioxidante (BOMTEMPO, 2007), antidiabética (ARCARO et al., 2014), anti-inflamatória, antipirética, analgésica (YING et al., 2013), antidepressiva (WANG et al., 2014), antimicrobiana (CHITHRA et al., 2013), antinociceptiva (BANG et al., 2009; TASLEEM et al., 2014), bem como já foi descrito seu efeito no controle da obesidade (BRAHMANAIDU et al., 2014).

Dentre as atividades farmacológicas relatadas para a piperina está a atividade antitumoral em diferentes linhagens de células tumorais *in vitro* (FOFARIA et al., 2014; GREENSHIELDS et al., 2014; YAFFE et al., 2014), incluindo indução de apoptose na linhagem celular humana A549 de câncer de pulmão (LIN et al., 2014), bem como em modelos experimentais *in vivo*, frente linhagem de carcinoma de mama murino 4T1 (LAI et al., 2012) e sarcoma 180 (BEZERRA et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que a piperina age em três linhagens de células de câncer de próstata humano (LNCaP, DU145 e PC-3) por induzir parada do ciclo celular e autofagia (OUYANG et al., 2013).

Entretanto, apesar de apresentar significativa atividade *in vivo*, a piperina também apresenta significativa toxicidade, que pode ser demonstrada pela DL₅₀ em torno de 43 mg/kg (i.p.) para camundongos machos e 60 mg/kg (i.p.) para fêmeas. A administração da piperina em camundongos induziu excitação, hiperatividade, respiração forçada, além de convulsão, que evoluiu para morte em aproximadamente 14 minutos após a administração (PIYACHATURAWAT et al., 1983).

Muitos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de descobrir novos compostos com atividade antitumoral. Nesse cenário, a natureza continua sendo uma importante fonte de substâncias com atividade farmacológica, que serve também como protótipo para a semi-síntese ou síntese total de novas moléculas com aplicações medicinais, com a finalidade de aumentar a atividade farmacológica e

reduzir a toxicidade, como também melhorar parâmetros farmacocinéticos (CRAGG; NEWMAN, 2013; CARNEVALLIA; DE ARAÚJO, 2013).

Já é descrito na literatura que produtos sintéticos ou semi-sintéticos, derivados de plantas ou de compostos de plantas, como por exemplo etoposídeo e teniposídeo, que são derivados semi-sintéticos de compostos da Epipodofilotoxina, um isômero da Podofilotoxina, que é extraída da raiz da *Podophyllum peltatum*, são utilizados na prática clínica para o tratamento de diversos cânceres, como câncer de pulmão, ovário, bexiga, linfoma (SHOEB, 2006; NOBILI et al., 2009; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Nesse sentido, foram sintetizados diferentes análogos da piperina, dentre estes o 2-oxo-2-(4-etilamina)-piperinoato de etila (HE-03) (Figura 1), para o qual não existem relatos na literatura de síntese, nem de atividade farmacológica ou toxicológica, o que despertou o interesse para investigação de seu possível efeito antitumoral, bem como de seu perfil de toxicidade.

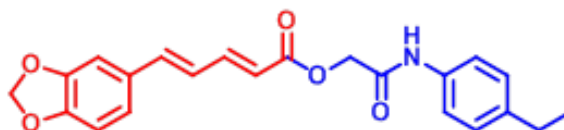


Figura 1. Estrutura química do 2-oxo-2-(4-etilamina)-piperinoato de etila (HE-03)

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e atividade antitumoral do derivado da piperina 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila (HE-03).

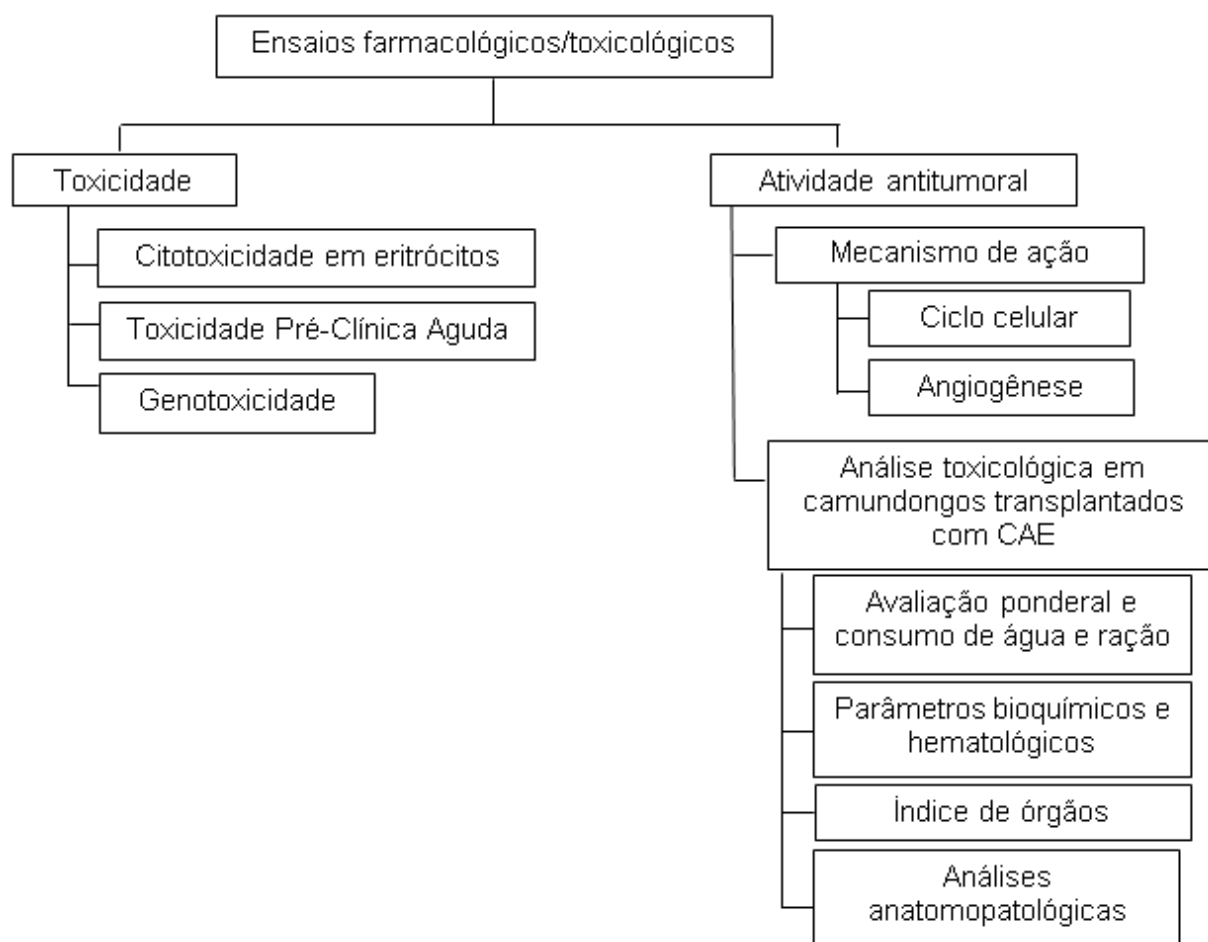
3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de HE-03 em eritrócitos de camundongos;
- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda de HE-03 em camundongos por via intraperitoneal;
- Avaliar a atividade antitumoral de HE-03 em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE);
- Analisar as alterações no perfil do ciclo celular induzidas por HE-03 em modelo de CAE;
- Investigar o efeito antiangiogênico de HE-03 em modelo de CAE;
- Avaliar o perfil de toxicidade de HE-03 após tratamento antitumoral em camundongos transplantados com tumor de Ehrlich;
- Avaliar a genotoxicidade de HE-03 em sangue periférico de camundongos.

Material e Métodos

Os estudos toxicológicos e farmacológicos do HE-03 foram realizados de acordo com o fluxograma abaixo.

Fluxograma 1 - Representação esquemática dos métodos utilizados para a avaliação da toxicidade e atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*.



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 localizados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), todos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Síntese do 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila

O composto estudado, o 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila (HE-03), foi obtido por técnicas específicas e 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).

HE-03 foi obtido a partir da piperina em três etapas. A primeira etapa consistiu no isolamento da piperina a partir da pimenta do reino (*Piper nigrum*) por meio de extração etanólica em aparelho de Soxhlet. O sistema foi mantido em refluxo por aproximadamente 2 horas. O extrato etanólico seco foi hidrolisado em meio básico de uma solução alcoólica de KOH 20% durante 20 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado várias vezes com etanol anidro fornecendo assim o sal do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(E),4(E)-pentadienóico (ácido piperínico).

Na segunda etapa foram preparados os compostos 2-cloro-N-arilacetamida substituídos, obtidos a partir da reação da amina aromática para-substituída (R= H, NO₂ e CH₂CH₃), Et₃N e cloreto de 2-cloroacetila em diclorometano, sob agitação magnética a 0 °C. O solvente foi removido à pressão reduzida, o resíduo foi lavado com água gelada e o precipitado foi filtrado. O produto foi purificado por cristalização com etanol/água, obtendo 90% de rendimento.

Na terceira e última etapa, 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-se assim o 2-oxo-2-(4-etilamina)-piperinoato de etila, com 61% de rendimento. A estrutura química do composto sintetizado foi confirmada por meio de técnicas de espectroscopia de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C e apresentou ponto de fusão na faixa de 166-168 °C

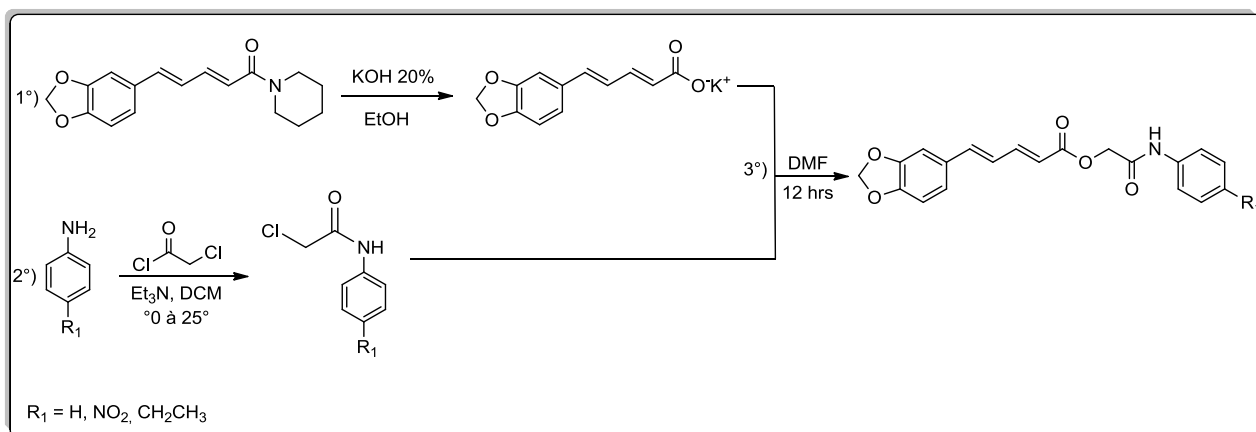


Figura 2. Reação de obtenção dos derivados da piperina.

4.2.2 Linhagem de células tumorais

Para avaliação da atividade antitumoral foi usada uma linhagem de adenocarcinoma murino (Carcinoma Ascítico de Ehrlich), gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA/UNICAMP) e mantida na cavidade peritoneal de camundongos Swiss no Biotério Prof. Thomas George, por meio de repique semanal.

4.2.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) pesando entre 30 e 35 g, com faixa etária próxima 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 °C), 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 colocados 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 N° 0901/14.

4.3 Métodos

4.3.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos

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 tiopental sódico (2 mg/animal – i.p.), coletado do plexo orbital. A agulha foi heparinizada (heparina sódica - Parinex®) 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 ressuspensos em PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise.

HE-03 foi solubilizado em DMSO (5%) e preparado em PBS, no dobro das concentrações desejadas (até 1250 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 (Sigma- Aldrich®) 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/poço de solução de Triton X-100 (0,1%) e a placa foi cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada

espectrofotometricamente a 415 nm e serviu como prova inversa para determinação da concentração que produz 50% de hemólise (CH_{50}) de HE-03.

4.3.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

Os ensaios de toxicidade pré-clínica aguda em camundongos foram realizados de acordo com o “Guideline for testing of chemicals” nº 423 da OECD (OECD, 2001).

Camundongos, três fêmeas por grupo, foram submetidos a doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg do HE-03 por via intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle (n=3) foi administrado apenas o veículo (12% Tween 80), de acordo com o protocolo descrito no guia nº 423 da OECD (ANEXO A).

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 de HE-03 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) do Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB (ANEXO B).

4.3.3 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE)

Células de CAE com cinco a sete dias de crescimento foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via intraperitoneal (0,5 mL - 2×10^6 células/mL) nos animais experimentais (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, HE-03 foi solubilizado em Tween 80 (12% em salina) e administrado diariamente por via intraperitoneal (i.p.) a grupos de seis camundongos (fêmeas), nas doses de 6,25; 12,5 e 25 mg/kg, por nove dias. O grupo controle foi tratado com uma solução de Tween 80 a 12% em salina e um quinto grupo de animais foi tratado com 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich®), 25 mg/kg, como droga padrão.

4.3.3.1 Massa tumoral, volume do tumor, viabilidade e total celular

Para a avaliação do efeito antitumoral do HE-03, um dia após a última administração do tratamento descrito no item 4.3.3, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, 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 expresso em gramas (g). O total celular ($\times 10^7$ células) foi obtido como o produto do volume do tumor, expresso em mL, pela viabilidade celular, expressa como a quantidade de células $\times 10^6/\text{mL}$.

4.3.3.2 Análise do ciclo celular

Para a análise do ciclo celular, os animais foram tratados com as doses de 6,25 e 12,5 mg/kg, conforme descrito no item 4.3.3, e as células coletadas da cavidade peritoneal foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v) a fim de se obter uma concentração final de 1×10^6 células/mL. Em seguida, após centrifugação das suspensões celulares 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) e Triton X-100; 0,1% (p/v)] (Sigma-Aldrich® – T-8787, EUA), 50 $\mu\text{g/mL}$ de Iodeto de Propídeo (PI) e água ultrapura (Milli-Q, volume final = 50 mL). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos com o software Diva e tratados no programa WinMDI versão 2.9 (PEC et al., 2003).

4.3.3.3 Investigação do efeito antiangiogênico

Para a investigação do efeito antiangiogênico os animais foram tratados conforme descrito no item 4.3.3. No dia seguinte após a administração da última dose, os animais foram eutanasiados, e, após a coleta das células tumorais, o peritônio foi cortado e o revestimento interior da cavidade peritoneal dos animais de todos os grupos foi examinado e fotografado para investigação 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).

4.3.3.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com CAE e submetidos ao tratamento com HE-03

4.3.3.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com HE-03, os animais foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração.

4.3.3.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

No dia seguinte após a administração da última dose, após jejum de quatro horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg– i.p.), e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada, para análises bioquímicas e hematológicas.

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 Cobas Mira Plus® (Roche

Diagnostic System) e o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente. As extensões sanguíneas foram coradas com coloração panótica e analisadas em microscópio óptico, para realização da contagem diferencial de leucócitos.

4.3.3.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Para o cálculo dos seus índices, os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) foram extirpados, pesados e examinados macroscopicamente para investigação de mudanças de coloração, hemorragias ou outras alterações. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

4.3.3.4.4 Análises histopatológicas

Após a pesagem, os órgãos (fígado e rins) dos animais tratados com a maior dose (25 mg/kg), foram seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e após 24 horas foram resseccionados para processamento histopatológico: 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 histopatológicas foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Karina Karla de Paula Medeiros do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

4.3.4 Avaliação da genotoxicidade

Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico, grupos de seis camundongos Swiss fêmeas foram tratados por via intraperitoneal com a dose de 2000 mg/kg de HE-03. Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg – i.p.) e

um grupo controle negativo (solução salina e Tween 80 à 12%) foram incluídos. Após 48 horas, os animais foram submetidos a uma pequena incisão na cauda para obtenção de uma amostra de sangue para confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov®) para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados (OECD, 1997).

4.4 Análise estatística

Para o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos, foram realizados três experimentos em triplicata. Os percentuais de hemólise correspondentes a cada concentração testada foram calculados em relação ao controle.

Os resultados obtidos nos estudos *in vivo* foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e analisados empregando-se o teste *t-Student* não pareado, para análise de duas populações distintas, e teste de análise de variância (ANOVA) *one-way*, para a comparação de mais de duas amostras, seguido do teste de Tukey (para variáveis paramétricas). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico foi utilizado test *t-Student* não paramétrico (teste de Mann-Whitney), onde os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos

No ensaio de avaliação da citotoxicidade em eritrócitos camundongos, observou-se que o HE-03 induziu pequeno percentual de hemólise na maior concentração testada (1250 µg/mL), apresentando portanto, CH₅₀ maior que 1000 µg/mL.

5.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda pode-se observar, nos primeiros 30 minutos, que o tratamento com HE-03 induziu alguns efeitos como contorções abdominais, abdução das patas do trem posterior e força para agarrar diminuída, nas duas doses testadas. Na dose de 300 mg/kg, foi observado ainda efeitos do tipo escalar. E na maior dose (2000 mg/kg) também foram observados efeitos depressores do SNC como resposta ao toque diminuído. Após 30 minutos não foi observado nenhum efeito em ambas as doses.

Observou-se ainda que o tratamento com as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg de HE-03 não provocou morte nos animais experimentais, como mostrado na Tabela 1.

Portanto, tomando como base as instruções do Guia n. 423 da OECD, a DL₅₀ (dose letal média) foi estimada em torno de 5000 mg/kg e a amostra é considerada inclassificável ou classificada na categoria 5 da “Globally Harmonized Classification System” (GHS) (ANEXO A).

Tabela 1 - Efeitos da administração i.p. de doses únicas de HE-03 em camundongos.

Grupo		M/T	Efeitos comportamentais
Controle		0/3	Nenhum
HE-03 (300 mg/kg)	Experimento 1	0/3	Força para agarrar diminuída, contorções abdominais, escalar
	Experimento 2	0/3	Contorções abdominais, abdução das patas do trem posterior
HE-03 (2000 mg/kg)	Experimento 1	0/3	Contorções abdominais, resposta ao toque diminuído, abdução das patas do trem posterior, força para agarrar diminuída
	Experimento 2	0/3	Contorções abdominais, resposta ao toque diminuído, força para agarrar diminuída

M/T – número de animais mortos/número de animais tratados

5.3 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich

5.3.1 Massa tumoral, volume do tumor, viabilidade e total celular

Após tratamento de nove dias com HE-03 em animais transplantados com tumor ascítico de Ehrlich foi observada significativa redução na massa tumoral dos animais tratados com as doses de 12,5 e 25 mg/kg ($4,4 \pm 1,3$ g e $3,5 \pm 0,8$ g, respectivamente; $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($13,5 \pm 0,8$ g). Nessas mesmas doses, observou-se também, diminuição do volume tumoral ($3,5 \pm 1,5$ mL e $1,1 \pm 0,3$ mL, respectivamente; $p < 0,05$), em comparação ao grupo controle ($10,3 \pm 1,0$ mL). HE-03, na dose de 6,25 mg/kg, não foi capaz de alterar os parâmetros massa e volume do tumor (Figura 3).

