



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

POTENCIAL ANTICÂNCER DA PIPLARTINA E DA
PIPERINA, AMIDAS ISOLADAS DE PLANTAS DO
GÊNERO *PIPER*

DANIEL PEREIRA BEZERRA

Fortaleza - CE

2005

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**POTENCIAL ANTICÂNCER DA PIPLARTINA E DA PIPERINA, AMIDAS
ISOLADAS DE PLANTAS DO GÊNERO *PIPER***

Daniel Pereira Bezerra

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Leticia Veras Costa Lotufo

**Fortaleza - CE
Novembro, 2005**

**POTENCIAL ANTICÂNCER DA PIPLARTINA E DA PIPERINA, AMIDAS
ISOLADAS DE PLANTAS DO GÊNERO *PIPER***

Daniel Pereira Bezerra

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Aprovada com louvor em 4 de Novembro de 2005.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Leticia Veras Costa Lotufo
Universidade Federal do Ceará
- Orientadora -

Prof^ª Dr^ª Nylane Maria Nunes Alencar
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª Dr^ª Gláucia Maria Machado Santelli
Universidade de São Paulo

À Deus

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. *Letícia Veras Costa Lotufo*, pela orientação deste trabalho, pela ajuda, incentivo e paciência demonstrada em todos os momentos de trabalho em comum;

À Dr^a. *Claudia do Ó Pessoa*, por todas as dúvidas esclarecidas no desenvolver da pesquisa;

Ao Dr. *Edilberto Rocha Silveira*, pela colaboração neste trabalho;

Ao Dr. *Manoel Odorico de Moraes*, pela contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental;

À Prof^a. *Ana Paula Negreiros Nunes Alves*, pelos esclarecimentos sobre patologia e as análises histopatológicas;

À Dr^a. *Nylane Maria Nunes Alencar*, por ter aceitado participar desta banca de dissertação;

À Dr^a. *Márcia Torres* pelo incentivo e ajuda em alguns experimentos;

À amiga *Gardenia Carmen Gadelha Militão* pela grande ajuda em parte deste trabalho;

À amiga *Fernanda Oliveira de Castro* pela dedicação e ajuda neste trabalho;

À amiga *Marne Carvalho Vasconcellos* pelo incentivo à realização deste mestrado e pelo apoio constante;

Aos pós-graduandos do *Laboratório de Oncologia Experimental*: Bruno, Hélio, Hemerson (a grande *autarquia*), Alessandra (a grande *coxinha*), Danilo, Diego, André, Márcio, Paula, Rômulo, Patrícia Marçal, Patrícia Bonavides e Raquel Montenegro pela ajuda de todos os dias e pela amizade;

Aos colegas da pós-graduação do *Laboratório de Oncologia Experimental* Ivana Dantas e Paulo Michel pela ajuda com as fotografias de alguns experimentos;

Aos alunos da graduação que participam das atividades do *Laboratório de Oncologia Experimental*: Juliana, Marcelle, Clarissa, Ana Raquel, Hidelbrando, Sabrina, Michele (tipo), Cecília, Lorena, Naylane, Elthon, Érika, Carla e Lidiane pela amizade;

À Dr^a. *Kátia Leite* pela orientação na iniciação científica e pela amizade;

Aos técnicos Silvana França dos Santos, cuja dedicação é essencial para o laboratório, Maria de Fátima Teixeira e David pela ajuda;

Aos meus pais, que se dedicaram para me darem a oportunidade de realizar este trabalho;

Aos professores da Pós-graduação em Farmacologia por todas as lições;

Às funcionárias do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Sílvia, Áurea, Rose, Chiquinho e Íris que tentam resolver ou indicar o melhor caminho para os problemas do dia a dia;

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica ou para a execução deste trabalho;

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a realização desse trabalho.

ÍNDICE

Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xiv
Resumo	xvii
Abstract	xx
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Câncer.....	2
1.2. Produtos naturais.....	4
1.3. Temperos.....	14
1.4. Gênero <i>Piper</i>	15
1.5. Piperina.....	21
1.6. Piplartina.....	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Geral	25
2.2. Específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Materiais Utilizados	27
3.1.1. Equipamentos	27
3.1.2. Soluções	28
3.1.3. Modelos Biológicos Experimentais	31
3.2. Metodologia Experimental	32
3.2.1 Obtenção da pipartina e da piperina.....	32
3.2.2. Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	33
3.2.2.1. Estudo da toxicidade aguda em larvas de <i>Artemia sp.</i>	33
3.2.2.1.1. Procedimento Experimental.....	33
3.2.2.1.2. Análise dos Dados.....	34
3.2.2.2. Avaliação da atividade antimutagênica nos ovos do ouriço.....	34
3.2.2.2.1. Procedimento Experimental.....	35
3.2.2.2.2. Análise dos Dados.....	37