Os camundongos tratados com as doses de 6,25; 12,5 e 25 mg/kg apresentaram diminuição significativa na viabilidade celular (6,25 mg/kg: $90,5 \pm 6,8 \times 10^6$ células/mL, $p < 0,05$; 12,5 mg/kg: $8,4 \pm 1,9 \times 10^6$ células/mL, $p < 0,05$; 25 mg/kg: $6,6 \pm 2,5 \times 10^6$ células/mL, $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle ($123,5 \pm$

$12,9 \times 10^6$ células/mL), bem como redução no total celular (6,25 mg/kg: $68,4 \pm 8,1 \times 10^7$ células, $p < 0,05$; 12,5 mg/kg: $3,9 \pm 1,8 \times 10^7$ células, $p < 0,05$; 25 mg/kg: $0,8 \pm 0,2 \times 10^7$ células, $p < 0,05$; controle: $150,0 \pm 25,8 \times 10^7$ células).

Os animais tratados com 5-FU apresentaram significativa redução em todos os parâmetros avaliados (massa tumoral: $1,8 \pm 0,2$ g; volume tumoral: $0,1 \pm 0,03$ mL; viabilidade celular: $0,3 \pm 0,1 \times 10^6$ células/mL; total celular: $0,02 \pm 0,01 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) (Figura 3).

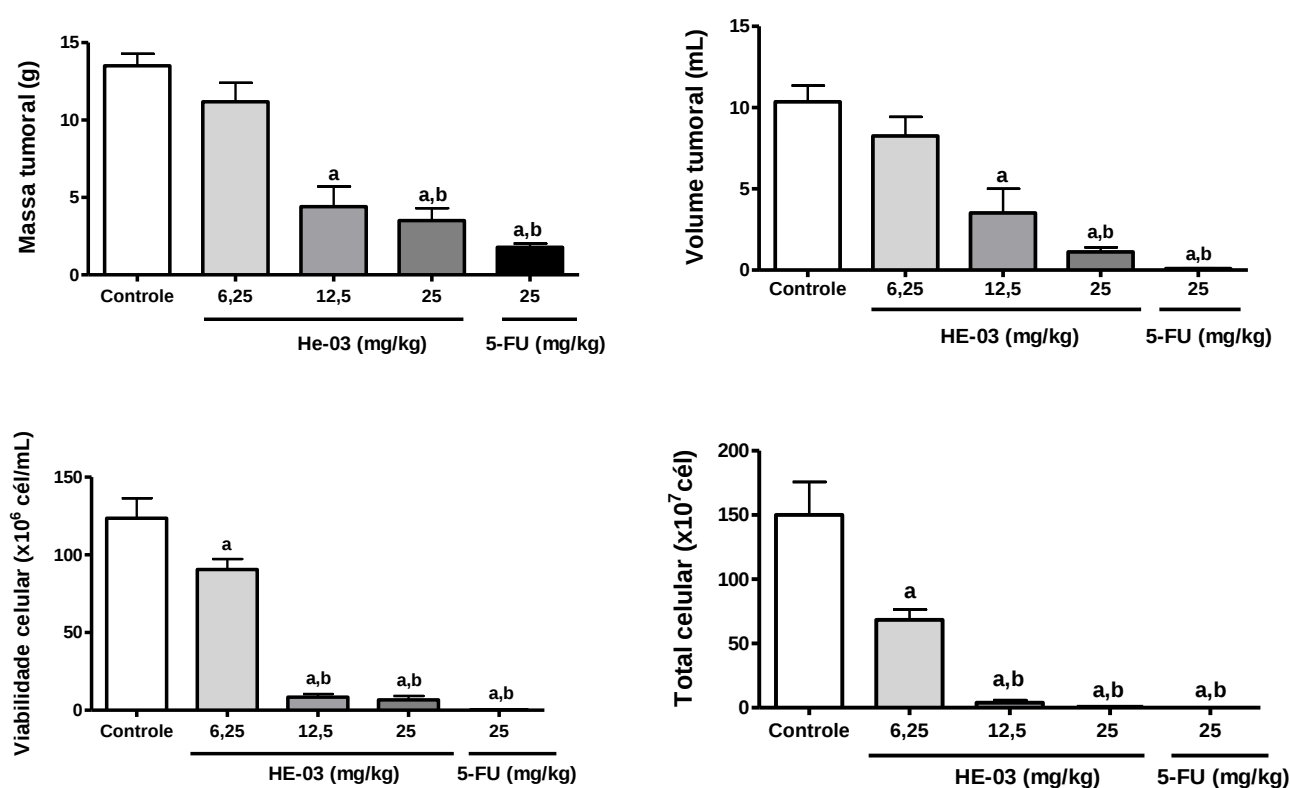


Figura 3 - Efeito do tratamento com HE-03 e 5-FU em camundongos transplantados com CAE. **A:** massa tumoral. **B:** volume tumoral. **C:** viabilidade celular. **D:** total celular. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo HE-03 (6,25 mg/kg).

5.3.2 Análise do ciclo celular

O tratamento de nove dias com HE-03 induziu alterações significativas na distribuição das células de CAE nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 4).

Após o tratamento com a dose de 6,25 mg/kg de HE-03 houve uma diminuição na percentagem de células na fase S (26,0%), quando comparado ao grupo controle (31,9%). Já para o tratamento com a dose de 12,5 mg/kg de HE-03, foi possível observar um aumento significativo no conteúdo de DNA sub-diploide (DNA fragmentado), com 12% de células na fase sub-G1, e uma consequente diminuição nas fases G0/G1 (31,0%) e S (24,4%), quando comparado ao grupo controle (1,9%; 47,7 % e 31,9 %, respectivamente).

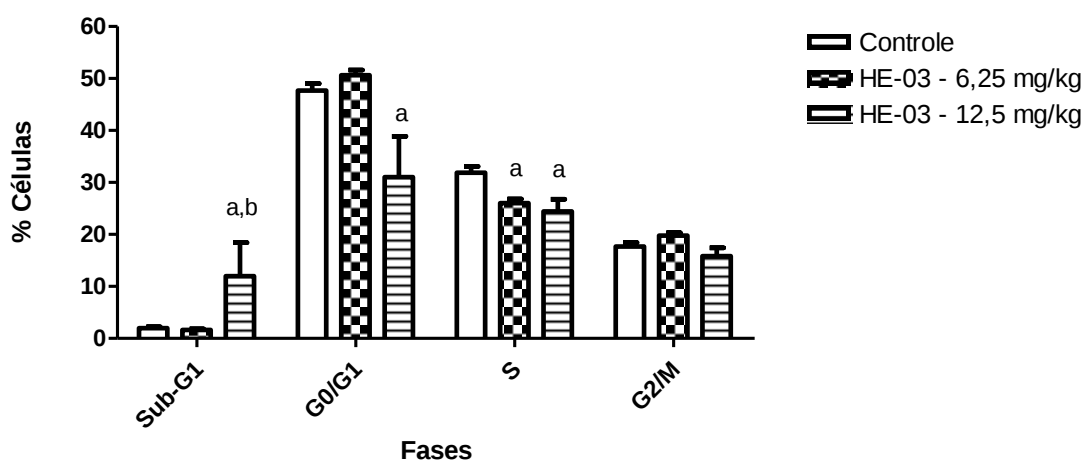
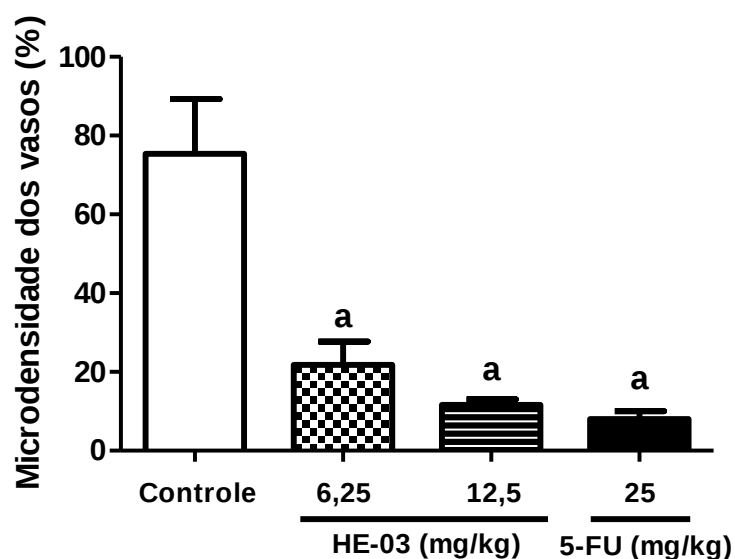


Figura 4 – Percentagem de células de CAE nas diferentes fases do ciclo celular após os tratamentos com HE-03. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo HE-03 (6,25 mg/kg).

5.3.3 Investigação do efeito antiangiogênico

A microdensidade vascular peritumoral foi quantificada no grupo controle e nos grupos submetidos ao tratamento com HE-03 nas doses de 6,25 mg/kg e 12,5 mg/kg. Uma redução na microdensidade dos vasos foi observada nos grupos tratados com HE-03 nas doses de 6,25 mg/kg e 12,5 mg/kg ($21,8 \pm 5,9\%$; $p < 0,05$ e $11,5 \pm 1,5\%$; $p < 0,05$, respectivamente). Também foi observada diferença no grupo tratado com a droga padrão ($8,0 \pm 2,1\%$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($75,3 \pm 13,9\%$) (Figura 5).



B

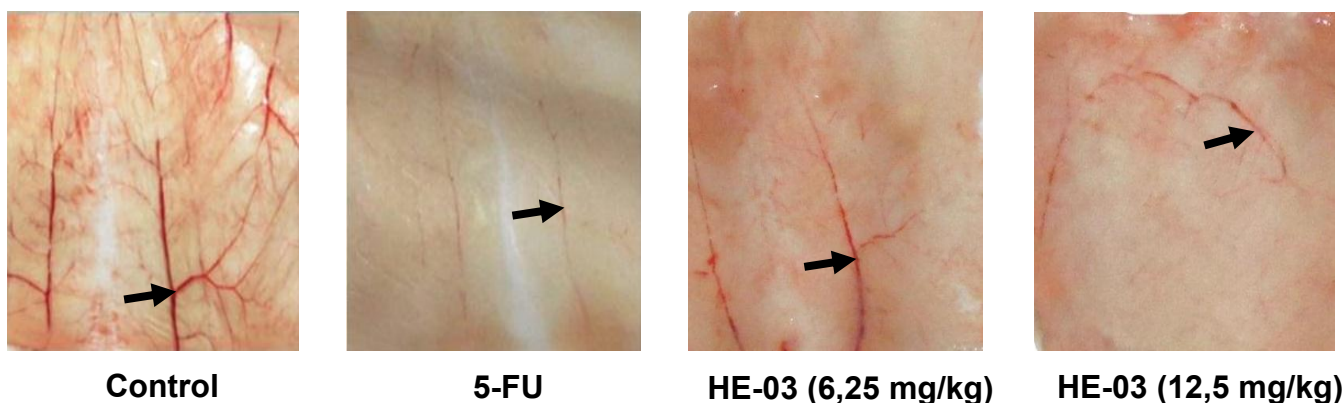


Figura 5 - Efeito do tratamento com HE-03 e 5-FU na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com CAE. **A:** Microdensidade dos vasos. Determinado pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada. **B:** Imagem representativa da membrana peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.3.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com CAE e submetidos ao tratamento com HE-03

5.3.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de 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-03, bem como a evolução ponderal dos animais.

Tabela 2 – Consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos com HE-03.

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	44,7 ± 1,3	30,3 ± 2,5	31,9 ± 0,5	30,0 ± 0,8
5-FU	25	38,7 ± 1,6	27,3 ± 2,0	31,7 ± 1,0	26,0 ± 0,9 ^a
HE-03	6,25	38,3 ± 1,4	28,9 ± 1,1	31,7 ± 0,6	31,3 ± 0,8 ^b
HE-03	12,5	41,2 ± 2,3	27,1 ± 0,6	32,1 ± 1,1	30,5 ± 0,9 ^b
HE-03	25	41,2 ± 1,6	29,9 ± 1,5	32,4 ± 1,1	31,5 ± 0,9 ^b

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais, analisados por ANOVA seguido Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas alterações significativas no consumo de água e de ração por parte dos animais tratados com as doses de 6,25; 12,5 e 25 mg/kg de HE-03, bem como dos animais tratados com 5-FU, quando comparados ao grupo controle.

Em relação ao peso corporal, ao serem avaliados os animais após a retirada/drenagem do volume de tumor ascítico residual, foi verificada uma diminuição significativa desse parâmetro nos animais tratados com o 5-FU (26,0 ± 0,9 g; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (30,0 ± 0,8 g; $p < 0,05$).

5.3.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A análise toxicológica dos efeitos de HE-03 incluiu também a avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Observou-se um aumento significativo na atividade da enzima AST nos grupos tratados com as doses de 6,25 mg/kg (234,2 ± 5,3 U/L; $p < 0,05$), 12,5 mg/kg (235,0 ± 4,7 U/L; $p < 0,05$) e 25 mg/kg (252,6 ± 7,0 U/L; $p < 0,05$) de HE-03, em comparação ao controle (165,0 ± 11,6 U/L) (Tabela 3).

Em relação à função renal, foi observado um aumento significativo na concentração sérica de ureia apenas no grupo tratado com a dose 6,25 mg/kg de HE-

03 ($56,9 \pm 2,0$ mg/dL; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($30,9 \pm 5,7$ mg/dL) (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos com HE-03.

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
*Parâmetros normais	-	70 - 400	25 – 100	15 - 40	0,2 – 0,6
Controle	-	$165,0 \pm 11,6$	$30,1 \pm 5,3$	$30,9 \pm 5,7$	$0,29 \pm 0,03$
5- FU	25	$152,8 \pm 12,1$	$38,4 \pm 5,0$	$33,1 \pm 4,1$	$0,27 \pm 0,01$
HE-03	6,25	$234,2 \pm 5,3^{a,b}$	$23,4 \pm 5,3$	$56,9 \pm 2,0^{a,b}$	$0,27 \pm 0,02$
HE-03	12,5	$235,0 \pm 4,7^{a,b}$	$29,4 \pm 6,9$	$28,7 \pm 5,0$	$0,24 \pm 0,02$
HE-03	25	$252,6 \pm 7,0^{a,b}$	$25,2 \pm 7,0$	$32,3 \pm 2,1$	$0,26 \pm 0,02$

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.

*Parâmetros normais (Fonte: GAD, 2007).

No que diz respeito à avaliação hematológica não foram observadas alterações significantes na contagem total de hemácias, na concentração de hemoglobina e nos valores do hematócrito dos grupos tratados com HE-03 quando comparados ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos com HE-03.

Grupos	Dose (mg/kg)	Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
*Parâmetros normais	-	5,7 – 9,0	14,5 – 17,5	45 – 57
Controle	-	$8,3 \pm 0,1$	$13,6 \pm 0,8$	$43,1 \pm 0,8$
5- FU	25	$7,5 \pm 0,4$	$12,1 \pm 0,8$	$41,1 \pm 2,2$
HE-03	6,25	$8,2 \pm 0,1$	$12,7 \pm 0,3$	$45,2 \pm 0,9$
HE-03	12,5	$7,3 \pm 0,6$	$11,5 \pm 0,8$	$40,1 \pm 2,5$
HE-03	25	$7,2 \pm 0,3$	$11,7 \pm 0,4$	$37,6 \pm 1,1$

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. *Parâmetros normais (Fonte: GAD, 2007).

Em relação aos parâmetros hematimétricos, também não foram observadas alterações no Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM) das hemácias nos grupos tratados com HE-03 ou com a droga padrão (5-FU) quando comparados ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos com HE-03 (continuação).

Grupos	Dose (mg/kg)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
*Parâmetros normais	-	45–55	13–16	29–34
Controle	-	52,8 ± 0,7	15,3 ± 0,4	29,6 ± 0,3
5- FU	25	53,1 ± 1,2	16,1 ± 0,8	30,3 ± 0,9
HE-03	6,25	54,9 ± 0,5	15,4 ± 0,2	28,1 ± 0,2
HE-03	12,5	52,7 ± 1,3	15,9 ± 0,5	30,1 ± 0,6
HE-03	25	53,2 ± 0,9	17,0 ± 0,4	31,6 ± 0,5

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. *Parâmetros normais (Fonte: GAD, 2007).

Em relação à contagem total de leucócitos, foi observado uma diminuição significativa no grupo tratado com a dose de 25 mg/kg de HE-03 ($4,6 \pm 0,6 \times 10^3/\text{mm}^3$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($12,3 \pm 1,4 \times 10^3/\text{mm}^3$) (Tabela 4).

Na contagem diferencial de leucócitos, no grupo tratado com a dose de 25 mg/kg de HE-03, observou-se um aumento significativo na percentagem de linfócitos ($90,8 \pm 1,1\%$; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($56,4 \pm 5,8\%$) e uma diminuição significativa na percentagem de neutrófilos ($2,3 \pm 0,7\%$; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($43,3 \pm 4,8\%$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos com HE-03 (continuação).

Grupos	Dose (mg/kg)	Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
			Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
*Parâmetros normais	-	2,0 – 11,5	60 – 90	10 – 40	0 – 6	0 - 5
Controle	-	12,3 ± 1,4	56,4 ± 5,8	43,3 ± 4,8	4,6 ± 0,6	0,9 ± 0,3
5-FU	25	13,5 ± 2,2	57,2 ± 3,9	37,7 ± 3,8	4,8 ± 0,9	0,3 ± 0,2
HE-03	6,25	7,9 ± 1,4	46,4 ± 7,4	46,8 ± 7,8	5,7 ± 1,1	0,7 ± 0,2
HE-03	12,5	9,9 ± 0,6	67,6 ± 5,5	27,0 ± 5,1	5,0 ± 0,7	0,4 ± 0,2
HE-03	25	4,6 ± 0,6 ^{a,b}	90,8 ± 1,1 ^{a,b}	2,3 ± 0,7 ^{a,b}	2,2 ± 0,6	0,0 ± 0,0

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU. *Parâmetros normais (Fonte: GAD, 2007).

5.3.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Para avaliar possíveis efeitos tóxicos de HE-03 sobre os órgãos dos animais, coração, fígado, rins, baço e timo foram extirpados e pesados, após a eutanásia dos animais, e analisados macroscopicamente. Não foram observados hemorragias ou pontos de necrose em nenhum dos órgãos analisados.

Na Tabela 5 estão expressos os valores referentes aos índices dos órgãos dos animais após nove dias de tratamento com HE-03.

Nenhuma alteração significativa no índice de coração ou de fígado foi observada entre os grupos de animais tratados com HE-03 nas doses avaliadas quando comparados ao grupo controle.

No entanto, houve um aumento significativo no índice de baço nos animais do grupo tratado com 25 mg/kg de HE-03 ($9,3 \pm 0,5$ mg/g; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($5,2 \pm 0,7$ mg/g). Observou-se também um aumento significativo no índice de rins nos animais tratados com a maior dose de HE-03 ($13,0 \pm 0,3$ mg/g; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($10,2 \pm 0,7$ mg/g). Ainda, uma diminuição significativa no índice do timo foi observada nos animais do grupo tratado com a droga padrão (5-FU - 25 mg/kg) ($1,3 \pm 0,3$ mg/g; $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle ($3,9 \pm 0,3$ mg/g) (Tabela 5).

Tabela 5 – Índices dos órgãos de camundongos transplantados com CAE submetidos aos diferentes tratamentos com HE-03.

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)
Controle	-	3,3 ± 0,3	3,9 ± 0,3	5,2 ± 0,7	62,2 ± 2,8	10,2 ± 0,7
5-FU	25	4,1 ± 0,1	1,3 ± 0,3 ^a	3,7 ± 0,5	56,7 ± 2,0	10,9 ± 0,5
HE-03	6,25	3,4 ± 0,2	3,9 ± 0,4 ^b	4,4 ± 0,8	62,1 ± 1,7	9,8 ± 0,3
HE-03	12,5	3,9 ± 0,2	3,4 ± 0,5 ^b	7,3 ± 0,9 ^b	70,8 ± 3,8 ^b	11,9 ± 0,4
HE-03	25	4,5 ± 0,4	3,6 ± 0,7 ^b	9,3 ± 0,5 ^{a,b}	69,3 ± 3,9 ^b	13,0 ± 0,3 ^{a,b}

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a*p* < 0,05 comparado ao grupo controle. ^b*p* < 0,05 comparado ao grupo 5-FU.

5.3.4.4 Análises histopatológicas

Para uma avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos tóxicos do HE-03 sobre os órgãos dos animais tratados, uma avaliação histopatológica, especificamente de fígado e rins, foi realizada.

Os rins removidos dos grupos controle e tratados com 5-FU e HE-03, ambos na dose de 25 mg/kg, apresentaram-se dentro dos limites de normalidade histológica com arquitetura glomerular e tubular preservada. Os lobos estavam bem definidos (pirâmide medular e tecido cortical recobrimdo a sua base e lados) e lóbulos preservados. Os glomérulos (corpúsculo de Malpighi) também estavam preservados, inclusive numericamente, envolvidos por fina cápsula de Bowman, e o tufo capilar sustentado por delicado mesângio (Figura 6A), fazendo relação com a arteríola renal e túbulos contorcidos proximais (Figura 6B).

Em relação a dose de 25 mg/kg de HE-03, no menor aumento (100x) pode-se observar as distintas zonas renais pela nítida diferença de coloração e distribuição de estruturas tubulares. O córtex, mais interno, fortemente eosinofílico pela abundância de túbulos contorcidos proximais e corpúsculos renais, e a medula, mais externa, de coloração menos intensa, devido ao grande número de túbulos coletores com lúmens mais amplos (Figura 6C).

Na observação em maior aumento (400x) dos rins dos animais tratados com 25 mg/kg de HE-03 pode-se observar com mais detalhes todas as estruturas presentes nestas duas zonas renais. Os glomérulos apresentavam-se bem distribuídos e

uniformes, envolvidos por fina cápsula de Bowman e tufo capilar sustentado por delicado mesângio, descartando características de glomerulonefrite. Os túbulos contorcidos proximais abundantes, próximos aos glomérulos, apresentavam epitélio cúbico preservado e citoplasma fortemente eosinofílico que diferenciava-se dos túbulos contorcidos distais, com menor eosinofilia citoplasmática e lúmen mais amplo (Figura 6D). Os túbulos coletores com lúmen bem visíveis apresentavam-se com epitélio simples cúbico a colunar baixo distribuídos entre os segmentos delgado e espesso da alça de Henle e diversos capilares sanguíneos (Figura 6E). Não foram observadas áreas de necrose tubular, apenas a presença em algumas áreas de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário perivascular (Figura 6F).

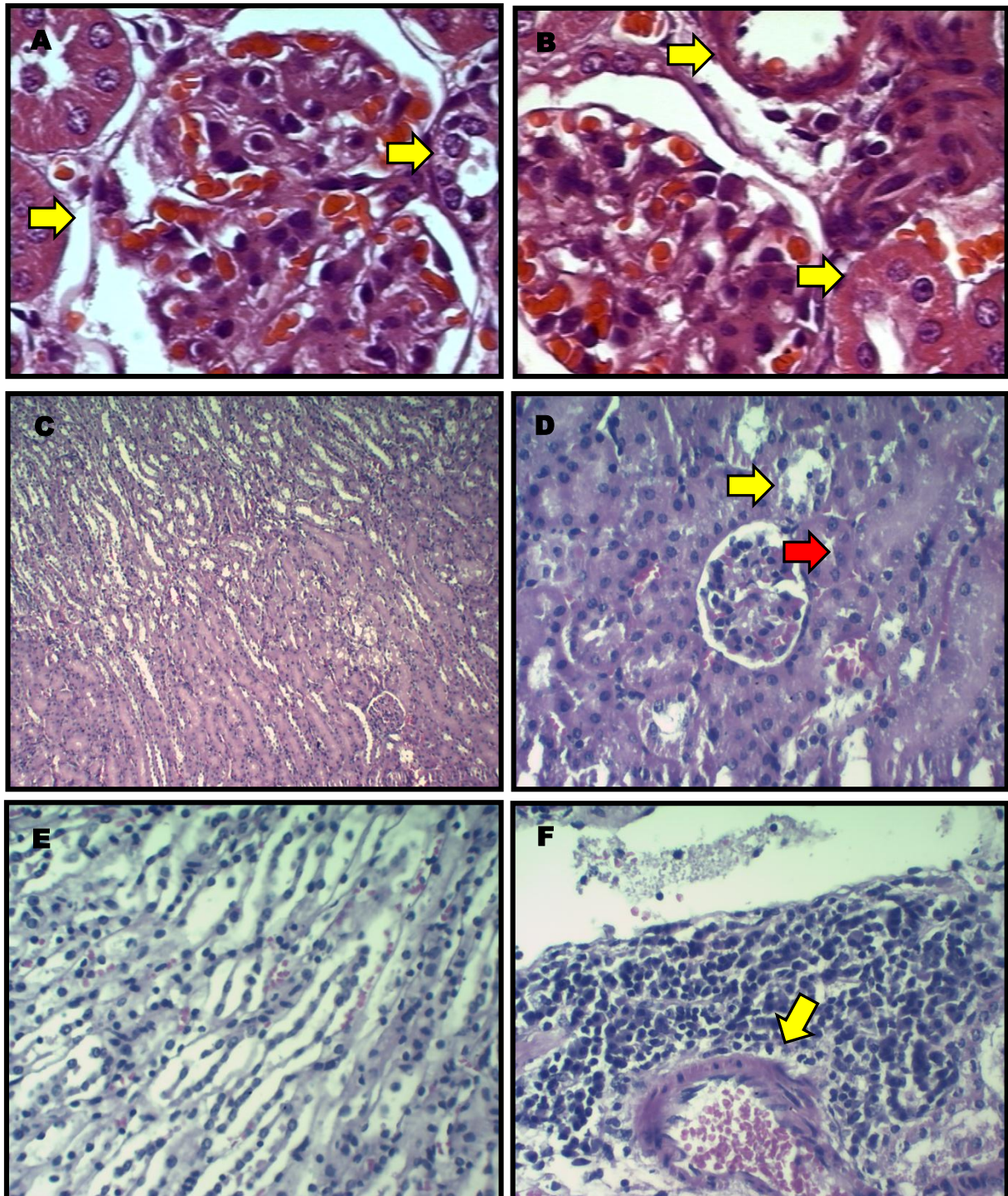


Figura 6 – Figuras representativas da histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle - Glomérulo preservado envolvido por cápsula de Bowman com tufo capilar sustentado por delicado mesângio; **(B)** 5-FU (25 mg/kg) - Glomérulo preservado envolvido por cápsula de Bowman com tufo capilar sustentado por delicado mesângio e sua relação com arteríola renal e túbulos contorcidos proximais. **(C)** HE-03 (25 mg/kg) – Zona cortical e medular (HE 100x); **(D)** HE-03 (25 mg/kg) - Glomérulo de Malpighi, túbulo contorcido proximal (seta vermelha) e distal (seta amarela) (HE 400x); **(E)** HE-03 (25 mg/kg) - Região medular - túbulos coletores (HE 400x); **(F)** HE-03 (25 mg/kg) - Infiltrado inflamatório perivascular (HE 400x).

Ao exame microscópico, os fígados dos animais do grupo controle apresentaram arquitetura do tipo lobular, com veias hepáticas terminais de paredes finas, presença de inflamação sinusoidal leve e ausência de fibrose parenquimatosa (Figura 7A). No seio do lóbulo, identificou-se discreto infiltrado inflamatório linfoistiocítico coincidente com focos de necrose, em raros sítios (Figura 7B). De modo geral, os hepatócitos estavam normais, isomorfos e os referidos focos de necrose parenquimatosa foram vistos, nas zonas III (Figura 7C). Havia portite linfoistiocitária discreta, de natureza reacional, na ausência de atividade periportal e perisseptal.

As mesmas características foram observadas para os animais tratados com o 5-FU. Neste grupo, em adição, observou-se uma atividade periportal e perisseptal caracterizando discreta necrose em “saca-bocado” (pequenas áreas de hepatocitólise e inflamação, em poucos espaços portais) (Figura 7D), atividade parenquimatosa com necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfocitocitários, em numerosos sítios (Figura 7E) e fenômenos hepatocelulares de poliploidia (Figura 7F).

A histologia dos fígados dos animais tratados com HE-03 (25 mg/kg) mostrou alterações histológicas reacionais, focais, mínimas. Os hepatócitos isomorfos encontravam-se organizados em cordões, direcionados para as veias hepáticas centrolobulares, e entre estes cordões, os sinusóides hepáticos, de paredes delgadas com a presença frequente da célula de Kupffer com morfologia preservada. Os espaços portais encontravam-se regularmente distribuídos, cuja matriz apresentava a tríade portal de Glisson composta de um ramo da artéria hepática, um ramo da veia porta e um ducto biliar (Figura 8A). Em maior aumento pode-se observar a morfologia poligonal típica dos hepatócitos e núcleo evidente. Em nenhuma área foi observada necrose hepatocelular.

Foi observado, em algumas áreas, discreto infiltrado inflamatório linfocitocitário perivascular e subcapsular (Figura 8B e 8C) e a presença de degeneração gordurosa caracterizado pela presença de micro e macrogotículas lipídicas no citoplasma de alguns hepatócitos, tornando seu citoplasma esbranquiçado (Figura 8D e 8E).

Nas lâminas coradas com tricrômico de masson pode-se confirmar a ausência de fibrose no espaço subcapsular e na tríade portal que apresentava discreta coloração azulada devido à presença de fibras colágenas característico da cápsula e da parede vascular (Figura 8F).

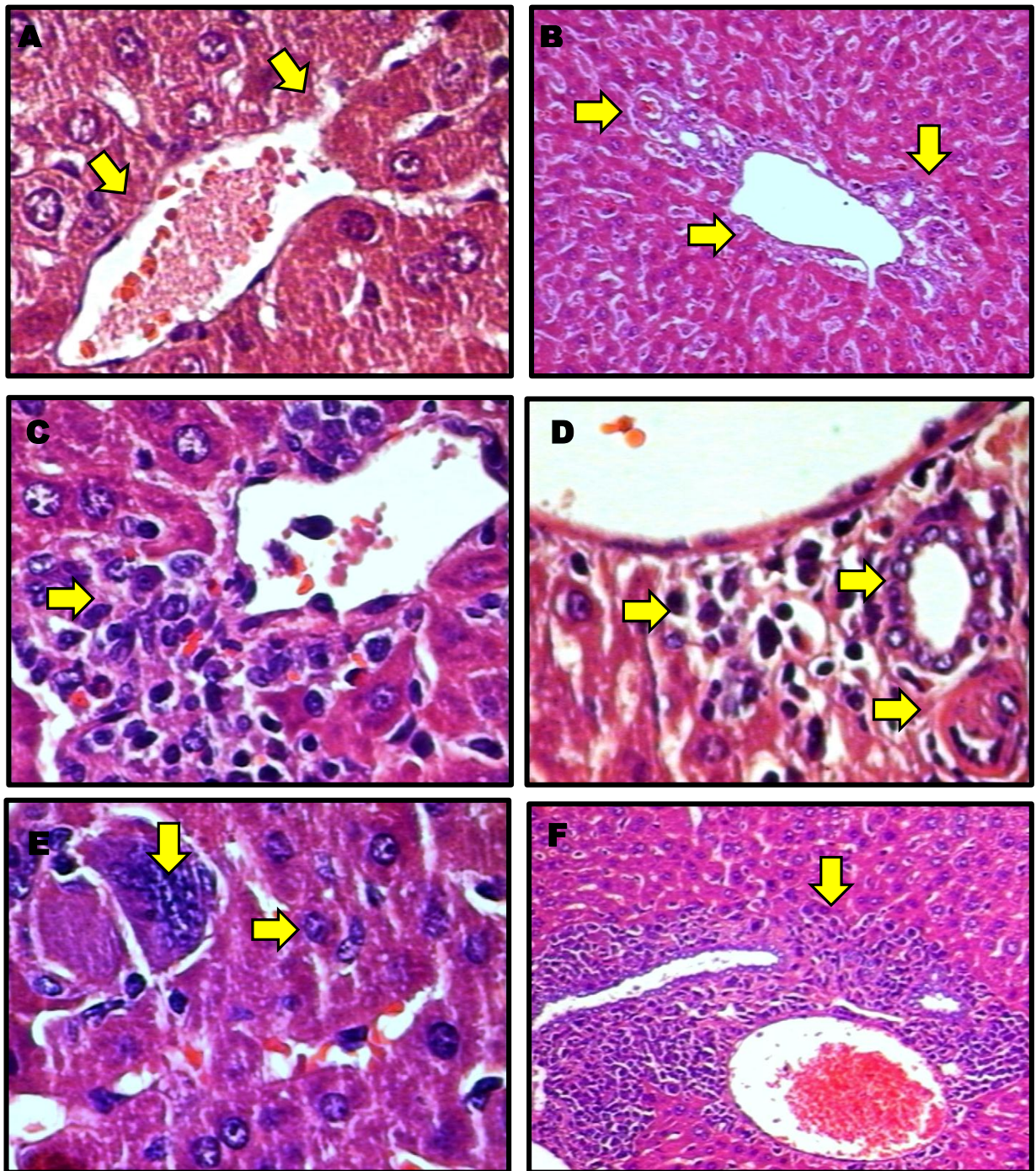


Figura 7 – Figuras representativas da histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: **(A)** Controle – Veia hepática terminal com parede fina e permeável aos sinusóides; **(B)** Controle – Espaço portal com tríade vasculobiliar; **(C)** Controle – Infiltrado linfoistiocítico na zona III; **(D)** 5-FU (25 mg/kg) - Discreta necrose em “saca- bocado”; **(E)** 5-FU (25 mg/kg) – Regeneração hepatocelular poliploide; **(F)** 5-FU (25 mg/kg) – Afluxo linfoistiocítico moderado comprometendo o espaço portal. Hematoxilina-eosina: **A, C, D e E** (x 400); **B e F** (x 100).

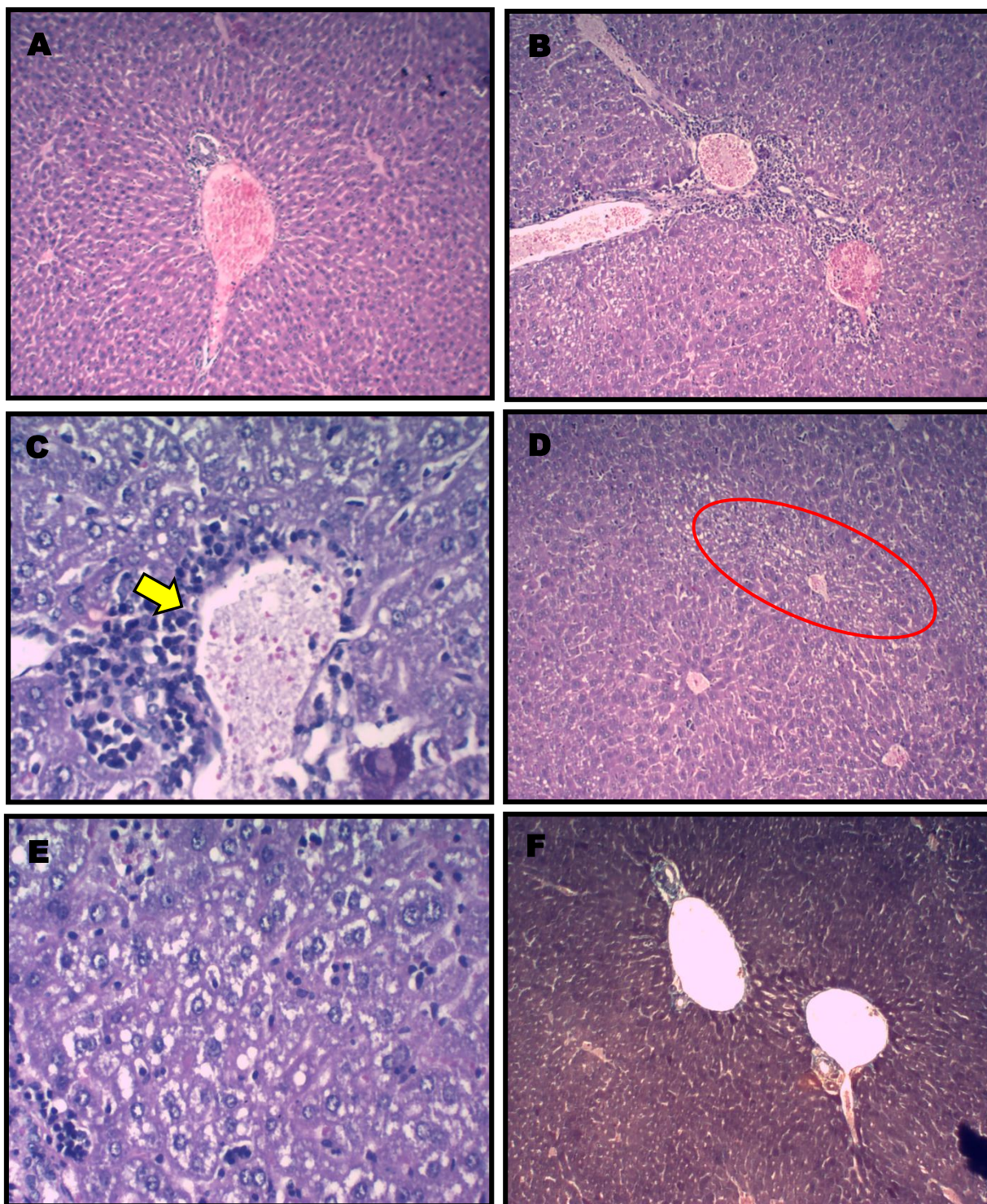


Figura 8 – Figuras representativas Histopatologia dos fígados dos animais tratados com HE-03: **(A)** HE-03 (25 mg/kg) – Arquitetura Hepática preservada com espaço porta e cordões hepáticos (HE 100 x); **(B)** HE-03 (25 mg/kg) – Infiltrado inflamatório perivascular (HE 100x); **(C)** HE-03 (25 mg/kg) – Infiltrado inflamatório privascular (HE 400x); **(D)** HE-03 (25 mg/kg) – Degeneração gordurosa micro e macrogoticular (HE 100x); **(E)** HE-03 (25 mg/kg) – Degeneração gordurosa micro e macrogoticular (HE 400x); **(F)** HE-03 (25 mg/kg) – Espaço porta (Tricrômico de masson 100x).

5.4 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* do HE-03 foi realizado o ensaio do micronúcleo, cujo resultado é apresentado na Tabela 6.