3.2.2.3. Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos.....	37
3.2.2.3.1. Procedimento Experimental.....	37
3.2.2.4. Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais <i>in vitro</i>	38
3.2.2.4.1. Procedimento Experimental.....	39
3.2.2.4.2. Análise dos Dados	39
3.2.3. Estudo do mecanismo de ação em células leucêmicas.....	40
3.2.3.1. Curva de Crescimento Celular.....	40
3.2.3.1.1. Procedimento Experimental.....	40
3.2.3.1.2. Análise dos Dados.....	40
3.2.3.2 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán	41
3.2.3.2.1. Procedimento Experimental.....	41
3.2.3.2.2. Análise dos Dados	42
3.2.3.3. Inibição da síntese de DNA – BrDU.....	42
3.2.3.3.1. Procedimento Experimental.....	42
3.2.3.3.2. Análise dos Dados	43
3.2.3.4. Análise morfológica – Coloração diferencial por H/E.....	43
3.2.3.4.1. Procedimento Experimental.....	44
3.2.3.4.2. Análise dos Dados	44
3.2.3.5. Análise morfológica – Coloração Diferencial por BE/LA.....	44
3.2.3.5.1. Procedimento Experimental.....	45
3.2.3.5.2. Análise dos Dados.....	45
3.2.4. Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>.....	46
3.2.4.1. Obtenção e manutenção dos animais.....	46
3.2.4.2. Avaliação do efeito da piplartina e piperina em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	47
3.2.4.2.1. Procedimento Experimental.....	47
3.2.4.2.2. Análise dos dados.....	48
3.2.4.3. Detecção de Ki-67 por imunohistoquímica.....	48
3.2.4.3.1. Procedimento Experimental.....	49
3.2.4.3.2. Análise dos Dados.....	50
3.2.4.4. Análise morfológica e histopatológica.....	50
3.2.4.4.1. Procedimento Experimental.....	50

3.2.4.4.2. Análise dos Dados.....	51
4. RESULTADOS.....	53
4.1. Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	53
4.1.1. Toxicidade Aguda em <i>Artemia sp</i>	53
4.1.2. Potencial Antimitótico em Ovos de Ouriço do Mar.....	53
4.1.3. Atividade Hemolítica.....	57
4.1.4. Inibição da Proliferação de Células Tumorais <i>in vitro</i> – Ensaio do MTT.....	57
4.2. Estudo do mecanismo de ação em células leucêmicas.....	59
4.2.1. Curva de crescimento celular.....	59
4.2.2. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán.....	62
4.2.3. Inibição da síntese de DNA – Incorporação de BrdU.....	62
4.2.4. Análise morfológica – Coloração diferencial por H/E.....	65
4.2.5. Análise morfológica – Coloração Diferencial por LA/BE.....	65
4.3. Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>.....	71
4.3.1. Avaliação do efeito da pipartina e piperina em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	71
4.3.2. Detecção de Ki-67 por imunohistoquímica.....	71
4.3.3. Análise morfológica e histopatológica.....	74
 DISCUSSÃO	 83
 CONCLUSÕES	 100
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas químicas da vimblastina (1), da vincristina (2), da vindesina (3) e da vinorelbina (4).....	7
Figura 2	Estruturas químicas do paclitaxel (5) e do docetaxel (6).....	9
Figura 3	Estruturas químicas das epotilonas A (7) e B (8).....	11
Figura 4	Estruturas químicas da campotensina (9), do topotecano (10) e do irinotecano (11).....	12
Figura 5	Estruturas químicas da podofilotoxina (12), do etoposido (13) e do tenoposido (14).....	13
Figura 6	Estrutura química da guineensina (15), piperonalina (16) e dehidropiperonalina (17).....	18
Figura 7	Estrutura química da piperolactama A (18), piperolactama B (19) e piperolactama C (20).....	19
Figura 8	Estrutura química da pipericida (21), (2E,8E)-N-9-(3,4metileno dioxifenil)nonadienoilpiperidina (22) e aduncamida (23).....	20
Figura 9	Estrutura química da piperina (24).....	22
Figura 10	Estrutura química da piplartina (25).....	22
Figura 11	Fotografia de um náuplio de <i>Artemia sp.</i>	34
Figura 12	Fotografia de um ouriço-do-mar (<i>Lytechinus variegatus</i>).....	36
Figura 13	Microfotografias das primeiras fases do desenvolvimento embrionário do ouriço <i>Lytechinus variegatus</i>	36
Figura 14	Toxicidade aguda da piplartina e da piperina em <i>Artemia sp.</i>	54
Figura 15	Fotomicrografia apresentando o efeito da piplartina e da piperina no desenvolvimento de ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i>	56
Figura 16	Curva de crescimento de células de leucemias humana tratada com piplartina.....	61

	tratada com piplartina.....	
Figura 17	Efeito da piplartina na viabilidade das células HL-60 e K-562 determinado por exclusão de azul de tripan depois de 24 horas de incubação.....	63
Figura 18	Efeito da piplartina na inibição da incorporação do 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) em células HL-60 e K-562 depois de 24 horas de incubação.....	64
Figura 19	Fotomicrografia das células HL-60 coradas com hematoxilina/eosina.....	66
Figura 20	Fotomicrografia das células K-562 coradas com hematoxilina/eosina.....	67
Figura 21	Efeito da piplartina em células HL-60 e K-562, analisados por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina depois de 24 horas de incubação.....	68
Figura 22	Fotomicrografia das células HL-60 coradas com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina.....	69
Figura 23	Fotomicrografia das células K-562 coradas com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina.....	70
Figura 24	Efeito sobre a massa tumoral de animais transplantados com Sarcoma 180.....	72
Figura 25	Efeito sobre a proliferação tumoral de animais transplantados com Sarcoma 180 usando o anticorpo Ki67.....	73
Figura 26	Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180 tratados com piplartina.....	77
Figura 27	Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180 tratados com piperina.....	78
Figura 28	Histopatologia do fígado de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180 tratados com piplartina.....	79

Figura 29	Histopatologia do fígado de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180 tratados com piperina.....	80
Figura 30	Estrutura química da piperina.....	85
Figura 31	Estrutura química da piplartina.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	32
Tabela 2	Atividade antimitótica da piplartina e da piperina no desenvolvimento de ovos de ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i>	55
Tabela 3	Atividade citotóxica da piplartina e da piperina em linhagem de células tumorais.....	58
Tabela 4	Atividade citotóxica da piplartina em diferentes linhagens de células de leucemia humana durante o crescimento celular.....	60
Tabela 5	Efeito da piplartina, piperina ou 5-fluorouracil sobre o peso dos órgãos (fígado, rins e baço) dos animais transplantados com Sarcoma 180.....	76
Tabela 6	Resumo dos resultados obtidos com as amidas piplartina e piperina.....	81

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
μL	Microlitro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
[]	Concentração
<	Menor que
>	Maior que
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de variância)
BrdU	Bromodeoxiuridina
BE/LA	Brometo de etídio / laranja de acridina
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CO ₂	Dióxido de carbono (gás carbônico)
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
g	Grama
h	Hora
H/E	Hematoxilina/Eosina

H ₂ O	Água destilada
IC	Intervalo de confiança
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromido
n ^o	Número
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNM	Ressonância Magnética Nuclear
TBS	Tris buffer solution (Tampão tris)
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
X	Vezes

RESUMO

POTENCIAL ANTICÂNCER DA PIPLARTINA E DA PIPERINA, AMIDAS ISOLADAS DE PLANTAS DO GÊNERO *PIPER*. Dissertação de Mestrado. Autor: Daniel Pereira Bezerra. Orientadora: Dr^a. Letícia Veras Costa Lotufo. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Aprovada em 4 de Novembro de 2005.

Piplartina e piperina são alcalóides/amidas presentes em plantas do gênero *Piper*. A atividade desses compostos foi inicialmente avaliada através do ensaio de toxicidade aguda em *Artemia sp.*, desenvolvimento de ovos de ouriço do mar, ensaio do MTT usando células tumorais e ensaio hemolítico. A piperina apresentou toxicidade maior em *Artemia sp.* que a piplartina. Ambas inibiram o desenvolvimento de ouriço do mar, mas neste ensaio a piplartina foi mais potente que a piperina. No ensaio do MTT, a piplartina também foi a mais ativa com valores de CI_{50} variando de 0,7 a 1,7 $\mu\text{g/mL}$. Nenhuma das substâncias testadas induziu hemólise. O mecanismo de ação da piplartina foi, então, estudado. A viabilidade de células HL-60, K562, JUKART e MOLT-4 foi afetada por piplartina apenas após de um período de exposição de 24h, quando analisada por exclusão por azul de tripan. A piplartina reduziu o número de células viáveis associado com um aumento no número de células não-viáveis, o que colabora com os achados da análise morfológica, onde observou-se um aumento do número de células mortas. A atividade citotóxica da piplartina está relacionada com a inibição da síntese de DNA, como revelado pela incorporação do BrdU. A administração de piplartina ou piperina (50 ou 100 mg/kg/dia) inibe o desenvolvimento de tumor sólido em camundongos transplantados com Sarcoma 180. A inibição foi de 28,7 e 52,3% para piplartina e 55,1 e 56,8% para piperina na menor e maior dose, respectivamente. A atividade antitumoral da piplartina, mas não da piperina, está relacionada com a inibição da proliferação do tumor, como observada pela redução da marcação com Ki67 em tumores de animais tratados. A análise histopatológica do fígado e rins demonstrou que ambos os órgãos foram reversivelmente afetados pelo tratamento com piplartina e piperina, mas de maneira diferente. A piperina foi mais tóxica para o fígado, enquanto que a piplartina afetou mais os rins. Assim, ambas as amidas podem

atuar como agentes antitumorais, embora, elas pareçam atuar por vias diferentes. Sendo que a atividade da piplartina parece estar relacionada diretamente a sua ação citotóxica, enquanto que a atividade da piperina seria mediada pelo hospedeiro.

Palavras chave: Ensaios de seleção de medicamentos antitumorais, alcalóides, amidas.