Como esperado, o tratamento com ciclofosfamida induziu um aumento na frequência de eritrócitos micronucleados ($14,5 \pm 2,6$) em comparação com o controle ($4,0 \pm 0,5$).

Todavia, o tratamento dos animais com a dose de 2000 mg/kg de HE-03 não induziu aumento na frequência de eritrócitos micronucleados ($3,3 \pm 0,4$) no sangue periférico quando comparados ao grupo controle ($4,0 \pm 0,5$).

Tabela 6 - Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com HE-03 (2000 mg/kg) e ciclofosfamida (50 mg/kg), via i.p.

Grupos	Dose (mg/kg)	Número de células micronucleadas
Controle	-	$4,0 \pm 0,5$
Ciclofosfamida	50	$14,5 \pm 2,6^a$
HE-03	2000	$3,3 \pm 0,4$

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisado aos pares por teste T de Student não paramétrico (Mann-Whitney). ^a $p < 0,05$ comparado ao controle.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Todos os anos, milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, as mortes decorrentes por essa enfermidade constituem 2% a 3% das mortes anuais registradas em todo o mundo, o que corresponde a aproximadamente 3,5 milhões de pessoas por ano (FOUCHE et al., 2008; UNNATI et al., 2013).

Várias modalidades de tratamento podem ser utilizadas, isoladamente ou em combinação. No entanto, apesar da diversidade de tratamentos e de sua evolução nas últimas décadas, estes apresentam muitas vezes eficácia limitada. Além disso, o desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais, bem como o aparecimento de efeitos indesejáveis graves, são fatores limitantes adicionais da terapia atual (QI et al., 2010; HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010; WANG et al., 2012; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Diante disso, pesquisas vêm sendo feitas com o intuito de desenvolver medicamentos adequados para o tratamento do câncer, que sejam efetivos, seletivos e com um mínimo de efeitos tóxicos (GEORGAKI et al., 2009; AZADMEHR et al., 2011; UNNATI et al., 2013).

Nos últimos anos a importância dos organismos vegetais como fontes produtivas de substâncias anticancerígenas e outras atividades biológicas reativaram interesses sociais e econômicos, superando obstáculos na construção de cenário crescente, estimulando, inclusive, a percepção das lideranças industriais empenhadas na fabricação de produtos sintéticos (BRAZ FILHO, 2010).

Espécies da família Piperaceae, especialmente do gênero *Piper*, têm importância comercial, econômica e médica (GUTIERREZ; GONZALEZ; HOYO-VADILLO, 2013). Piperina, o primeiro alcaloide amida identificado nesse gênero, apresenta uma diversidade de atividades biológicas, dentre elas, antitumoral e antimetastática (DOGRA; KHANNA; SHANKER, 2004; GUTIERREZ; GONZALEZ; HOYO-VADILLO, 2013).

No entanto, apesar dos importantes efeitos, a toxicidade *in vivo* da piperina é um fator limitante do seu uso, o que estimula os químicos sintéticos a produzirem diferentes análogos desta molécula, com o objetivo de potencializar seus efeitos e minimizar a sua toxicidade.

Sendo assim, o presente trabalho objetivou investigar a possível atividade antitumoral, bem como a toxicidade do 2-oxo-2-(4-etilamina)-piperinoato de etila, um análogo sintético da piperina. Para tanto, primeiramente investigou-se sua toxicidade *in vitro*, por meio da avaliação da atividade citotóxica em eritrócitos de camundongos Swiss.

A investigação da citotoxicidade em linhagens de células não tumorais é importante, pois o tecido normal e o tumoral podem exibir sensibilidade semelhante ao fármaco, apresentando uma estreita ou ausente janela terapêutica. Assim, a concentração que for efetiva para células tumorais afetará também as células normais, danificando o tecido (HOFMANN, 2008; YOUNG; SIMMONS, 2014).

Os eritrócitos, células vermelhas do sangue desprovidas de organelas, são o tipo de célula mais abundante no corpo dos mamíferos (SIEMS; SOMMERBURG; GRUNE, 2000; FÖLLER et al., 2013). Sua estrutura e simplicidade funcional tornam um modelo celular conveniente que é particularmente útil para estudos de toxicidade (TAMBORENA et al., 2013). Essas células têm uma membrana delicada, que pode ser significativamente alterada por interações com medicamentos, favorecendo a liberação de hemoglobina, processo este denominado de hemólise (AKI; YAMAMOTO, 1991; BEZERRA et al., 2005; FÖLLER et al., 2013).

Efeitos citotóxicos de diferentes compostos podem estar relacionados com danos à membrana celular ou alterações em sua permeabilidade (HADNAGY; MARSETZ; IDEL, 2003; YOUNG; SIMMONS, 2014). Especialmente em relação aos eritrócitos, sabe-se que diferentes antineoplásicos, tais como bleomicina, ciclosporina, cisplatina, mitomicina-C podem acentuar a anemia, característica da maioria dos pacientes com câncer, por induzir hemólise (WU et al., 1997).

Diante disso, conclui-se que a estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos é utilizada para avaliação da citotoxicidade de uma droga em estudo frente células não tumorais do organismo, fornecendo indícios para uma possível toxicidade *in vivo* (AKI; YAMAMOTO, 1991; SHARMA; SHARMA, 2001). Eritrócitos também fornecem um modelo preliminar para o estudo de efeitos protetores e tóxicos de substâncias ou situações associadas ao estresse oxidativo, sendo um possível indicador desse tipo de dano às células não tumorais *in vivo* (APARICIO et al., 2005; LEXIS; FASSETT; COOMBES, 2006; FÖLLER et al., 2013). Este ensaio permite avaliar o potencial da droga teste em causar lesões na membrana plasmática da

célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

O resultado obtido a partir do ensaio de citotoxicidade em eritrócitos de camundongos Swiss mostrou que o HE-03 induziu pequeno percentual de hemólise até a maior concentração testada (1250 µg/mL), o que indica que o HE-03 apresenta baixa toxicidade frente a eritrócitos, células estas comumente afetadas nos tratamentos com agentes antineoplásicos. Este resultado corrobora com os achados na literatura que mostram que a piperina também não induz hemólise em eritrócitos de camundongos, até a concentração 200 µg/mL, o que levou os autores a concluir que sua citotoxicidade não está relacionada a danos na membrana (BEZERRA et al., 2005).

Os agentes antineoplásicos apresentam índice terapêutico estreito, significativa toxicidade e exercem efeitos secundários graves, que comprometem a saúde e a qualidade de vida dos pacientes, por isso, a busca por novas drogas com maior potência quimioterápica e que desenvolvam menos efeitos tóxicos é constante (PAVELIC, 2014).

A investigação dos efeitos *in vivo* do HE-03 iniciou-se com o teste toxicológico pré-clínico agudo, uma vez que a pesquisa com um novo produto, para que seja aceito e escolhido na prática clínica como um agente terapêutico, deve apresentar estudos toxicológicos pré-clínicos capazes de proporcionar aos pesquisadores clínicos alguma segurança sobre as doses potencialmente tóxicas em animais de laboratório, além das provas de eficácia que deve demonstrar. Assim, os estudos pré-clínicos são essenciais para dar embasamento à administração de novos medicamentos em seres humanos (PORTUGAL, 2012).

O ensaio toxicológico pré-clínico agudo permite conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste e os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte (ALMEIDA, 2006; ANVISA, 2013).

Um dos parâmetros de toxicidade é a DL₅₀, caracterizada como a dose única de uma substância capaz de provocar a morte de 50% dos animais experimentais, justificando a escolha de doses seguras a serem utilizadas para os experimentos de atividade antitumoral *in vivo* subsequentes (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949; EATON; GILBERT, 2008; MAHMOOD et al., 2010; ALGARIRI et al., 2014), pois, se uma

substância tem DL_{50} três vezes maior que a dose mínima efetiva, ela pode ser considerada uma boa candidata para estudos posteriores (KRETTLI; ADEBAYO; KRETTLI, 2009; MOHAMMED; ERKO; GIDAY, 2014).

No entanto, o atual guia da Anvisa, que dispõe sobre os ensaios de toxicidade pré-clínica de novos candidatos a fármacos, descreve que não são necessários estudos para o cálculo preciso da DL_{50} . Todavia, devem ser utilizados métodos alternativos que empregam um menor número de animais mas que fornecem estimativa do valor da DL_{50} de uma determinada amostra (ANVISA, 2013).

O ensaio toxicológico pré-clínico agudo foi realizado com o HE-03, em camundongos submetidos às doses de 300 e 2000 mg/kg, pela via intraperitoneal. Almeida et al. (2006) descreveram um protocolo com uma metodologia simples para triagem farmacológica de extratos, substâncias, dentre outros produtos, com possíveis atividades estimulantes e depressoras no Sistema Nervoso Central (SNC) e autônomo (SNA), avaliadas através de um elenco de comportamentos pré-estabelecidos. A triagem farmacológica comportamental detecta, qualitativamente, algumas ações importantes, sendo um teste preliminar de fácil execução (ALMEIDA et al., 2006; ANVISA, 2013).

Considerando que substâncias que têm DL_{50} maior que 2000 mg/kg são consideradas de baixa toxicidade (ALGARIRI et al., 2014; KHATIK et al., 2014), pode-se inferir que HE-03 apresenta baixa toxicidade aguda em camundongos. Essa informação é corroborada pelo fato de que não houve morte de nenhum animal experimental e as alterações em nível de SNC e SNA foram revertidas após 30 minutos de administração, sendo consideradas portanto, sem importância clínica. Esse resultado mostra que o HE-03 apresenta menor toxicidade quando comparado com a piperina, que apresentou elevada toxicidade nos ensaios de toxicidade aguda em camundongos, ratos e hamsters, e subaguda em ratas (PIYACHATURAWAT; GLINSUKON; TOSKULKAO, 1983).

No estudo de toxicidade aguda realizado por Piyachaturawat e colaboradores (1983), a DL_{50} obtida para a piperina em camundongos foi em torno de 15,1 mg/kg (i.v.), 43 mg/kg (i.p.), 400 mg/kg (i.m.), 200 mg/kg (s.c.) para machos e 60 mg/kg (i.p.) para fêmeas; em ratas, a DL_{50} foi 33,5 mg/kg (i.p.), no entanto essa toxicidade foi diminuída após administração intragástrica (i.g.), para a qual foi obtida uma DL_{50} de 514 mg/kg. Em hamsters fêmeas, a DL_{50} foi em torno de 105 mg/kg (i.p.). A maioria

dos camundongos tratados com piperina i.p. e i.g. morreram em até 14 minutos após a administração, porém, quando tratados pelas vias i.m. e s.c. sobreviveram até quatro horas. Ainda, foram observadas várias alterações em nível de SNC, dentre elas excitação, hiperatividade e convulsão. Nas outras espécies, houve morte dos animais em até 12 horas após a administração (PIYACHATURAWAT; GLINSUKON; TOSKULKAO, 1983).

O ensaio de toxicidade subaguda foi realizado em ratas com a piperina nas doses de 250, 350 e 500 mg/kg (i.g.), no qual foi possível observar que os animais sobreviveram apenas até três dias após a administração. No entanto, o tratamento com a dose de 100 mg/kg não produziu morte nos animais durante todo o experimento (sete dias). No exame histopatológico da dose de 500 mg/kg, foi detectado grave hemorragia no trato gastrointestinal, hemorragia e necrose nas células do trato urinário e nas glândulas adrenais (PIYACHATURAWAT; GLINSUKON; TOSKULKAO, 1983).

Uma vez realizada a avaliação toxicológica inicial foi possível determinar as doses farmacológicas seguras para prosseguir com o estudo, investigando a atividade antitumoral do HE-03 *in vivo*.

Para os ensaios *in vivo*, utilizou-se a linhagem de Carcinoma Ascítico de Ehrlich, um adenocarcinoma mamário murino, transplantável e que tem sido bastante utilizado como modelo de neoplasia experimental *in vivo*, para investigar os efeitos antineoplásicos de muitas substâncias ou compostos (VINCENT; NICHOLLS, 1967 *apud* VIEIRA et al., 2010).

Após nove dias de tratamento com HE-03 todos os parâmetros analisados (volume e massa tumoral, viabilidade e total celular) reduziram significativamente nas doses de 12,5 e 25 mg/kg, caracterizando uma atividade inibitória do crescimento tumoral. O tratamento com a dose de 6,25 mg/kg reduziu significativamente apenas a viabilidade e o total celular.

Considerando estes os parâmetros mais importantes na avaliação da atividade antitumoral no modelo experimental de carcinoma de Ehrlich, pode inferir que HE-03 apresenta potente atividade antitumoral nas doses avaliadas.

Alguns alcaloides do gênero *Piper*, como a piperina, a pipartina e a piperlonguminina, são descritos na literatura por apresentarem significativa atividade antitumoral *in vivo* frente a linhagem celular sarcoma 180, nas doses de 25 mg/kg

(piperlonguminina) e 50 mg/kg (piperina e piplartina) (BEZERRA et al., 2006; BEZERRA et al., 2008). Em combinação com o 5-FU (10 mg/kg), piperina (50 mg/kg) e piplartina (50 mg/kg), apresentaram atividade antitumoral *in vivo* frente a essa mesma linhagem celular, sendo que somente a piplartina teve sua atividade antitumoral potencializada quando combinada com este antineoplásico (BEZERRA et al., 2008). Outros experimentos *in vivo* mostraram que a piperina apresenta atividade em modelo de carcinoma sólido (1,14 mg/dose/animal; i.p.) e ascítico de Ehrlich (1,14 mg/dose/animal; i.p.), sendo que neste último o único parâmetro avaliado foi o aumento da sobrevivência dos animais (SUNILA; KUTTAN, 2004).

Ainda, a piperina inibiu metástase pulmonar (PRADEEP; KUTTAN, 2002), como também citocinas pró-inflamatórias expressas em células B16F-10 de melanoma, resultando em atividade antimetastática, apresentou atividade citotóxica em células de carcinoma mamário 4T1 (PRADEEP; KUTTAN, 2004; LAI et al., 2012), em células HRT-18 (adenocarcinoma retal humano) (YAFFE et al., 2013), bem como induziu apoptose via mitocondrial em células A549 de câncer de pulmão (LIN et al., 2014).

A piplartina apresentou atividade antitumoral *in vitro* frente KB (carcinoma nasofaríngeo), P-388 (leukemia linfocítica) e HT-29 (carcinoma de colon) (DUH; WU; WANG, 1990; BEZERRA et al., 2005).

O 5-fluorouracil (5-FU), um dos fármacos mais utilizados na quimioterapia do câncer, tem um importante papel no tratamento de neoplasias gastrointestinais, carcinoma de cabeça e pescoço (STEGEER; HAUTMANN; KOLBL, 2012), câncer de cólon e mama (PETERS; KÖHNE, 1999; ROQUE; FORONES, 2006). É agente antimetabólito que possui uma uracila fluorada em que o átomo de hidrogênio da posição 5 foi substituído pelo átomo de flúor (KOROLKOVAS, 2010). Seu mecanismo inclui inibição da timidilato sintase (TS) pelo 5-fluoro-2'-deoksiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), incorporação de 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) ao RNA e incorporação do 5-fluoro-2'-deoksiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) ao DNA. A inibição da TS, uma enzima importante na síntese de pirimidina, resulta na depleção do trifosfato de deoxitimidina (dTTP) e um aumento no trifosfato de deoksiuridina (dUTP) seguida da diminuição na síntese e reparo de DNA. Portanto, o 5-FU é um antineoplásico, da classe dos antimetabólitos, que interfere com o processo de replicação celular.

Incorporação do 5-FU ao RNA também tem sido relatada à sua ação citotóxica (NOORDHUIS et al., 2004).

Uma das principais maneiras de se estudar mecanismo de ação de fármacos antineoplásicos é por meio da análise do ciclo celular, investigando se o fármaco induz parada do ciclo e em qual fase isto acontece (ALMEIDA et al., 2005; XIAO et al., 2011). A regulação de suas fases é um processo diretamente relacionado com a geração e desenvolvimento de neoplasias (XAVIER; CALDEZ; KALDIS, 2014). Em resposta à danos celulares, o progresso do ciclo pode ser interrompido nos pontos de checagem, que servem para manter a integridade genômica, inibindo a síntese do DNA para que seja reparado, ou induzindo a morte celular (YE et al., 2003; ALEXANDRE et al., 2014). No caso de células tumorais, elas são incapazes de parar nos pontos de checagem, desregulando assim o ciclo celular (XAVIER; CALDEZ; KALDIS, 2014).

Com o intuito de estudar os mecanismos moleculares envolvidos na atividade antitumoral apresentada pelo HE-03, a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular foram investigados.

HE-03 quando administrado na dose de 12,5 mg/kg induziu um aumento do pico sub-G1, que foi acompanhado por uma redução na quantidade de células nas fases G0/G1 e S.

As células em apoptose apresentam uma redução na marcação do DNA após utilização de diferentes fluorocromos, como o iodeto de propídeo, que tem sido usado para detecção desse processo de morte de celular. Dessa forma, o aparecimento de células com DNA com menor marcação do que àquele das células em G0/G1, o qual representa o pico Sub-G1, tem sido considerado como um biomarcador de dano no DNA, e o aparecimento deste pico está relacionado com a presença de morte por apoptose. Várias observações indicam que a diminuição na marcação do DNA, observado em células em apoptose, é consequência da perda parcial de DNA dessas células, devido à ativação de endonucleases endógenas e liberação subsequente de fragmentos de DNA de baixo peso molecular a partir da célula, antes da análise por citometria de fluxo (DARZYNKIEWICZ et al., 1992; WANG et al., 2011).

Esse resultado sugere um maior efeito citotóxico de HE-03 quando administrado na maior dose, indicando morte celular subsequente a uma parada do ciclo celular (HANSKUL et al., 2014). Esse efeito antiproliferativo corrobora com o aumento da percentagem de células mortas (ALEXANDRE et al., 2014).

Coincidindo com esse resultado, é relatado na literatura, apesar de ser por um mecanismo diferente, que a piperina também age interferindo no ciclo celular por induzir parada na fase G0/G1, com consequente inibição da proliferação celular de câncer de próstata humano (OUYANG et al., 2013) e em células de câncer retal HRT-18 (YAFFE et al., 2013). Portanto, estudos adicionais devem ser realizados para caracterizar os efeitos do HE-03 no ciclo celular.

Angiogênese, processo onde ocorre o crescimento de novos vasos sanguíneos para fora dos capilares pré-existentes, com a finalidade de apoiar as necessidades metabólicas das células, fornecendo nutrientes e oxigênio (GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000; POTENTE et al, 2011; GRIFFIOEN; THIJSEN, 2014), é necessária durante o crescimento dos tecidos e remodelação (PORTUGAL, 2012; MUNARON, 2014), além de ser passo fundamental para o crescimento de tumores e metástases (AGRAWAL et al., 2011).

Nos últimos anos, a terapia antiangiogênica é tida como uma nova alternativa à terapia convencional do câncer, ou ainda como uma terapia complementar, mostrando uma variedade de formas que impedem a angiogênese tumoral, devido ao notável sucesso em ensaios pré-clínicos e clínicos (CRAWFORD; FERRARA, 2009; CRISTINA et al., 2014). Assim, as terapias antiangiogênicas estão sendo utilizadas como forma de inibir o fornecimento de nutrientes e oxigênio para os tumores (YANG et al., 2014).