ABSTRACT

ANTICANCER POTENTIAL OF PIPLARTINE AND PIPERINE, AMIDES ISOLATED FROM *PIPER* SPECIES. Master's Dissertation. Author: Daniel Pereira Bezerra. Advisor: Dr^a. Letícia Veras Costa Lotufo. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará. Approved on November 4th, 2005.

Piplartine and piperine are alkaloids/amides isolated from *Piper* species. The activity of these compounds was initially evaluated on the brine shrimp lethality assay, sea urchin development, MTT assay using tumor cell lines, and hemolytic assay. Piperine showed a higher toxicity in brine shrimp than piplartine. Both piplartine and piperine inhibited the sea urchin development, but in this assay piplartine was more potent than piperine. In MTT assay, piplartine was also the most active with IC₅₀ values ranging from 0.7 to 1.7 µg/mL. None of the tested substances induced hemolysis. Since the piplartine showed the best results, its mode of action was studied. Viability of HL-60, K562, JUKART, and MOLT-4 cell lines were affected by piplartine only after an exposure time of 24h, as analyzed by the Trypan blue exclusion. Piplatine reduced the number of viable cells associated with an increasing of the number of non-viable cells, which corroborate data from morphologic analysis. The cytotoxic activity of piplartine was related to the inhibition of DNA synthesis, as revealed by the reduction of BrdU incorporation. Administration of piplartine or piperine (50 or 100 mg/kg/day) inhibited the solid tumor development in mice transplanted with Sarcoma 180. The inhibition rates were of 28.7 and 52.3% for piplartine and 55.1 and 56.8% for piperine at lowest and highest dose, respectively. Piplartine-antitumor activity was related to the tumor proliferation rate inhibition, as observed by reduction of Ki67 staining in tumor of the treated-animals. The histopathological analysis of liver and kidney showed that both organs were reversible affected by piplartine and piperine treatment, but in a different way. Piperine was more toxic to the liver while piplartine affected more the kidney. Thus, both amides may act as antitumor agents, although, they seem to act through different pathways. Piplartine activity seems to be related to direct cytotoxicity on tumor cells, while piperine presented a host mediated activity.

Key words: Antitumor drug screening assays, alkaloids, amides.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O termo câncer é a tradução latina da palavra carcinoma (de kavkinos – crustáceos, caranguejo). Foi usado pela primeira vez por Galeno, aproximadamente 132-201 a.C., para indicar um tumor maligno de mama em que as veias superficiais desses órgãos apareciam intumescidas e ramificadas, assemelhando-se à pata de caranguejo (FLECK, 1992). Câncer é um conjunto de doenças causadas pela proliferação anormal das células, formando tumores.

O mecanismo da carcinogênese inicia-se quando o agente carcinógeno incide sobre uma célula normal induzindo alterações sobre a molécula de DNA. Esse fenômeno é denominado de mutação genética. As células, cujo material genético foi alterado, passam a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados oncogenes que quando ativados transcrevem proteínas com função regulatória positiva de eventos celulares ligados à estimulação do ciclo celular de duplicação e proliferação, e são responsáveis pela malignização das células normais (CORTNER & WOUDE, 1997). Os produtos de genes supressores de tumor são proteínas com função regulatória negativa de crescimento e sua perda de função também promovem a carcinogênese (PERKINS & STERN, 1997).

Essas células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções do que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções. A invasão dos pulmões gera alterações respiratórias, a invasão do cérebro pode gerar dores de cabeça, convulsões, alterações da consciência etc (KUMMAR *et al.*, 2004).

O homem moderno é confrontado com um aumento na incidência e mortalidade por câncer. Existem mais de cem tipos de cânceres, como exemplo

pode-se citar o de pele, pulmão, mama, fígado, estômago, rim, ovário, cérebro, próstata, pâncreas e ossos, sendo responsáveis anualmente pela morte de milhões de pessoas em todo mundo. Nos Estados Unidos, por exemplo, de cada quatro mortes uma está relacionada a essa doença. Somente em 2005, as estimativas apontam que cerca de 570.280 americanos, mais de 1.500 pessoas por dia, irão morrer dessa doença (www.cancer.gov / capturado em 18 de Agosto de 2005).

No Brasil, as estimativas apontam que ocorrerão 467.440 casos novos de câncer até o final do ano de 2005. Os tipos mais incidentes, à exceção de pele não-melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero para o sexo feminino, acompanhando a mesma magnitude observada no mundo. São esperados 229.610 casos novos para o sexo masculino e 237.830 para sexo feminino. Estima-se que no final de 2005, o câncer de pele não melanoma (113 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), próstata (46 mil), cólon e reto (26 mil), pulmão (26 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (21 mil) (INCA, 2004).

O número de casos novos estimados distribui-se de forma heterogênea nas unidades da federação e capitais do país. Observa-se uma grande variação regional na distribuição das taxas brutas de incidência de câncer, seja de uma forma geral ou por localização primária. A representação espacial das taxas brutas de incidência evidencia tais diferenças. Destacando-se, por exemplo, a distribuição das taxas brutas de incidência de câncer onde se percebe o gradiente entre as maiores taxas nas regiões Sul e Sudeste, passando pela região Centro-Oeste e as menores taxas nas regiões Nordeste e Norte (INCA, 2004).

O tratamento para câncer varia de acordo com o tipo e a gravidade da doença. Estes tumores podem ser tratados com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou, ainda, com a combinação dessas técnicas. A quimioterapia, diferente da cirurgia e da radioterapia, é utilizada em tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo corpo, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células à morte. Estes fármacos podem

ser ministrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois consegue maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (CARVALHO *et al.*, 2003; NICOLAU *et al.*, 1994). Drogas quimioterápicas usadas no tratamento de tumores malignos apresentam sérios efeitos colaterais, os quais incluem neurotoxicidade, nefrotoxicidade, neuropatia periférica e citopenia (BRUCE, 1993).

O controle do câncer, que lidera a segunda maior causa de morte no mundo, pode ser beneficiado pelas terapias alternativas (REDDY *et al.*, 2003). O uso de produtos naturais pode ser uma solução.

1.2. Produtos naturais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (WHO, 1998). A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993). Assim, é necessário um amplo estudo dos produtos naturais para que seja comprovada sua eficácia e garantida sua segurança.

É cada vez mais freqüente o uso de produtos naturais da medicina tradicional hindu e chinesa, as quais são desconhecidas pelos povos ocidentais. Estas plantas são comercializadas apoiadas em propagandas que prometem “benefícios seguros, já que se trata de fonte natural”. Muitas vezes, entretanto, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validade

científica, por não terem sido investigadas, ou por não terem tido suas ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínicos ou clínicos (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2005).

Muitos autores têm discutido a importância e o potencial de plantas medicinais como fonte de novos agentes terapêuticos (CORDELL *et al.*, 2001). Mendelsohn & Balick (1995) concluíram que existem 375 plantas de importância farmacêutica nas florestas do mundo, das quais apenas um-oitavo teria sido descoberto. A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como de seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia (GEBHARDT, 2000).

A literatura indica que muitos produtos naturais estão disponíveis como agentes quimioterápicos contra câncer de ocorrência frequente (REDDY *et al.*, 2003). Desde aproximadamente 1500 a.C., plantas e extratos de plantas têm sido reconhecidos como tendo atividade anticâncer. Entretanto, o estudo racional e organizado de plantas como fontes de agentes antineoplásicos somente começou com os estudos pioneiros de Hartwell e colaboradores durante o período de 1947-1953, quando pela primeira vez, constituintes puros originados de plantas foram caracterizados e associados com a atividade antitumoral do extrato bruto (HARTWELL, 1967).

A utilização dos métodos de *screening* e o avanço das técnicas analíticas também contribuíram para a retomada na pesquisa em produtos naturais. Recentemente, o desenvolvimento de sistemas de *screening* robotizados possibilitou processar 50.000 amostras por dia. Os testes têm como alvo enzimas específicas de rotas biossintéticas animais ou receptores biológicos ou algum composto envolvido na transcrição dos genes (PHILLIPSON, 2001). Características comuns desses testes são rapidez, quantificação, facilidade de realização e automação, além de serem relativamente mais baratos quando comparados aos testes em animais usados a poucas décadas. Esse tipo de ensaio, juntamente com os testes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antiparasitas e citotóxicos *in vitro*, tornaram possível o *screening* de um grande

número de substâncias (BORRIS, 1996). Por causa disto, a capacidade de testar substâncias em muitas companhias é significativamente maior do que suas próprias bibliotecas de compostos químicos, aumentando a atração por produtos naturais (KINGSTON, 1996).

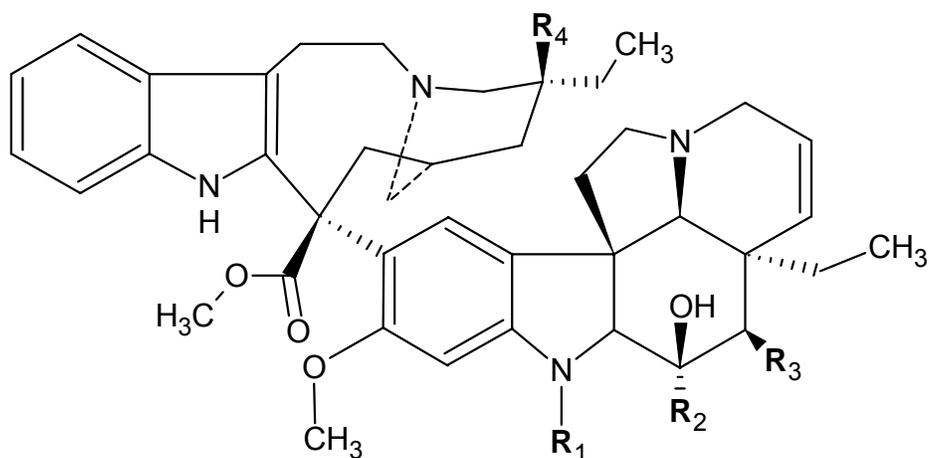
No processo de descoberta de drogas anticâncer, o *screening* pré-clínico no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI) em linhagens tumorais humanas *in vitro* e seleção de testes *in vivo* ajudam a identificar a maioria das drogas alvos. No próximo estágio de desenvolvimento de drogas, ensaios toxicológicos, de produção e de formulação são realizados antes da droga iniciar uma triagem clínica (LEE, 1999).