O tratamento com HE-03 nas doses de 6,25 e 12,5 mg/kg, reduziu significativamente a capacidade angiogênica no modelo tumoral estudado, corroborando com a atividade antitumoral apresentada pela substância. Esse resultado sugere que o mecanismo de ação antitumoral do HE-03 envolve, pelo menos parcialmente, um efeito antiangiogênico. Esse dado corrobora com o efeito antiangiogênico apresentado pela piperina, que inibe vários aspectos do processo angiogênico *in vitro* (100 μ M), como a migração e proliferação de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e a fosforilação do fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/AKT, vias que estão envolvidas na promoção da angiogênese (SOMANATH et al., 2006), bem como induz a supressão da angiogênese induzida por células de câncer de mama (MDA-MB-231) *ex vivo* (50 μ M) (DOUCETTE et al., 2013). Esses resultados mostram a necessidade da realização de estudos adicionais com o HE-03,

com o objetivo de identificar qual (is) alvo (s) molecular (es) estão envolvidos nesse efeito.

A avaliação da toxicidade de uma droga com potencial antitumoral é muito importante, uma vez que muitos dos tratamentos utilizados na terapia do câncer têm efeitos colaterais indesejáveis sobre as células não tumorais. Toxicidade é um evento complexo expresso em um largo espectro de efeitos, que variam desde a morte celular até mudanças metabólicas complexas como neuro, hepato e/ou nefrotoxicidade, onde não há morte celular necessariamente, mas sim alterações funcionais (EISENBRAND et al., 2002), sendo assim, a avaliação de diferentes parâmetros em um estudo de toxicidade é fundamental para caracterizar os possíveis efeitos tóxicos da amostra em estudo.

Assim, foi realizada também a investigação de possíveis efeitos tóxicos do HE-03 nas doses farmacológicas testadas durante o experimento de avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, que foi caracterizado por doses repetidas ao longo de nove dias. Esse ensaio permite avaliar os efeitos tóxicos produzidos pelo acúmulo da substância no organismo.

Assim, alguns parâmetros podem ser avaliados nos estudos de atividade antitumoral *in vivo* para investigar a toxicidade do HE-03 nos animais, como por exemplo, consumo de água e de ração, bem como a evolução ponderal. Foi observado que não houve alteração nesses parâmetros nos animais tratados com o HE-03. Entretanto, os animais tratados com o 5-FU, utilizada como droga padrão, tiveram uma redução significativa no peso corporal sem redução no consumo de ração. Este efeito corrobora com os efeitos adversos já relatados na literatura para este antineoplásico, como anorexia, que está diretamente associada à desnutrição e à perda de peso, sendo este último tipicamente associado à toxicidade. Praticamente todas as drogas antineoplásicas utilizadas na clínica médica causam alterações gastrointestinais (TALMADGE; FIDLER, 2010; OLIVEIRA et al., 2010), porém, os resultados preliminares indicam que HE-03 não interfere nesse sistema.

O fígado é o órgão de detoxificação dos mamíferos e os rins o órgão excretor mais importante, e ambos são susceptíveis a ação de drogas antineoplásicas (BEZERRA et al., 2008; MALKANTHI; PATERSON; BARNES, 2014). Como exemplos, pode-se citar disfunções hepáticas induzidas por mitamicina e toxicidade renal causada por docetaxel (BEZERRA et al., 2008).

Os rins, órgão que constitui o sistema de filtração do organismo, filtram aproximadamente 190 litros de sangue por dia, eliminando resíduos e excesso de líquido na forma de urina. Além disso, regulam o equilíbrio hídrico, ácido-básico e eletrolítico do organismo e outros elementos químicos do sangue (sódio, potássio, fósforo e cálcio), eliminam medicamentos, toxinas e produtos de degradação, participam de funções hormonais e atuam na regulação da pressão arterial (CURY; BRUNETTO; AYDOS, 2010; CRUZ; DA CUNHA; SOUZA, 2014).

Assim, os rins é o órgão excretor e osmorregulador mais importante do organismo (HENRY, 2008). A alteração da função renal é uma das consequências mais comuns de toxicidade medicamentosa decorrente da excreção inadequada dos medicamentos ou de seus metabólitos (HENRY, 2008). Vários fármacos são capazes de causar lesões nefrotóxicas. Estudos apontam esses efeitos indesejados em animais e humanos de substâncias como a anti-inflamatórios não esteroidais, antimicrobianos do tipo aminoglicosídeos, cefalosporinas e tetraciclina e vários antineoplásicos utilizados atualmente na clínica médica, como o metotrexato, docetaxel, cisplatina, dentre outros (PFALLER; GSTRAUNTHALER, 1998; BEZERRA, 2008; KOROLKOVAS, 2010).

Os compostos nitrogenados não protéicos (NPN) são formados no organismo como resultado do catabolismo de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas. Concentrações elevadas dos principais componentes NPN (ureia, creatinina e ácido úrico) ocorrem em decorrência da diminuição da função renal (PFALLER; GSTRAUNTHALER, 1998). Desse modo, a avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de ureia e creatinina.

A ureia é um produto de degradação do metabolismo dos aminoácidos produzida a partir da amônia no ciclo da ureia hepática (GROSS; WEHRLE; BUSSEMAKER, 1996) e constitui a forma como o organismo elimina o nitrogênio dessas moléculas, sendo sua eliminação principalmente através dos rins (PEREIRA, 1998). É filtrada livremente pelo glomérulo, mas não é reabsorvida nem secretada ativamente, sendo portanto, um fraco preditor da taxa de filtração glomerular (TFG), pois 40 - 70% retornam para o plasma por um processo de difusão passiva, que é dependente do fluxo urinário. Logo, a estase urinária leva a um maior retorno de ureia ainda nos túbulos renais e a uma subestimação da TFG calculada pelo *clearance* de

ureia (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007). Dessa forma, tem sido recomendado que a aplicabilidade das determinações da ureia no soro é significativamente potencializada quando os resultados da ureia são considerados juntamente com os resultados das determinações da creatinina (HENRY, 2008).

Já a creatinina, por sua vez, é um produto do catabolismo da creatina presente no tecido muscular. Essa substância só é excretada pela via renal. Também é filtrada livremente pelos glomérulos, mas não é reabsorvida e nem reaproveitada pelo organismo (BRENNER; LEVINE, 2004). Seus níveis séricos elevados estão associados com uma redução da taxa de filtração glomerular e, portanto, distúrbios renais (HENRY, 2008). A concentração sérica de creatinina é o marcador mais utilizado para determinar a magnitude de lesão renal na prática diária (ATAEI et al., 2014), uma vez que a queda da filtração glomerular com consequente elevação da taxa de creatinina plasmática implica na perda da função renal (BERNE; LEVY, 2006).

Dentro desse contexto, ao ocorrer falha renal, produtos de degradação do metabolismo, que seriam eliminados pelos rins, particularmente substâncias nitrogenadas como a ureia e a creatinina, se acumulam levando a um aumento dos seus níveis sanguíneos (HENRY, 2008).

Os animais tratados com HE-03 na dose de 6,25 mg/kg apresentaram um aumento significativo na concentração sérica de ureia, sugestivo de disfunção renal (BASTA; SCHMIDT; DE CATERINA, 2004; LI et al., 2015). No entanto, esse resultado de forma isolada não tem relevância toxicológica, pois não foram evidenciados danos renais no exame histopatológico, mostrando que a integridade do tecido renal permaneceu preservada após o tratamento com a substância. Além disso, não observou-se alterações nos níveis séricos de creatinina nos grupos tratados com HE-03, e como dito anteriormente, a principal utilidade clínica da ureia está na determinação em conjunto com a creatinina (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007).

O fígado é o maior e mais complexo dos órgãos internos, envolvido com a síntese de proteínas plasmáticas, lipídios e lipoproteínas, mas também tem função na reserva de energia e síntese de vários hormônios. Além disso, exerce papel fundamental no metabolismo de nutrientes e é responsável pela biotransformação de drogas e produtos químicos, bem como de outros compostos potencialmente tóxicos, podendo causar lesões hepáticas (ABDULRAHMAN et al., 2014; MALKANTHI; PATERSON; BARNES, 2014). Ainda, o fígado possui a capacidade única de se

regenerar após ferimento (WASHABAU; CHAPTER, 2013). Dessa forma, assim como os rins, o fígado é um órgão susceptível aos efeitos dos antineoplásicos.

O fígado é o órgão que apresenta maior susceptibilidade à efeitos tóxicos, provavelmente devido a dois fatores importantes: i) a sua posição anatômica, que o torna mais vulnerável e, ii) o seu próprio determinismo funcional, que condiciona maior concentração celular, não apenas dos compostos a serem transformados, como também dos metabólitos resultantes (VASCONCELOS et al., 2007). Várias afecções hepáticas distintas podem ser desencadeadas pelo uso de drogas e xenobióticos, incluindo hepatite aguda e crônica, hepatite fulminante, cirrose hepática, doenças hepáticas colestáticas, doença hepática gordurosa não alcoólica, distúrbios vasculares do fígado e tumores hepáticos (BITTENCOURT, 2011).

Dentre os parâmetros bioquímicos utilizados, as provas de função hepática desempenham importante interesse, pois diversas substâncias são extensamente biotransformadas pelo fígado (HENRY, 2008).

Como células metabolicamente complexas, os hepatócitos contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas. Com a lesão hepática, estas enzimas podem extravasar para o plasma e podem ser úteis para o diagnóstico e monitoramento da lesão hepática (HENRY, 2008; BRANCO, 2009). Os principais marcadores de lesão celular hepática são as enzimas citoplasmáticas e mitocondriais, que não são específicas dos hepatócitos, e podem estar aumentadas com lesão em outros órgãos; todavia, as hepatopatias são a causa mais comum de elevação. As enzimas citoplasmáticas incluem a lactato desidrogenase (LDH), a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As enzimas mitocondriais, como a isoenzima mitocondrial da AST, são liberadas mediante o dano mitocondrial. As enzimas são liberadas pelos hepatócitos por meio de uma variedade de mecanismos, os quais determinam o padrão de elevação enzimática (HENRY, 2008).

Por definição, as transaminases são enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e alfa-ceto-ácidos por transferência do grupo amino (SHARON; CENTER, 1995). A enzima AST é encontrada em ordem decrescente no fígado (mitocôndria e citoplasma), músculos do coração e esqueléticos, rim, cérebro, pâncreas, pulmão e células vermelhas do sangue (eritrócitos) (JORGE, 2006; FONSECA, 2009).

Torna-se notório que a AST não é uma enzima específica do fígado. Quando órgãos são lesados (necrose do tecido), há liberação da AST para o soro, sendo ela quantificada através de exames bioquímicos. Como não há um método laboratorial para saber qual a origem da AST encontrada no sangue, o diagnóstico da causa do seu aumento deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada (JORGE, 2006; FONSECA, 2009). Por sua vez, a enzima ALT apresenta concentrações elevadas apenas no fígado (citoplasma), sendo a sua avaliação a mais útil na investigação das doenças do órgão. A enzima é liberada pelo fígado após a destruição do tecido hepático e encontrada rapidamente no sangue (FONSECA, 2009).

Apesar da administração do HE-03 nos animais experimentais não ter induzido alteração significativa nos níveis de ALT, ela resultou em um aumento significativo da atividade da AST em ambos os grupos tratados com HE-03. Todavia, apesar da diferença em relação ao grupo controle, os valores de AST após tratamento com HE-03 permaneceram dentro dos valores considerados normais para a espécie (GAD, 2007). Como os valores para a enzima ALT não estão alterados, o indício enzimático de comprometimento hepático induzido pela substância, não pode ser confirmado. Valores aumentados de AST também podem significar distrofia muscular progressiva (inclusive no músculo cardíaco) e embolia pulmonar, além de outras condições clínicas, como na gangrena, esmagamento muscular, enfermidades hemolíticas, dermatomiosite, colangite (inflamação dos ductos biliares) e infecção por parasitas (MELO-DINIZ, 2000). Sendo assim, estudos adicionais devem ser realizados para melhor caracterizar este efeito do HE-03.

O hemograma tem grande importância nos estudos de toxicidade, pois o sistema hematopoiético é extremamente sensível a atividades de agentes tóxicos, principalmente aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico, resultando em alterações qualitativas ou quantitativas, transitórias ou permanentes e que podem limitar a utilização de fármacos e medicamentos, além de que, alterações hematológicas podem refletir, também, na atividade imunológica (MEDEIROS et al., 2009).

O hemograma é constituído pelas informações quantitativas (número total de células, contagem diferencial, índices hematimétricos) e qualitativas (morfologia do esfregaço sanguíneo), sendo composto de duas partes: o eritrograma e o leucograma

(LOPES; CUNHA, 2002). Os eritrócitos têm como principal função o transporte de oxigênio, compreendem-se no eritrograma o número total de hemácias, a concentração de hemoglobina, volume globular e proteínas plasmáticas (LOPES; CUNHA, 2002). No leucograma observa-se a contagem total e diferencial de leucócitos (KERR, 2003), células que têm como principal função a proteção organismo contra infecções (EVANS, 2008).

A mielossupressão e a supressão da resposta imune são reações adversas comuns à grande maioria dos antineoplásicos, levando aos casos de anemia, trombocitopenia, leucopenia, neutropenia, favorecendo maior susceptibilidade às infecções. É a consequência mais comum da quimioterapia antineoplásica, uma vez que, na maioria dos casos, ela afeta as células normais de rápida divisão celular, como é o caso da medula óssea, sendo considerado entre os mais incapacitantes efeitos colaterais no tratamento do câncer (SOUZA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2010; STEGER; HAUTMANN; KOLBL, 2012).

De forma diferente da maioria dos agentes antineoplásicos, o HE-03 não provocou alterações nos parâmetros hematológicos dos animais tratados, no que se refere ao eritrograma.

No leucograma, foi observado leucopenia, acompanhada de neutropenia nos animais tratados com a maior dose de HE-03 (25 mg/kg), o que representa um dos principais efeitos indesejáveis do tratamento do câncer, ocasionado pela agressão às células do sistema imunológico (BRANDÃO et al., 2010). A neutropenia pode ocorrer devido a uma inadequada produção dessas células na medula óssea (característica da maioria dos quimioterápicos) ou então devido a uma elevada destruição de glóbulos brancos na circulação, além de ser uma alteração comum em casos de anemia aplástica (EVANS, 2008). Já o aumento da porcentagem de linfócitos é característico de infecções crônicas, anemia macrocítica, malignidade linfoide e inflamação. Além disso, após situações de estresse pode ocorrer linfocitose fisiológica. Desse modo, a presença do tumor nos animais pode ter provocado situações de estresse, que por sua vez é refletido no leucograma (EVANS, 2008). Apesar da ocorrência de leucopenia e linfocitose, esses resultados encontram-se dentro faixa de valores normais para a espécie (GAD, 2007).

Entretanto, como esses efeitos sobre as células sanguíneas podem ser observados no tratamento com a maioria dos antineoplásicos atualmente utilizados

na clínica médica, não se trata de uma característica negativa específica do produto testado, fato esse que não limita a realização de estudos pré-clínicos e clínicos subsequentes.

A análise do índice dos órgãos dos camundongos com tumor de Ehrlich submetidos ao tratamento com HE-03 mostrou um aumento significativo no índice de baço e rins nos animais tratados com a maior dose dessa substância. Diferentemente do HE-03, a piperina (4,5 mg/kg e 100 mg/kg) induziu diminuição no índice de baço (DOGRA; KHANNA; SHANKER, 2004; BEZERRA et al. 2006).

O baço é o maior órgão do sistema linfático, tem função imunológica e hematológica desempenhada por duas polpas, uma branca, formada por tecido linfoide, que produz e armazena os linfócitos, e outra vermelha, que destrói as hemácias defeituosas e velhas, e armazena células de defesa, liberando-as na circulação quando necessário (YU et al., 2007). A hipertrofia do baço em alguns animais com doença maligna tem sido interpretado como ativação de defesas do hospedeiro (LINS et al., 2009). Esse resultado corrobora com a linfocitose que ocorreu também nos animais tratados com a dose de 25 mg/kg do HE-03, podendo traduzir-se numa imunomodulação positiva no sentido de ajudar o organismo no combate ao tumor.

A análise histopatológica não evidenciou alterações nos rins dos animais tratados com a maior dose de HE-03 e com o 5-FU, demonstrando uma baixa toxicidade do composto sobre esse órgão, apesar de ter sido observado alterações nos níveis de ureia e índice do órgão, porém considerados sem relevância clínica. Dados da literatura mostram que a análise histopatológica dos rins após administração da piperina (100 mg/kg) evidenciou discretas mudanças no epitélio tubular proximal e hemorragia tubular e glomerular (BEZERRA et al., 2006).

O fígado contém dois tipos principais de células epiteliais diferenciadas: os hepatócitos, células que exercem a principal atividade metabólica do órgão, que estão localizados no parênquima hepático e representam cerca de 60% da sua massa, e as células epiteliais biliares, localizadas nos ductos biliares (NAVES; MORENO, 2000; XAVIER; CALDEZ; KALDIS, 2014). As células de Kupffer são macrófagos fixos nas membranas dos sinusoides e podem ser encontradas em todo o fígado (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

A análise histopatológica do fígado dos animais do grupo controle mostrou a presença de fígado reacional que pode ser consequência local de um efeito sistêmico (tumor). Os animais tratados com o 5-FU sofreram um dano hepático característico de necrose, corroborando assim, os dados da literatura (PITA et al., 2012).

O tratamento com a dose de 25 mg/kg do HE-03 induziu alterações histopatológicas comuns relatadas na literatura como evidência de fraca hepatotoxicidade, como por exemplo, discreto infiltrado inflamatório linfo-histiocitário perivascular e subcapsular e esteatose macrovesicular e microvesicular, lesões de etiologia metabólica, geralmente reacional à terapia medicamentosa, porém de natureza reversível e com rápida melhora após a retirada da droga ou ajuste de dose (MONTENEGRO et al., 2008; TORTI, et al., 2001; VASCONCELOS et al. 2007). Esses achados corroboram com dados da literatura nos quais a análise histopatológica, após administração da piperina (100 e 500 mg/kg), mostrou esteatose microvesicular e infiltrado focal de células inflamatórias. Além desses efeitos, que foi observado também para o HE-03, a piperina induziu ainda hiperplasia das células de Kupffer, congestão venosa centrolobular, degeneração de hepatócitos, hemorragia sinusoidal necrose de células hepáticas (PIYACHATURAWAT; GLINSUKON; TOSKULKAO, 1983, BEZERRA et al., 2006).

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsicamente ligados. A mutação é consequência de danos no DNA e estes danos podem ser o processo inicial da formação de neoplasias por carcinógenos químicos (VIEIRA; SANTOS; CHEN-CHEN, 2010).

Estudos demonstram a correlação entre compostos mutagênicos e efeitos carcinogênicos (VIEIRA; SANTOS; CHEN-CHEN, 2010). Adicionalmente, muitas drogas antineoplásicas podem causar efeitos colaterais que incluem indução de genotoxicidade em células não tumorais (VIEIRA; PAULA; CHEN-CHEN, 2010).