O produto natural não precisa ser necessariamente o melhor composto para o uso farmacêutico (KINGSTON, 1996). Esses compostos podem servir como protótipo para o *design* e desenvolvimento de uma segunda geração de agentes com características melhoradas, como o aumento da eficácia e da estabilidade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e a diminuição dos efeitos colaterais (ORTHOLAND & GANESAN, 2004). A obtenção de análogos é um processo comumente utilizado para descobrir os grupamentos essenciais à atividade biológica, através do uso da relação entre a estrutura e atividade biológica.

Desde 1961, nove compostos derivados de plantas têm sido usados como drogas anticâncer nos EUA: vimblastina (Velban), vincristina (Oncovin), etoposídeo (VP-16), tenoposídeo (VM-26), paclitaxel (Taxol), vinorelbina (Navelbine) e mais recentemente em 1996, docetaxel (Taxotere), topotecano (Hycamtin) e irinotecano (Camptosar). Outros onze agentes estão sendo usados na medicina chinesa (WANG & LEE, 1997).

Vimblastina **(1)** e vincristina **(2)**, dois alcalóides naturais de *Catharanthus roseus* ou *Vinca rosea* (Chang Chung Hua), são as melhores drogas no tratamento de linfoma de Hodgkin e leucemia infantil aguda, respectivamente (BARNETT *et al.*, 1978; PLASSCHAERT *et al.*, 2004; CONNORS, 2005). De qualquer modo, a modificação sintética tem levado a outros análogos com atividade contra outros tipos de tumores ou com menos toxicidade e efeitos

colaterais. Um exemplo é a vindesina (**3**), o análogo C-3 amido de 4-deacetil vimblastina, o qual é o principal metabólito da vimblastina em homens (OWELLEN *et al.*, 1977). Vindesina causa reversão completa em leucemia não-linfocítica adulta e leucemia linfocítica infantil aguda, além de ser menos neurotóxica que os alcalóides naturais (BARNETT *et al.*, 1978; CRAGG & NEWMAN, 2005). Um outro exemplo é a vinorelbina (**4**) (Navelbine, Burroughs Wellcome), a qual é usada contra câncer de pequenas células de pulmão e câncer de mama avançado (JENKS & SMIGEL, 1995).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Vimblastina (1)	CH ₃	CO ₂ CH ₃	OCH ₂ CH ₃	OH
Vincristina (2)	COH	CO ₂ CH ₃	OCH ₂ CH ₃	OH
Vindesina (3)	CH ₃	CONH ₂	OH	OH
Vinorelbina (4)	CH ₃	CO ₂ CH ₃	OCH ₂ CH ₃	H

Figura 1 – Estruturas químicas da vimblastina (**1**), da vincristina (**2**), da vindesina (**3**) e da vinorelbina (**4**).

O paclitaxel (**5**) (Taxol®), isolado da *Taxus brevifolia* por Wani e colaboradores (1971), é utilizado no tratamento do câncer de mama e ovário (KINGSTON, 1991) e gerou um faturamento de 1,6 bilhões de dólares no ano de 2000 (TOOGOOD, 2002).

Um grande problema na extração do paclitaxel reside no fato de que a espécie *Taxus brevifolia* demora cerca de 100 a 200 anos para atingir a maturidade e encontra-se em extinção. Para a obtenção de 1 kg do paclitaxel são necessários aproximadamente 10.000 kg da casca da *Taxus brevifolia*, sendo necessário abater cerca de 3.000 árvores. Essa quantidade poderia ser utilizada no tratamento de apenas 500 pacientes durante o período de um ano, sendo que um número muito reduzido de pessoas seria beneficiado, já que o câncer é uma doença que atinge, somente nos EUA, cerca de 6,5 milhões de pessoas por ano (KINGSTON, 2000). Uma solução para este problema foi encontrada nas folhas da árvore *Taxus baccata*, da qual se pode extrair a molécula 10-desacetilbacatina-III, que apresenta o esqueleto básico e as funcionalidades do paclitaxel. Pode-se obter, *via* semi-síntese e em poucas etapas, o paclitaxel pela acetilação da posição 10 da 10-desacetilbacatina-III e pela introdução da cadeia lateral na posição C-13. Uma vantagem deste método para a obtenção do paclitaxel é que não é necessário se derrubar as árvores, sendo uma fonte renovável. Por exemplo, para se obter 1 kg de 10-desacetilbacatina-III são necessários cerca de 3.000 kg das folhas de *Taxus baccata* (KINGSTON, 2000). Esta semi-síntese foi desenvolvida por diferentes grupos de pesquisa, destacando-se o grupo da Ojima (OJIMA *et al.*, 1993).