Para se conhecer o potencial genotóxico de um determinado composto existem testes de genotoxicidade bem definidos e internacionalmente reconhecidos pelas agências reguladoras como parte da bateria de testes recomendada para o registro de novos produtos que entram no mercado mundial (HAYASHI et al., 2007). Dentre os métodos disponíveis para avaliação destaca-se o ensaio do micronúcleo, que detecta tanto clastogenicidade – quebra de cromossomos, quanto aneugenicidade –

aneuploidia ou segregação cromossômica anormal devido a disfunções no aparato mitótico (HAYASHI et al., 2007; BONASSI; EL-ZEIN; BOLOGNESI, 2011).

Assim, quando um produto em teste aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ele interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso, levando ao aparecimento de fragmentos de cromatina, ou cromossomos inteiros, que não se incorporaram ao núcleo das células-filhas, os micronúcleos (NEPOMUCENO; SILVA, 2010).

Tendo em vista esse fato, no presente trabalho foi investigado o potencial mutagênico *in vivo* do HE-03 por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico.

O tratamento com HE-03 não provocou aumento significativo no número de eritrócitos micronucleados no sangue periférico dos animais tratados com a dose de 2000 mg/kg, levando ao entendimento da ausência de capacidade genotóxica desta substância. Esse resultado corrobora com dados da literatura que mostra ausência de genotoxicidade no ensaio de micronúcleo da piperina com doses de até 574 mg/kg (THIEL et al., 2014), evidenciando melhor efeito do HE-03 nesse ensaio.

Diante do exposto, é possível inferir que esse trabalho apresenta dados relevantes, tanto do ponto de vista farmacológico como toxicológico, que subsidiam a realização de testes pré-clínicos adicionais, especialmente de mecanismo de ação, e posteriormente testes clínicos com o HE-03.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados com o análogo da piperina 2-oxo-2-(4-etilamina)-piperinoato de etila (HE-03), foi possível concluir que:

- HE-03 apresentou baixa citotoxicidade frente eritrócitos de camundongos;
- HE-03 apresentou baixa toxicidade aguda em camundongos;
- HE-03 apresentou potente atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich;
- HE-03 exerce seu efeito antitumoral por interferir na progressão do ciclo celular e apresentar ação antiangiogênica;
- HE-03 apresentou baixa toxicidade *in vivo*, em animais com CAE submetidos ao tratamento de doses repetidas (nove dias);
- HE-03 não apresentou genotoxicidade *in vivo*, nas condições avaliadas.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDA, A.; BENOURETH, D.E.; TABET, M.; LIMAN, R.; KONUK, M.; KHALLEF, M.; TAHER, A. Mutagenicity and genotoxicity of drinking water in Guelma region, Algeria. **Environ Monit Assess.**, v. 187, n. 21, p. 1-15, 2015.
- ABDULRAHMAN, K. A-A.; ABDULRAHMAN, M. A-E.; MD TANWIR, A.; MHAMMAD, T.; AHMED, A. E.; SAEED, M. A-A. A Review of Hepatoprotective Plants Used in Saudi Traditional Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-22, 2014.
- AGRAWAL, S. S.; SARASWATI, S.; MATHUR, R. et al. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life Sciences.**, v. 89, p. 147-158, 2011.
- AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, p. 133-138, 1991.
- ALAPATI, V.; NOOLVI, M. N.; MANJULA, S. N.; PALLAVI, K. J.; PATEL, H. M.; TIPPESWAMY, B. S.; SATYANARAYANA, S. V. *In vivo* anti-tumour activity of novel Quinazoline derivatives. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 16, n. 13, p. 1753-1764, 2012.
- ALBAS, C.S.; SOUZA, J.P.; NAI, G.A.; PARIZI, J.L.S. Avaliação da genotoxicidade da *Ilex paraguariensis* (erva mate) pelo teste do micronúcleo. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.345-349, 2014.
- ALBRECHT, J. H.; POON, R. Y.; AHONEN, C. L.; RIELAND, B. M.; DENG, C.; CRARY, G. S. Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. **Oncogene**, v. 16, p. 2141–2150, 1998.
- ALAEDDINI, M.; MOSTAFALOO, E.; MIRMOHAMMADKHANI, O.; ESHGHYAR, N.; ETEMAD-MOGHADAM, S. Exploring the concept of “inflammatory angiogenesis” in keratocystic odontogenic tumor. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, v.18, n. 2, p. 241-245, 2013.
- ALEXANDRE, G.; CÉLINE, V.; PATRICE, M.; CAROLE, C. M.; PHILIPPE, H. Effects of topical corticosteroids on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis: In vitro comparison on HaCaT. **International Journal of Pharmaceutics**, p.1-8, 2014.
- ALGARIRI, K.; ATANGWHO, I.J.; MENG, K.Y.; ASMAWI, M.Z.; SADIKUN, A.; MURUGAIYAH, V. Antihyperglycaemic and Toxicological Evaluations of Extract and Fractions of *Gynura procumbens* Leaves. **Trop Life Sci Res.**, v. 1, p. 75-93, 2014.
- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS – JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, V. D., LEITÃO, A., REINA, L. D. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L., & LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.

ANDRADY, C.; SHARMA, S. K.; CHESTER, K. A.; Antibody-enzyme fusion proteins for cancer therapy. **Immunotherapy**. v. 3, p. 193-211, 2011.

ANVISA. **Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.

APARICIO, R. M. et al. In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 1063-1067, 2005.

ARAVINDARAM, K.; YANG, N. Anti-Inflammatory plant natural products for cancer therapy. **Planta Medica**, v. 76, n. 11, p. 1103-1117, 2010.

ATAEI, N.; BAZARGANI, B.; AMELI, S.; MADANI, A.; JAVADILARIJANI, F.; MOGHTEADERI, M.; ABBASI, A.; SHAMS, S.; ATA EI, F. Early detection of acute kidney injury by serum cystatin C in critically ill children. **Pediatr Nephrol**, vol. 29, p. 133–138, 2014.

AZADMEHR, A.; HAJIAGHAEI, R.; AFSHARI, A.; AMIRGHOFRAH, Z.; REFIEIAN-KOPAEI, M.; YOUSOFI, D. H.; et al. Evaluation of in vivo immune response activity and *in vitro* anti-cancer effect by *Scrophularia megalantha*. **J Med Plants Res**, v. 5, n. 11, p. 2365-8, 2011.

BABAN, D.; SEYMOUR, L.W. Control of tumor vascular permeability. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 34, p. 109–119, 1998.

BANG, J. S.; OH, D. H.; CHOI, H. M.; SUR, B. J.; LIM, S. J.; KIM, J. Y.; et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of piperine in human interleukin-1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. **Arthritis Res Ther**, v. 11, 2009.

BASTA, G.; SCHMIDT, A. M.; DE CATERINA, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovascular. Research**, v. 63, p. 582–592, 2004.

BERGERS, G.; HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of

tumorigenesis, **International Journal of Developmental Biology**, v. 42, p. 995-1002, 1998.

BERGERS, G.; HANAHAN, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 8, p. 592–603, 2008.

BERNE, R. M.; LEVY, M.N. Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 253 p, 2006.

BEZERRA, D. P., PESSOA, C., MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. A., ELMIRO, F. J., et al. Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from Piper species. *Z Naturforsch*, vol. 60, pp. 539-543, 2005.

BEZERRA, D. P. et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 39, n. 6, p. 801-807, 2006.

BEZERRA, D. P. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 156-163, 2008.

BHATTACHARY, S. A.; HALDAR, P. K. Trichosanthes dioica root extract induces tumor proliferation and attenuation of antioxidant system in albino mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 184–190, 2011.

BISTEAU, X.; CALDEZ, M. J.; KALDIS, P. The Complex Relationship between Liver Cancer and the Cell Cycle: A Story of Multiple Regulations. **Cancers**, v. 6, p. 79-111, 2014.

BITTENCOURT, P. L. Epidemiologia da hepatotoxicidade por drogas. **Rev. Suplemento Hepatotoxicidade**, v. 30, p. 14-16, 2011.

BOGO, D. Avaliação in vitro da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural. 2009. 67 f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso. 2009.

BONASSI, S.; EL-ZEIN, R.; BOLOGNESI, C. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk, evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, p. 93–100, 2011.

BRAHMANAIDU, P.; NEMANI, H.; MERIGA, B.; MEHAR, S. K.; POTANA, S.; RAMGOPALRAO, S. Mitigating efficacy of piperine in the physiological derangements of high fat diet induced obesity in Sprague Dawley rats. **Chem Biol Interact**, v. 25, p. 42-51, 2014.

BRANCO, A. C. S. C. Avaliação da toxicidade pré-clínica crônica de *Foeniculum vulgare* Mill. 2009. 136p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química E Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 1829, 2010.

BRENNER, B. M.; LEVINE, S. A. Brenner & Rector – The Kidney. 7. ed. Philadelphia: Sunders Company, 2004.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, 24–36, 2012.

BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. McGraw Hill Brasil, 2012.

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther.**, v.106, n.1, p.109-178, 2005.

CALIXTO, J.B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther.**, v.106, n.1, p.109-178, 2005.

CARDOSO, J. F. R. et al. Avaliação do efeito tóxico da Piperina isolada da pimenta do reino (*Piper nigrum* L) em camundongos. **Rev. Univ. Rural**, v.25, n.1, p.85-91, 2005.

CARNEVALLIA, D. B.; DE ARAÚJO, A. P. S. Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. **Uniciências**, v. 17, n. 1, p. 41-46, 2013.

CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 1911-1922, 2014.

CHABNER, B.A; ROBERTS, J.G. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 5, p. 65-72, 2005.

CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells, p. 734-735, 1970.

CHEN, D.; FREZZA, M.; SCHMITT, S.; KANWAR, J.; DOU, Q. P. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 239–253, 2011.

CHEON, D.J., ORSULIC, S. Mouse models of cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 95–119, 2011.

CHITHRA, S.; JASIM, B.; SACHIDANANDAN, P.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E. K. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 4, p. 534-540, 2013.

CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G. K. Caspases—an update. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151, n. 1, p. 10-27, 2008.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; 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 Química**, v. 2 n.1, p.47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 232–244, 2004.

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.

CRAWFORD, Y., FERRARA, N. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. **Cell and Tissue Research**, v. 335, n. 1, p. 261–269, 2009.

CRISTINA, C.; LUQUE, G. M.; DEMARCHI, G.; LOPEZ VICCHI, F.; ZUBELDIA-BRENNER, L.; PEREZ MILLAN, M. I.; BECU-VILLALOBOS, D. et al. Angiogenesis in Pituitary Adenomas: Human Studies and New Mutant Mouse Models. **International journal of endocrinology**, v. 2014, 2014.

CRUZ, C. F.; DA CUNHA, G. O. D.; SOUZA, S. R. P. Custo do tratamento dos pacientes com insuficiência renal crônica em estágio terminal no município de São Paulo, no período de 2008 a 2012. **Science in Health**, v. 5, n.1, p. 6-11, 2014.

CURY, J. L.; BRUNETTO, A. F.; AYDOS, R. D. Negative effects of chronic kidney failure on lung function and functional capacity. **Rev Bras Fisioter**, v. 14, n. 2, p. 91-8, 2010.

DARZYNKIEWICZ, S.; DEL BINO, B. G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 795-808, 1992.

DE VRIES, C.; JAIME, A. E. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, v. 255, n. 5047, p. 989, 1992.

DIGNANI, D. F. *Peperomia blanda* (piperaceae): avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante. 2009.

DOGRA, R.K.; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, v.196, p. 229-236, 2004.

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.

DOMINIETTO, M.; TSINOREMAS, N.; CAPOBIANCO, E. Integrative analysis of cancer imaging readouts by networks, **Molecular oncology**, p.1-16, 2014.

DOUCETTE, C. D.; HILCHIE, A. L.; LIWSKI, R.; HOSKIN, D. W. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 231–239, 2013.

DUH, C. Y.; WU, Y. C.; WANG, S. K. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. **J Nat Prod**, v. 53, p. 1575-1577, 1990.

DUNCAN, J. S.; TUROWEC, J. P.; VILK, G.; LI, S. S. C.; GLOOR, G. B.; LITCHFIELD, D. W. Regulation of cell proliferation and survival: Convergence of protein kinases and caspases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, p. 505–510, 2010.

EATON, D. L.; GILBERT S. G. Principles of toxicology. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons**, 7.ed. New York: MacGraw-Hill, cap. 2, p. 11-43, 2008.

EBOS, J. M.; LEE, C. R.; KERBEL, R. S. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. **Clin Cancer Res.**, v. 15, p. 5020–5025, 2009.

EIFERT, C.; POWERS, R. From cancer genomes to oncogenic drivers, tumour dependencies and therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 8, p. 572-578, 2012.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

ELMASRI, H.; GHELFI, E.; YU, C. W.; TRAPHAGEN, S.; et al. Endothelial cell-fatty acid binding protein 4 promotes angiogenesis: role of stem cell factor/c-kit pathway. **Angiogenesis**, v. 15, n. 3, p. 457-468, 2012.

EL-SAYYAD, H. I. et al. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. **International Journal Biological Sciences**, v. 5, p. 466-473, 2009.

ESPÍRITO SANTO, E. A. R. **Reações adversas ao tratamento com 5-fluoracil em pacientes portadores de câncer colorretal. 2003. Dissertação (Mestrado) Linha de pesquisa: Farmacovigilância.** Curso de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal de Mato Grosso , Mato Grosso, 2003.

EVANS, G. O. Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers. 1 ed. Flórida: CRC Press, 2008.

EZHEVSKY, S. A.; NAGAHARA, H.; VOCERO-AKBANI, A. M.; GIUS, D. R.; WEI, M. C.; DOWDY, S. F. Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D: Cdk4/6 complexes results in active pRb. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 10699–10704, 1997.

FACTORI, R. A.; LELES, S. M. A; NOVAKOWSKI, G. C. B. C.; ROCHA, C. L. S. C.A A.; THOMAZ, S. M. Toxicity and genotoxicity of water and sediment from streams on dotted duckweed (*Landoltia punctata*). **Braz. J. Biol.**, v. 74, n. 4, p. 769-778, 2014.

FAN, T. P.; YEH, J. C.; LEUNG, K. W.; YUE, P. Y.; WONG, R. N. Angiogenesis: from plants to blood vessels. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 27, p. 297-309, 2006.

FASTAIA, J.; DUMONT, A. Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis. **J Natl Cancer Inst.**, v. 56, 547-549, 1976.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 125–32, 1990.

FENECH, M. et al. The Human MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, p. 271-283, 1999.

FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95. 2000.

FERIGOLO, P. C.; SAGRILLO, M. R. GENOTOXICIDADE RELACIONADA AO CONSUMO DE CHIMARRÃO. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde*, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2013.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS C.; et al. GLOBOCAN 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer 766 Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. c2013 [cited 2013 Oct 17]. globocan.iarc.fr.2013.

FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo Celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **Journal Health Science Institute**, v. 30, n. 2, p.107- 111, 2012.

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. 5, 2014.

FOLKMAN, J.; COTRAN, R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. **Int Rev Exp Pathol.**, v. 16, p. 207-48, 1976.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J Biol Chem.**, v. 267, p. 10931-10934, 1992.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Semin. Oncol.**, v. 29, n. 6, p. 15–18, 2007.

FÖLLER, M.; HARRIS, I. S.; ELIA, A.; JOHN, R.; LANG, F.; KAVANAGH, T. J.; MAK, T. W. Functional significance of glutamate-cysteine ligase modifier for erythrocyte survival *in vitro* and *in vivo*. **Cell Death & Differ.**, v. 20, n. 10, p. 1350-1358, 2013.

FONSECA, J. C. F. D. O fígado e suas doenças: o que você precisa saber. Manaus, BR, 2009. Disponível em: < <http://drjcfonsecaeofigado.blogspot.com/2009/03/o-figado-e-as-transaminases.html> >. Acesso em: 31 de janeiro de 2015.

FOUCHE, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J., *In vitro* anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, pp. 455–461, 2008.

FURGASON, J. M.; BAHASSI, E. M. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 137, p. 298–308, 2013.

GAD, S. C. **Animal Models in Toxicology**. 2 ed. Flórida: CRC Press, 2007

GAO, Y.; CHEN, K.; MA, J.; GAO, F. Cerium oxide nanoparticles in cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 7, p. 835-840, 2014.

GEORGAKI, S.; SKOPELITI, M.; TSIATAS, M.; et al. Phenoxodiol, an anticancer isoflavene, induces immunomodulatory effects *in vitro* and *in vivo*. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 9, p. 3929-3938, 2009.

GERMANAS, J.; PANDAYA, A. G. Alkylating agentes. *Dermatologic Therapy*, **Copenhagen**, v. 15, p. 317 – 324, 2002.

GIANSANTI, V.; TORRIGLIA, A; SCOVASSI, A. Ivana. Conversation between apoptosis and autophagy: “Is it your turn or mine?”. **Apoptosis**, v. 16, n. 4, p. 321-333, 2011.

GIBELLINI, L.; PINTI, M.; NASI, M.; MONTAGNA, J. P.; DE BIASI, S.; ROAT, E.; BERTONCELLI, L.; COOPER, E. L.; COSSARIZZA, A. Quercetin and cancer chemoprevention, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

GIRAUDO, E.; PRIMO, L.; AUDERO, E.; GERBER, H-P.; KOOLWIJK, P.; SOKER, S.; et al. Tumor necrosis factor-α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. **JBC.**, v. 273, p. 22128-22125, 1998.

GIULIANO, S.; PAGÈS, G. Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. **Biochimie**, p. 1-10, 2013.

GOPINATHAN, L.; RATNACARAM, C. K.; KALDIS, P. Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. **Results Probl. Cell Differ.**, v. 53, p. 365–389, 2011.

GOTINK, K. J.; VERHEUL, H. M. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? **Angiogenesis**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2010.

GREENSHIELDS, A. L.; DOUCETTE, C. D.; SUTTON, K. M.; MADERA, L.; ANNAN, H.; YAFFE, P. B.; KNICKLE, A. F.; DONG, Z.; HOSKIN, D. W. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 357, n.1, p. 129-140, 2014.

GRIFFIOEN, A. W., MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmacol Rev.** Vol. 52, pp.237-268, 2000.

GRIFFIOEN, A. W.; THIJSSSEN, V. L. Galectins in tumor angiogenesis. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 9, 2014.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GROSS, P.; WEHRLE, R.; BUSSEMAKER, R. Hyponatremia: Pathophysiology, differential diagnosis and new aspects of treatment. **Clinical Nephrology**, v. 46, p. 273-276, 1996.

GUERRA, J. L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do Tumor de Ehrlich**. São Paulo. Tese de Doutorado- FMVZ da Universidade de São Paulo. 1983.

GULLEY, J.; ARLEN, P.; HODGE, J.; et al. **Vaccines and Immunostimulants**. In: Kufe D, ed. Holland-Frei Cancer Medicine. Eighth ed. Shelton, 2010

GUPTA, K.; ZHANG, J. Angiogenesis: a curse or cure? **Postgrad Med J.**, v. 81, p.236-42, 2005.

GUTIERREZ, R. M. P.; GONZALEZ, A. M. N.; HOYO-VADILLO, C. Alkaloids from Piper: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 13, pp. 163-193, 2013.

HADNAGY, W.; MARSETZ, B.; IDEL, H. Hemolytic activity of crystalline silica – Separated erythrocytes versus whole blood. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 206, n. 2, pp. 103-107, 2003.

HAGIO, S.; FURUKAWA, S.; ABE, M.; KURODA, Y.; HAYASHI, S.; OGAWA, I. Repeated dose liver micronucleus assay using adult mice with multiple genotoxicity assays concurrently performed as a combination test. **J Toxicol Sci.**, v. 39, n. 3, p. 437-445, 2014.

HAN, H. Y., KIM, H., SON, Y. H., LEE, G., JEONG, S. H., RYU, M. H. Anti-cancer effects of Kochia scoparia fruit in human breast cancer cells. **Pharmacognosy magazine**. v. 10, n. Suppl 3, p. S661, 2014.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor 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.

HANSAKUL, P.; AREE, K.; TANOCHI, S. et al. Growth arrest and apoptosis via caspase activation of dioscoreanone in human non-small-cell lung cancer A549. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 413, 2014.

HARTWELL, L.; WEINERT, T. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629–634, 1989.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HAYASHI, M. et al. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation Research**, v. 627, p. 10-30, 2007.

HENLEY, S. A.; DICK, F. A. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. **Cell Div.**, v. 7, n. 10, 2012.

HENRY, J. B. Diagnóstico clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. Barueri: Manole, 2008.

HINTZSCHE, H.; RIESE, T.; STOPPER, H. Hyperthermia-induced micronucleus formation in a human keratinocyte cell line. **Mutat Res.**, p. 71-74, 2012.

HIRSCHI, A.; CECCHINI, M.; STEINHARDT, R. C.; SCHAMBER, M. R.; DICK, F.A.; RUBIN, S.M. An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 17, p. 1051-1057, 2010.

HOFMANN, J. Resistance to chemotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 8, pp. 1368, 2008.

HOPPE, C, et al. Use of hydroxyurea in children aged 2 to 5 years with sickle cell disease. **J Pediatr Hemat Oncol**, v. 22, p. 330-334, 2000.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; E ALMEIDA. W. P. Glicoproteína-p, resistência a múltiplas drogas (mdr) e relação estrutura-atividade de moduladores. 2010.

ILYIN, G. P.; GLAISE, D.; GILOT, D.; BAFFET, G.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Regulation and role of p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors during hepatocyte differentiation and growth. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 285, p. G115–G127, 2003.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2013: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

ISHIKAWA, H., COLBY, D. A., SETO, S., VA, P., TAM, A., KAKEI, H., RAYL, T. J., HWANG, I., BOGER, D. L. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 4904, 2009.

IWASHITA, M.; SAITO, M.; YAMAGUCHI, Y.; TAKAGAKI, R.; NAKAHATA, N. Inhibitory Effect of Ethanol Extract of *Piper longum* on Rabbit Platelet Aggregation through Antagonizing Thromboxane A2 Receptor. **Biol Pharm Bull.**, v. 30, n. 7, 1221-1225, 2007.

JAIN, R. K. A New Target for Tumor Therapy. **The new england journal of medicine**, v. 25, p. 2667-2671, 2009.

JAITAK V. Drug target strategies in breast cancer treatment: recent developments. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 7, 2014.

JENA, J. A. Study on Natural Anticancer Plants, **Int J Pharmaceut Chem Sci**, v. 1, n.1, p. 365–368, 2012.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs, **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 253, 2004.

JORGE, S. G. Exames laboratoriais. Hepcentro, 2006. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>>.

JOSHI, S.; KAUR, S.; REDIG, A. J.; et al. Type I interferon (IFN)-dependent activation of Mnk1 and its role in the generation of growth inhibitory responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 106, n. 29, p. 12097-12102, 2009.

JÚNIOR, V. F. O.; RAJÃO, A. L.; FERNANDES, M. B. S.; OLIVEIRA, E.; SANTOS, M. M.; GUIMARÃES, P. D. F. Influência dos Anestésicos locais na imunomodulação e recorrência do câncer: uma revisão de literatura, **Research**, v. 1, p. 573, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KANG, C.; MUNAWIR, A.; CHA, M.; SOHN, E-T; LEE, H.; KIM, J. S.; YOON, W. D.; LIM, D.; KIM, E. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. **Comparative Biochemical and Physiology**, v. 150, p. 85-90, 2009.

KANTOFF, P. W.; HIGANO, C. S.; SHORE, N. D.; et al, Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer, **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 5, p. 411–422, 2010.

KAPOOR, S. Combretastatin A4 and its emerging antineoplastic effects. **Surgery**, v. 153, n. 6, p. 881, 2013.

KHAN, M.; SIDDIQUI, M. Antimicrobial activity of fruits of *Piper longum*. **Nat prod Rad.**, v. 6, p. 111-113, 2007.

KHATIK, R.; DWIVEDI, P.; SHUKLA, A.; SRIVASTAVA, P.; RATH, S. K.; PALIWAL, S. K.; DWIVEDI, A. K. Development, characterization and toxicological evaluations of phospholipids complexes of curcumin for effective drug delivery in cancer chemotherapy. **Research Article**, 2014.

KIM, J. A.; ÅBERG, C.; SALVATI, A.; DAWSON, K. A. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. **Nature Nanotechnology**, v. 7, p. 62-68, 2011.

KINGHORN, A. D.; BLANCO, E. J. C.; CHAI, H. B.; ORJALA, J.; FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D.; OBERLIES, N. H.; WANI, M. C.; KROLL, D. J.; PEARCE, C. J.; SWANSON, S. M.; KRAMER, R. A.; ROSE, W. C.; FAIRCHILD, C. R.; VITE, G. D.; EMANUEL, S.; DAVID JARJOURA, D.; COPE, F. O. Discovery of anticancer agents of diverse natural origin. **Pure and Applied Chemistry**, v. 81 n. 6, p. 1051-1063, 2009.

KODAMA, T.; SENDO, F.; KOBAYASHI, H. Leukemoid reaction in BALB/c mice bearing transplanted tumors. **Cancer Research**, v. 34, p. 176–180, 1974.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KRETTLI, A. U.; ADEBAYO, J. O.; KRETTLI, L. G. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at New antimalarials. **Curr Drug Targ.**, v.10, p. 261–270, 2009.

KULSHRESTA, V. K.; SINGH, N.; SHRIVASTAVA, R. K.; KOHLI, R. P.; RASTOGI, S. K. A study of central stimulant activity of *Piper longum*. **J Res Indian Med.**, v. 6, n. 1, p. 17-19, 1971.

LAI, L. H.; FU, Q. H.; LIU, Y.; JIANG, K.; 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 Pharmacol Sin.**, v. 33, n. 4, p. 523-530, 2012.

LARINI, L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, p. 31, 1999.

LAWRENCE, T. S.; TEM, H. R. K.; GIACCIA, A. Principles of Radiation Oncology. In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2008.

LEAL, J. H. S.; CUBERO, D.; DEL GIGLIO, A.; Palliative hormonal therapy for breast cancer: a practical review literature; **Revista Brasileira de Clínica Médica**. v. 8, n. 4, p.338-43, 2010.

LEE, S.; PARK, B.; KIM, M.; CHOI, W.; KIM, H.; CHO, K.; LEE, S.; HOI-SEON. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from fruits of long

pepper, *Piper longum*, against phytopathogenic fungi. **Crop Prot.**, v. 20, n. 6, p. 523-528, 2001.

LEITE, C. A. V. G.; COSTA, J. V. G.; CALLADO, R. B.; TORRES, J. N. L.; JÚNIOR, R. C. P. L.; RIBEIRO, R. A. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 29, 2012.

LEXIS, L. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S. α -Tocopherol and α -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine A-treated rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 68-73, 2006.

LI, Y.; LIU, S.; MARGOLIN, K.; et al. Summary of the primer on tumor immunology and the biological therapy of cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 11, 2009.

LIN, Y., XU, J., LIAO, H., LI, L., PAN, L. Piperine induces apoptosis of lung cancer A549 cells via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. **Tumour Biol.**, vol. 35, n. 4, p. 3305-3310, 2014.

LINS, K. O. A. L. et al. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 20-26, 2009.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A. Simplified method of evaluations dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 96, p. 99-113, 1949.

LIU, Y-Q.; MU, Z-Q.; YOU, S.; TASHIRO, S-I.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Fas/FasL Signaling Allows Extracellular-Signal Regulated Kinase to Regulate Cytochrome c Release in Oridonin-Induced Apoptotic U937 Cells. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1873- 1879, 2006.

LIU, Z.; FAN, F.; WANG, A.; ZHENG, S.; LU, Y. Dll4-Notch signaling in regulation of tumor angiogenesis. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 140, n. 4, p. 525-536, 2014.

LOHR, L. Chemotherapy-induced nausea and vomiting. **Cancer J**, v. 14, n. 2, p. 85-93, 2008.

LONGATO, G. B.; RIZZO, L. Y.; SOUSA, I. M. de O.; TINTI, S. V.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA G. M.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of extracts, fractions, and eupomatenoid-5 obtained from *Piper regnellii* leaves. **Planta Medica**, v. 77, n. 13, p. 1482-1488, 2011.

MCCARRON, P. A., OLWILL, S. A., MAROUF, W. M., BUICK, R. J., WALKER, B., SCOTT, C. J., Antibody conjugates and therapeutic strategies. **Molecular Interventions**, v. 5, p. 368-80, 2005.

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

MADHUSUDAN, P.; VANDANA, K. L. Tetrahydropiperine, the first natural aryl pentanamide from *Piper longum*. **Biochem Systm Eco.**, v. 29, n.5, p. 537-539, 2001.

MADHUSUDAN, S.; HARRIS, A. L. Drug inhibition of angiogenesis. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 2, p. 403-14, 2002.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 41, p. 189–207, 2001.

MAGALHÃES, H. I. F. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of (4-methoxyphenyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl) methanone. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 45-52, 2010.

MAGALHÃES, H. I.; FERREIRA, P. M.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 407-416, 2010.

MAHMOOD, A. A.; MARIOD, A. A.; AL-BAYATY, F.; ABDEL-WAHAB, S. I. Anti-ulcerogenic activity of *Gynura procumbens* leaf extract against experimentally-induced gastric lesions in rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 48, n. 8, p. 685–691, 2010.

MALKANTHI, E.; PATERSON, E.; BARNES, D. M. An open label pilot study to evaluate the efficacy of Spanish black radish on the induction of phase I and phase II enzymes in healthy male subjects. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, p.475, 2014.

MALONEY, D. G.; GRILLO-LOPEZ, A. J.; WHITE, C. A.; et al. IDEC-C2B8 (rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, v. 90, n. 6, p. 2188–2195, 1997.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.

MARCHETTI, G. M. **Atividade Anticâncer do extrato bruto e das frações das folhas de *Calea pinnatifida* Banks.** 2008. 113f. Dissertação de Mestrado, Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

MARTINS, I.; ROSA, H. V. D. Considerações toxicológicas da exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos. **Rev. Bras. Med. Trab.**, Belo Horizonte. v. 2, n 2, p. 118-125, 2004.

MASLOVSKY I. Extravasation injury as a result of VAD chemotherapy. **J Wound Ostomy Continence Nurs**, v. 34, p. 297-298, 2007.

MATSUZAKI, P. Avaliação dos efeitos do extrato etanólico, resíduo butanólico e resíduo aquoso de *Pfaffia paniculata* sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em suas formas ascítica e sólida. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2004.

MATTOS, A. A., DANTAS-CORRÊA, E. B., Tratado de hepatologia. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

MCDERMOTT, D. F.; GHEBREMICHAEL, M. S; SIGNORETTI, S.; MARGOLIN, K. A.; CLARK, J.; SOSMAN; J. A.; DUTCHER, J. P.; LOGAN, T.; FIGLIN, R. A.; ATKINS, M. B. The high-dose aldesleukin (HD IL-2) "SELECT" trial in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 15, 2010.

MCGOWAN, D. Chemotherapy-induced oral dysfunction: a literature review. **Br J Nurs**, v. 17, p. 1422-1426, 2008.

MEDEIROS, J. S. et al. Ensaios toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*), como alimento com propriedade de saúde. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2, 2009.

MEDINGERA, M.; PASSWEG, J. Role of tumour angiogenesis in haematological malignancies. **Swiss Medical Weekly**., v. 144, p.1-12, 2014.

MEGAN, M.C.; RICHARD, J.Y. Mitochondrial Dynamics and Apoptosis. **Dynamics and Neurodegeneration**, p. 109-138, 2011.

MEGHWAL, M.; GOSWAMI, T. K. Piper nigrum and piperine: an update. **Phytother. Res**, v. 27, p. 1121–1130, 2013.

MELO-DINIZ, M.F.F. 2000. Estudos de toxicidade pré-clínica de extratos de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eich. 147 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba, 2000.

MELO, P. S.; JUSTO, G. Z.; DURAN, N.; HAUN, M. Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, p. 47– 54, 2004.

MENG, L. H.; ZHANG, J. S.; DING, J. Salvicine, a novel DNA topoisomerase II inhibitor, exerting its effects by trapping enzyme-DNA cleavage complexes, **Biochemistry Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 733-741, 2001.

MILLAUER, B.; LONGHI, M. P.; PLATE, K. H.; et al. Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. **Cancer research**, v. 56, n. 7, p. 1615-1620, 1996.

MILENIC, D. E.; BRADY, E. D.; BRECHBIEL, M. W. Antibody-targeted radiation cancer therapy. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 3, n. 6, p. 488–499, 2004.

MIN, K. R.; KIM, K.; RO, J. S.; LEE, S. H.; KIM, J. A.; SON, J. K.; KIM, Y.; Piperlonguminine from *Piper longum* with Inhibitory Effects on Alpha-Melanocyte-Stimulating hormone-induced melanogenesis in melanoma B16 Cells, Thieme-connect. **Planta Med.**, v. 70, n.12, p. 1115- 1118, 2004.

MOHAMMED, T.; ERKO, B.; GIDAY, M. Evaluation of antimalarial activity of leaves of *Acokanthera schimperi* and *Croton macrostachyus* against *Plasmodium berghei* in Swiss albino mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 314, p. 1-10, 2014.

MONTALEMBERT, M., DAVIS, S. C. Is hydroxyurea leukemogenic in children with sickle cell disease? **Blood**, v. 98, n. 9, 2878-2879, 2001.

MONTENEGRO, R. C. et al. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 454-457, 2008.

MOSERLE, L., AMADORI, A., INDRACCOLO, S. The angiogenic switch: implications in the regulation of tumor dormancy. **Current molecular medicine**, Vol. 9, p. 935–941, 2009.

MUKHERJEE, A. K.; BASU, S.; SARKAR, N.; GHOSH, A. C. Advances in cancer therapy with plant based natural products. **Curr Med Chem.**, v. 8, n. 12, p. 1467-1486, 2001.

MUNARON, L. Systems biology of ion channels and transporters in tumor angiogenesis: An omics view. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 2014.

NASCIMENTO, F. R. F.; CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P. S.; BARROQUEIRO, S. B.; GUERRA, R. N. M. Ascitic and Solid Tumor Inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. **Life Sciences**, v.78, p. 2650-2653, 2006.

NAVEEN, K. D. R.; CIJO, G. V.; SURESH, P. K.; ASHOK, K. R. Cytotoxicity, apoptosis induction and anti-metastatic potential of *Oroxylum indicum* in human breast cancer cells. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v. 13, n. 6, p. 2729-34, 2012.

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. Diferenciação celular: Importância na hepatocarcinogênese e papel modulador do β -caroteno. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, n. 4, p. 389-399, 2000.

NEPOMUCENO, J. C.; SILVA, A. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 7, n. 1, p. 167-179, 2010.

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacol Res.**, v. 59, n. 6, p. 365-378, 2009.

NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; VAN DER WILT, C. L.; VAN GROENINGEN, C. J.; SMID, K.; MEIJER, S.; PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of Oncology**, v. 15, p. 1025–1032, 2004.

OECD. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Guideline for testing of chemicals n. 474, 1997.

OECD. Test No 423: Acute oral toxicity – acute toxic class method, 2001.

OLIVEIRA L. P.; PINHEIRO, R. C.; VIEIRA M. S.; PAULA J. R.; BARA M. T.; VALADARES, M. C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., *Punicaceae* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 201-207, 2010.

ORTEGA, S.; MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1602, n. 1, p. 73-87, 2002.

ØSTERGAARD, L.; TIETZE, A.; NIELSEN, T.; DRASBEK, K. R.; MOURIDSEN, K.; JESPERSEN, S. N.; HORSMAN, M. R. The Relationship between Tumor Blood Flow, Angiogenesis, Tumor Hypoxia, and Aerobic Glycolysis. **Cancer Research**, v. 73, n. 18, p. 5618-5624, 2013.

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

PAL, S. K.; SHUKLA, Y. Herbal medicine: current status and the future. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v.4, n. 4, p. 281-288, 2003.

PALERMO-NETO, J.; FONSECA, E.S.M.; QUINTEIRO-FILHO, W.M.; CORREIA, C.S.C.; SAKAI, M. Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. **Physiology & Behavior**, v. 95, p. 435–440, 2008.

PARDEE, A. B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, p. 1286-1290, 1974.

PARSAEE, H.; ASILI, J.; MOUSAVI, S. H.; SOOFI, H.; EMAMI, S. A.; TAYARANI-NAJARAN, Z. Apoptosis Induction of Salvia chorassanica Root Extract on Human Cervical Cancer Cell Line. **Iran J Pharm Res.** v. 12, n.1, p. 75–83, 2013.

PATHAK, N.; KHANDELWAL, S. Modulation of cadmium induced alterations in murine thymocytes by piperine: Oxidative stress, apoptosis, phenotyping and blastogenesis. **Biochem Pharmacol.**, v. 72, n. 4, p. 486-497, 2006.

PAVELIC, J. Combined Cancer Therapy, **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 42, 2014.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THIER, K.; FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; DORTA, J.; DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 65, n. 9, p. 1451-1461, 2003.

PENNARUN, B.; MEIJER, A.; de VRIES, E. G.; et al. Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1805, n. 2, p. 123-140, 2010.

PENG, S. Y.; CHOU, S. P.; HSU, H. C. Association of downregulation of cyclin D1 and of overexpression of cyclin E with p53 mutation, high tumor grade and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.**, v. 29, p. 281-289, 1998.

PEREIRA, J V. Bioquímica clínica. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 1998.

PETERS, G. J.; KÖHNE, C. H. Fluoropyrimidines as antifolate drugs. In: JACKMAN, J. L. (ed.): Antifolate Drugs in Cancer Therapy. Totowa, NJ: Humana Press; 101-145, 1999.

PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Nephrotoxicity testing in vitro – what we know and what we need to know. **Environment Health Perspectives**, v. 106, p. 559-568, 1998.

PISSINATE, Kenia. **Atividade citotóxica de Piper nigrum e Struthanthus marginatus. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos**. 2006. Tese de Doutorado. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PITA, J. C. L. R., XAVIER, A. L., SOUSA, T. K. G. D., MANGUEIRA, V. M., TAVARES, J. F., JÚNIOR, R. J. D. O., Castello-Branco, M. V. S. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of trachylobane-360, a diterpene from *Xylopija langsdorffiana*. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9573-9589, 2012.

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

PORTUGAL, L. M. Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas René Rachou. 2012.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, v. 146, p. 873-87, 2011.

PRACCHIA, L. F., LINARDI, C. C. G., BUCCHERI, V. Gemcitabina e Ifosfamida no tratamento do linfoma de Hodgkin refratário ou recidivado após múltiplas terapias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 29, n. 4, p. 416-24, 2007.

PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. **Int Immunopharmacol**, v. 4, p. 1795-1803, 2004.

PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. **Clin Exp Metastasis**, v. 19, p. 703-708, 2002.