Devido à sua eficácia, este produto natural foi desenvolvido e comercializado pela companhia americana Bristol-Meyer Squibb com o nome de Taxol[®], na década de 90, e atualmente está disponível como medicamento em mais de 60 países. Usado com sucesso em diferentes tipos de tumores sólidos, foi o primeiro medicamento no mercado capaz de impedir a despolimerização da tubulina (KINGSTON, 2000; TOOGOOD, 2002).

Inúmeros análogos foram sintetizados em laboratório por diferentes grupos de pesquisa, com o objetivo de se identificar os grupos farmacofóricos (responsáveis pela atividade biológica), estabelecendo, assim, a relação estrutura-atividade na tentativa de se obter fármacos mais potentes (KINGSTON, 2000). Graças a estes estudos, Potier e colaboradores, do “Centre National de la

Recherche Scientifique” (CNRS), em Gif-sur-Yvette – França, descobriram, em 1986, o docetaxel (**6**) que é, em alguns casos, 1,6 vezes mais ativo que o taxol (RINGEL & HORWITZ, 1991). Como consequência de seus excelentes resultados, o docetaxel foi comercializado em 1994 pela indústria francesa Rhône-Poulenc com o nome de Taxotere[®] sendo o segundo produto a impedir a despolimerização da tubulina (RINGEL & HORWITZ, 1991).