PRADOS, J.; MELGUIZO, C.; ORTIZ, R.; VÉLEZ, C.; ALVAREZ, P. J.; ARIAS, J. L.; RUÍZ, M. A.; GALLARDO, V.; ARANEGA, A. Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: New Advances in Breast Cancer Therapy, **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1058-1070, 2012.

PUJOL, M. J.; JAIME, M.; SERRATOSA, J.; JAUMOT, M.; AGELL, N.; BACHS, O. Differential association of p21Cip1 and p27Kip1 with cyclin E-CDK2 during rat liver regeneration. **J. Hepatol.**, v. 33, p. 266–274, 2000.

QI, F.; LI, A.; INAGAKI, Y.; GAO, J.; LI, J.; KOKUDO, N.; et al. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo- or radio-therapy for cancer. **Biosci Trends**, v. 4, n. 6, p. 297-307, 2010.

QIAO, L.; WONG, B. C. Role of Notch signaling in colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 30, p. 1979–1986, 2009.

REAL, P. J.; FERRANDO, A. A. NOTCH inhibition and glucocorticoid therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 23, p. 1374–1377, 2009.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.

RIBATTI, D.; NICO, B.; CRIVELLATO, E.; ROCCARO, A. M.; VACCA, A. The history of the angiogenic switch concept. **Leukemia**, v. 21, p. 44–52, 2007.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SALVADOR, M. J. Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 974-977, 2012.

ROOS, W. P.; BATISTA, L.F.; NAUMANN, S.C.; WICK, W.; WELLER, M.; MENCK, C.F.; KAINA, B. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O(6)-methylguanine. **Oncogene**, p. 186–197, 2007.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. **Cancer Letters**, v. 332, p. 237–248, 2013.

ROQUE, V. M. N.; FORONES, N. M. Avaliação da qualidade de vida e toxicidades em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia adjuvante baseada em fluoropirimidinas. **Arg. Gastroenterol.** vol. 43, n.2, pp. 94-101, 2006.

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

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discov Today**, v. 13, n.3-4, p. 161-71, 2008.

SANDY, A. R.; MAILLARD, I. Notch signaling in the hematopoietic system. **Expert Opin Biol Ther**, v. 9, p. 1383–1398, 2009.

SANTOS-BERGAMI, P. C.; MARIO, M.; BARBUTO, A. J. M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sci.**, v. 75, p. 245-255, 2004.

SAUERLAND, C., ENGELKING, C., WICKHAM, R., CORBI, D. Vesicant extravasation part I: mechanisms, pathogenesis, and nursing care to reduce risk. **Oncol Nurs Forum**, v. 27, p. 1134-4146, 2006.

SCHEIN, C. F. et al. Efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes oncológicos hospitalizados. **Disc Scientia. Série: Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 101-107, 2006.

SCHLOM, J. Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 8, p. 599-613, 2012.

SCHWEITZER, J. K.; BURKE, E. E.; GOODSON, H. V.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Endocytosis resumes during late mitosis and is required for cytokinesis. **J. Biol. Chem.** V. 280, p. 41628–41635, 2005.

SEGURA, J.A. et al. Ehrlich ascites tumor unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunol. letters**, v. 74, p. 111-115, 2000.

SHANKARACHARYA, N. B.; RAO, L. J.; NAIK, J. P.; NAGALAKSHMI, S.; Characterization of chemical constituents of Indian Long Pepper, **J Food Sci Tech.**, v. 34, n. 1, 73-75, 1997.

SHARMA, A. K.; SINGH, R. H. Screening of antiinflammatry of certain indigenous drugs on carrageen induced hind paw edema in rats. **Bull Med Ethanobot Res**, v. 2, p. 262-264, 1980.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 239-243, 2001.

SHARON, A.; CENTER, D. M. V. Avaliação bioquímica da função hepática no cão e no gato. In: **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**, p.1166-1183, 1995.

SHOEB, M. Anticancer agents from medicinal plants. **Bangladesh J Pharmacol.**, v.1, p. 35-41, 2006.

SIDDIQUI, F.; EHRHART, E. J.; CHARLES, B.; CHUBB, L.; LI, C. Y.; ZHANG, X.; et al. Anti-angiogenic effects of interleukin-12 delivered by a novel hyperthermia induced gene construct. **Int J Hyperthermia**, v. 22, n. 587-596, 2006.

SIEMS, W. G.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. **Clin Nephrol**, v. 53, n. 1 Suppl, S9–17, 2000.

SIGIURA, K. Tumor transplantation. In: Methods of animal experimentation. New York and London: W. I. **Gray, Academic Presse**, v. 2, p. 171-222, 1965.

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G. A.; CASSALI, G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 658-661, 2006.

SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, p.180-188, 2007.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SOMANATH, P. R.; RAZORENOVA, O. V.; CHEN, J.; BYZOVA, T. V. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. **Cell Cycle**, v. 5, p. 512–518, 2006.

SOUCEK, L.; LAWLOR, E. R.; SOTO, D.; et al. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. **Nature medicine**, v. 13, n. 10, p. 1211-1218, 2007.

SOUZA, W. A.; NEGRÃO, A. J. M.; FILHO, C. G.; FERREIRA, V. H.; LINO, R. S.; FREITAS, R. E.; BIAZOTTO, G.; PEREIRA, D. M. Toxicidade de antineoplásicos revisão bibliográfica. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, 2008.

STEGER, F.; HAUTMANN, M. G.; KOLBL, O. 5-FU-induced cardiac toxicity - an underestimated problem in radiooncology? **Radiation Oncology**, v. 7, p. 212, 2012.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J.M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO Journal**, v. 30, n. 18, p. 3667-83, 2011.

STRIETER, R. M.; BELPERIO, J. A.; BURDICK, M. D.; KEANE, M. P. CXC chemokines in angiogenesis relevant to chronic fibroproliferation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, p. 23–6, 2005.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 90, n. 2, p. 339-346, 2004.

SUROVA, O.; ZHIVOTOVSKY, B. Various modes of cell death induced by DNA damage. **Oncogene**, v. 32, n. 33, p. 3789-3797, 2013.

SUTLU, T.; ALICI, E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. **Journal of Internal Medicine**, v. 266, n. 2, p. 154-181, 2009

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. **Cancer Res**, v. 70, n.14, p. 5649-5669, 2010.

TAMBORENA, T.; PUNTEL, R. L.; BASTIANI, M.; GULARTE, C. A. O.; FOLMER, V. Avaliação das propriedades antioxidantes de extratos aquosos e etanólicos de *Uncaria tomentosa* em eritorocitos humanos *in vitro*. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 5, n. 2, 2013.

TASLEEM, F.; AZHAR, I.; ALI, S. N.; PERVEEN, S.; MAHMOOD, Z. A. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. Asian Pac. **J Trop Med.**, v.7 p. 461-468, 2014.

TAVAKOLI, J.; MIAR, S.; ZADEHZARE, M. M.; AKBARI, H. Evaluation of Effectiveness of Herbal Medication in Cancer Care: A Review Study. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 5, n. 3, p. 144-156, 2012.

THIEL, A.; BUSKENS, C.; WOEHRLE, T.; ETHEVE, S.; SCHOENMAKERS, A.; FEHR, M.; BEILSTEIN, P. *Black pepper* constituent piperine: Genotoxicity studies *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 350–357, 2014.

THORLEY, A.; TETLEY, T. D. New perspectives in nanomedicine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 140, p. 176-185, 2013.

TIRGAR, P. R.; SHAH, K. V.; THUMBER, B. L. Investigation into therapeutic role of triticum aestivum (wheat) grass in busulfan induce thrombocytopenia. **International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences**, v. 1, n. 1, p. 85, 2011.

TORTI, V. R.; COBB, A. J.; EVERITT, J. L.; MARSHALL, M. W.; BOORMAN, G. A.; BUTERWORTH, B. E. Nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by inhaled bromodichloromethane in wild-type and p53-heterozygous mice. **Toxicological Sciences**, v. 64, n. 2, p. 269, 2001.

TOURNAIRE, R.; SIMON, M. P.; LE, N. F.; et al. A short synthetic peptide inhibits signal transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor. **EMBO Rep.**, v. 5, p. 262-267, 2004.

TRIOZZI, P. L.; TUTHILL, R. J.; BORDEN, E. Re-inventing intratumoral immunotherapy for melanoma. **Immunotherapy**, v. 3, n. 5, p. 653-671, 2011.

UNNATI, S.; RIPAL, S.; SANJEEV, A.; NIYATI, A.; Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1, p. 16–23, 2013.

VAGUNDA, V. S.; MARDOVÁ, J.; VAGUNDOVÁ, M.; JANDÁKOVÁ, E.; ZALOUDÍK, J.; KOUKALOVÁ, H. Correlations of Breast Carcinoma Biomarkers and p53 Tested by FASAY and Immunohistochemistry. **Pathol. Res. Pract.**, v. 199, p. 795–801, 2003.

VASCONCELOS, T. H. C. et al. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 583-591, 2007.

VIEIRA, J.; MATSUZAKI, P.; NAGAMINE, M. K.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; GORNIK, S. L.; DAGLI, M. L. Z. Inhibition of Ascitic Ehrlich Tumor Cell Growth by Intraperitoneal Injection of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) Butanolic Residue. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 53, n. 3, p. 609-613, 2010.

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. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.6, p.1424-1430, 2010.

VIEIRA, P. M.; SANTOS, S.C; CHEN-CHEN, L. Assessment of mutagenicity and cytotoxicity of *Solanum paniculatum* L. extracts using *in vivo* micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 601-606, 2010.

VIJAY AVIN, B. R.; THIRUSANGU, P.; RANGANATHA, V. L.; FIRDOUSE, A.; PRABHAKAR, B.T.; KHANUM, S.A. Synthesis and tumor inhibitory activity of novel coumarin analogs targeting angiogenesis and apoptosis, **European Journal of Medicinal Chemistry**, V. 75, p. 211-221, 2014

VINAYAK, R.; PUTTANANJIAH, S.; CHATTERJI, A.; SALIMATH B. Anti-proliferative and angio-suppressive effect of *Stoechospermum Marginatum* (C. Agardh) Kutzinger extract using various experimental models. **Nutrition Research and Practice**, v.8, n. 4, p. 377-385, 2014.

VINCENT, P. C.; NICHOLLS, A. Comparison of the growth of the Ehrlich ascites tumor in male and female mice. **Cancer Research**, v. 27, p. 1058-1065, 1967.

WANG, H. M.; CHIU, C. C.; WU, P. F. et al. Subamolid E from *Cinnamomum subavenium* induces Sub-G1 cell-cycle arrest and caspase-dependent apoptosis and reduces the migration ability of human melanoma cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 8187-8192, 2011.

WANG, K.; SUN, S.; LI, L.; TU, M.; JIANG, H. Involvement of organic cation transporter 2 inhibition in potential mechanisms of antidepressant action. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 2014.

WANG, Z.; LI, Y.; BANERJEE, S.; SARKAR, F. H. Emerging role of Notch in stem cells and cancer. **Cancer Lett.**, v. 279, p. 8–12, 2009.

WANG, Z.; WANG, N.; CHEN, J.; SHEN, J. Emerging glycolysis targeting and drug discovery from chinese medicine in cancer therapy. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 1-13, 2012.

WASHBAU, R. J.; CHANDLERS, M. L., STEINER, J. M., SYRING, R. J., TWEDT, D. C., WAHSBAU, R. J., WILLARD, M. D. CHAPTER 61—Liver In Canine and Feline. **Gastroenterology**. p. 849–957, 2013.

WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer**. New York: Garland Science, 2014.

WEISS, B.; SHANNON, K. Mouse cancer models as a platform for performing preclinical therapeutic trials. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.13, p. 84-89, 2003.

WHEAT, J.; CURRIE, G. Herbal medicine for cancer patients: An evidence based review. **Int J Altern Med.**, v. 5, n. 2, 2008.

WLODKOWIC, D.; TELFORD, W.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods in cell biology**, v. 103, p. 55, 2011.

World Health Organization (WHO) (2010), Câncer, Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> (Acessado em 20 dezembro 2014).

WU, D. C.; LIU, J. M.; CHEN, Y. M.; YANG, S.; LIU, S. M.; CHEN, L. T.; WHANG-PENG, J. Mitomycin-C induced hemolytic uremic syndrome: a case report and literature review. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 27, n. 2, p. 115-118, 1997.

WU, T. T.; ZHOU, S. H. Nanoparticle-Based Targeted Therapeutics in Head-And-Neck Cancer. **International Journal of Medical Sciences**, v.12, n. 2, p. 187, 2015.

XAVIER, B., CALDEZ, M. J., KALDIS, P. The Complex Relationship between Liver Cancer and the Cell Cycle: A Story of Multiple Regulations. **Cancers**, v. 6, p. 79-111, 2014.

XIA, W.; LAU, Y. K.; ZHANG, H. Z.; et al. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. **Clin Cancer Res.**, v. 5, n. 12, p. 4164–4174, 1999.

XIAO, X. Y.; HAO, M.; YANG, X. Y.; BA, Q.; LI, M.; NI, S. J.; WANG, L. S.; DU, X. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. **Cancer Letters**, v. 302, p. 69–75, 2011.

YAFFE, P. B.; DOUCETTE, C. D.; WALSH, M.; HOSKIN, D. W. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 94, p. 109–114, 2013.

YAFFE, P. B.; POWER COOMBS, M. R.; DOUCETTE, C. D.; WALSH, M.; HOSKIN, D. W. Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. **Mol Carcinog**, 2014.

YANG, G.; LI, X.; LI, X.; LI, X.; WANG, L.; LI, J.; SONG, X.; CHEN, J.; GUO, Y.; SUN, X.; WANG, S.; ZHANG, Z.; ZHOU, X.; LIU, J. Traditional chinese medicine in cancer care: a review of case series published in the chinese literature, **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

YANG, H.; CHEN, C.; CHANG, W.; LU, F.; LAI, Y.; CHEN, C.; HSEU, T.; KUO, C.; HSEU, Y. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by Antrodia camphorate. **Cancer Letters**, v. 231, n. 2, p. 215-227, 2006.

YANG, J-H.; HU, J.; WAN, L.; CHEN, L-J. Barbigerone Inhibits Tumor Angiogenesis, Growth and Metastasis in Melanoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p. 167-174, 2014.

YE, X., FRANCO, A. A., SANTOS, H., NELSON, D. M., KAUFMAN, P. D., ADAMS, P. D. Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. **Mol. Cell**, vol. 11, n. 2, p. 341-351, 2003.

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. **Cell Immunol.**, v. 285, n.1-2, p. 49-54, 2013.

YOUNG, J. S.; SIMMONS, J. W. Chemotherapeutic Medications and Their Emergent Complications. **Emerg Med Clin N Am**, v.32, p. 563–578, 2014.

YU, F.; YU, F.; MCGUIRE, P. M.; LI, R.; WANG, R. Effects of Hydrocotyle sibthorpioides extract on transplanted tumors and immune function in mice. **Phytomedicine**, v. 14, p. 166-71, 2007.

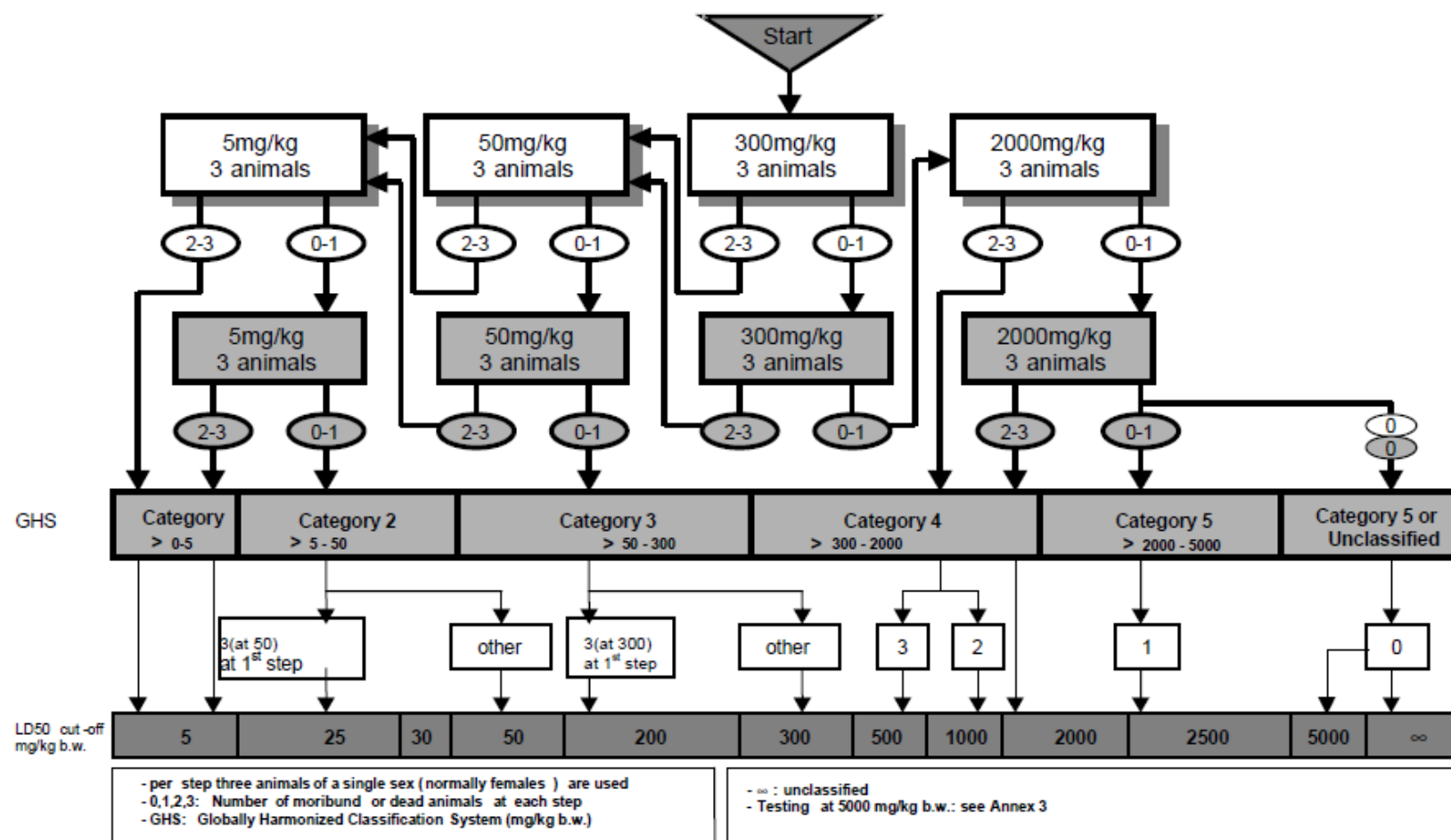
ZAVERI, M.; KHANDHAR, A.; PATEL, S.; PATEL, A. chemistry and pharmacology of *Piper longum* L. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 5, p. 67-76, 2010.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiology Science**, v. 19, p.124-28, 2004.

ZHANG, D.; LI, B.; SHI, J.; et al Suppression of Tumor Growth and Metastasis by Simultaneously Blocking Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). -A and VEGF-C with a Receptor-Immunoglobulin Fusion Protein. **Cancer Res.**, v. 70, p. 2495-503, p. 2010.

Anexos

ANEXO A - Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 300 mg/kg.



ANEXO B – Triagem farmacológica comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito aumentado, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Iritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose palpebral					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
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					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					