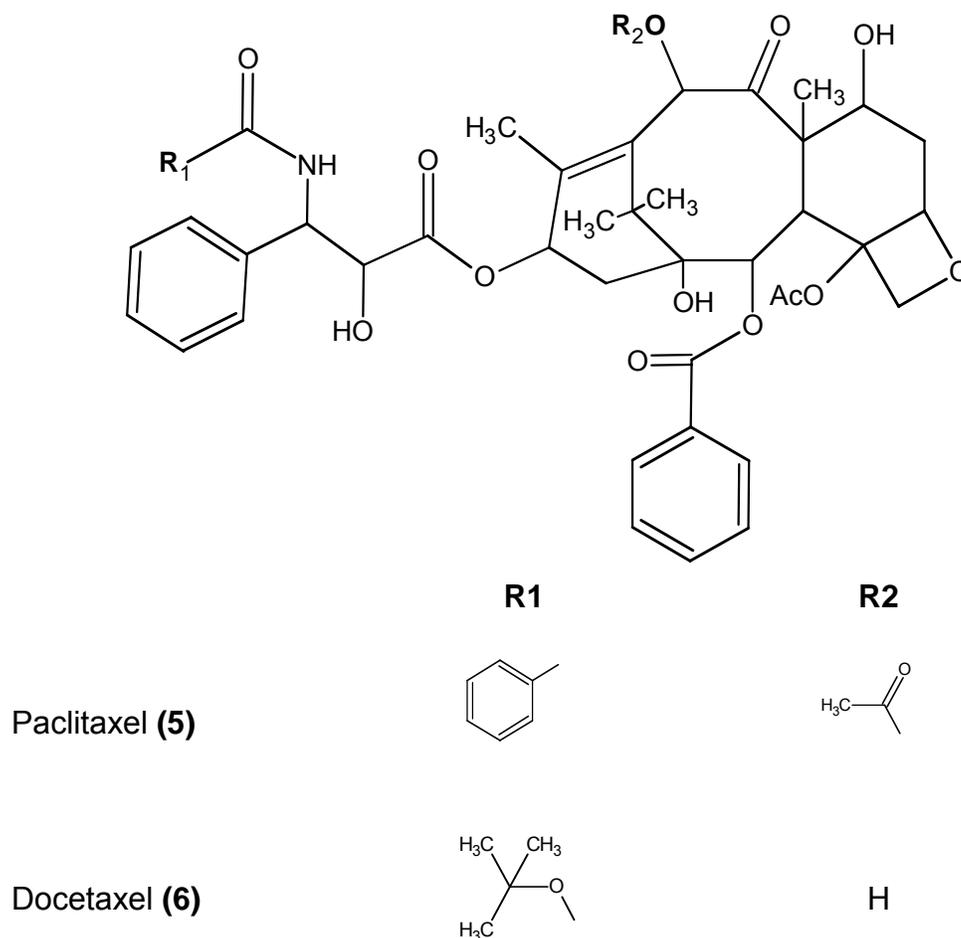


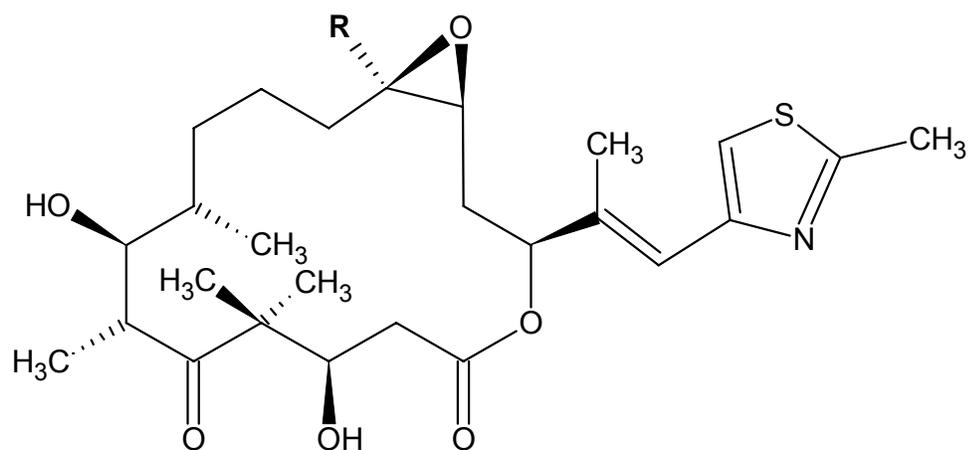
Figura 2 – Estruturas químicas do paclitaxel (**5**) e do docetaxel (**6**).

As epotilonas A **(7)** e B **(8)** foram descobertas em 1987, por Hofle e seus colaboradores da “Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung (GBF)”, na Alemanha. Estes compostos foram isolados a partir de extratos de cultura da degradação de celulose pela bactéria *Sorangium cellulosum* (HOFLE *et al.*, 1999). Por apresentarem atividade contra *Mucor hiemalis* (HOFLE *et al.*, 1996), as epotilonas A e B foram primeiramente testadas como potencial fungicida e agrotóxico (HOFLE *et al.*, 1999; HOFLE *et al.*, 1996). No entanto, experimentos provaram que estes compostos eram muito tóxicos.

Importante descoberta foi realizada em 1995, por pesquisadores da Merck nos Estados Unidos que, independentemente, isolaram as epotilonas A e B e comprovaram sua potente atividade antitumoral com valores CI_{50} próximos ao do paclitaxel (BOLLAG *et al.*, 1995). Outra importante descoberta foi que o mecanismo de ação das epotilonas A e B, no combate ao câncer, era similar ao do taxol, exibindo potentes propriedades na estabilização da tubulina, impedindo a mitose.

As epotilonas A e B mostraram-se capazes de inibir a glicoproteína-P, responsável pelo desenvolvimento de resistência aos fármacos. Por esta razão, as epotilonas apresentam atividade superior ao paclitaxel em células resistentes, sendo que estes resultados foram, posteriormente, confirmados por cientistas da GBF (HOFLE *et al.*, 1996). Após os bons resultados preliminares, a epotilona B passou com sucesso por testes clínicos de fase I, estando atualmente em fase II (TOOGOOD, 2002; ALTMANN, 2005).

Na tentativa de se obter fármacos mais potentes, inúmeros análogos foram sintetizados por vários pesquisadores (HARRIS & DANISHEFSKY, 1999), sendo a primeira síntese da epotilona em estado sólido descrita por Nicolau e colaboradores, o que permitiu a obtenção de uma biblioteca combinatória contendo numerosos análogos (NICOLAU *et al.*, 1997).



	R
Epotilona A (7)	H
Epotilona B (8)	CH ₃

Figura 3 – Estruturas químicas das epotilonas A (**7**) e B (**8**).

Análogos sintéticos de produtos naturais podem ser necessários quando as atividades do produto natural são limitadas ou quando não há disponibilidade de obtenção. Por exemplo, o alcalóide natural camptotecina (**9**), isolado da árvore chinesa *Camptotheca acuminata*, é usado no câncer gástrico, retal, colo e bexiga, mas tem disponibilidade natural limitada e é pouco solúvel em água, e tem sofrido modificação molecular com o objetivo de desenvolver agentes quimioterápicos mais úteis como o topotecano (**10**) e irinotecano (**11**), que estão em estudos clínicos. Esses compostos causam inibição da topoisomerase I (BARREIRO & FRAGA, 2001).

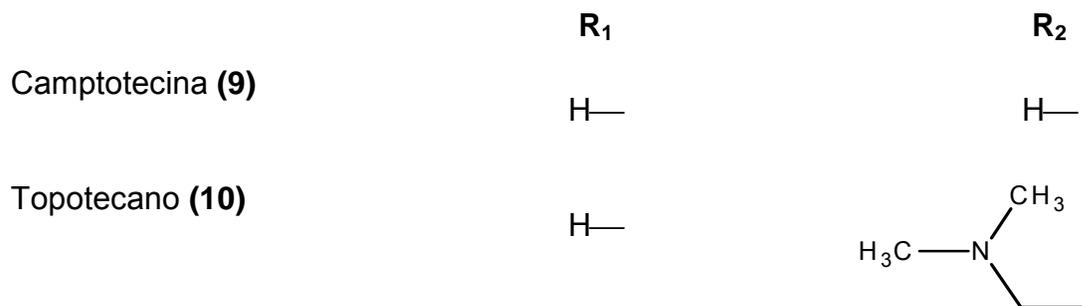
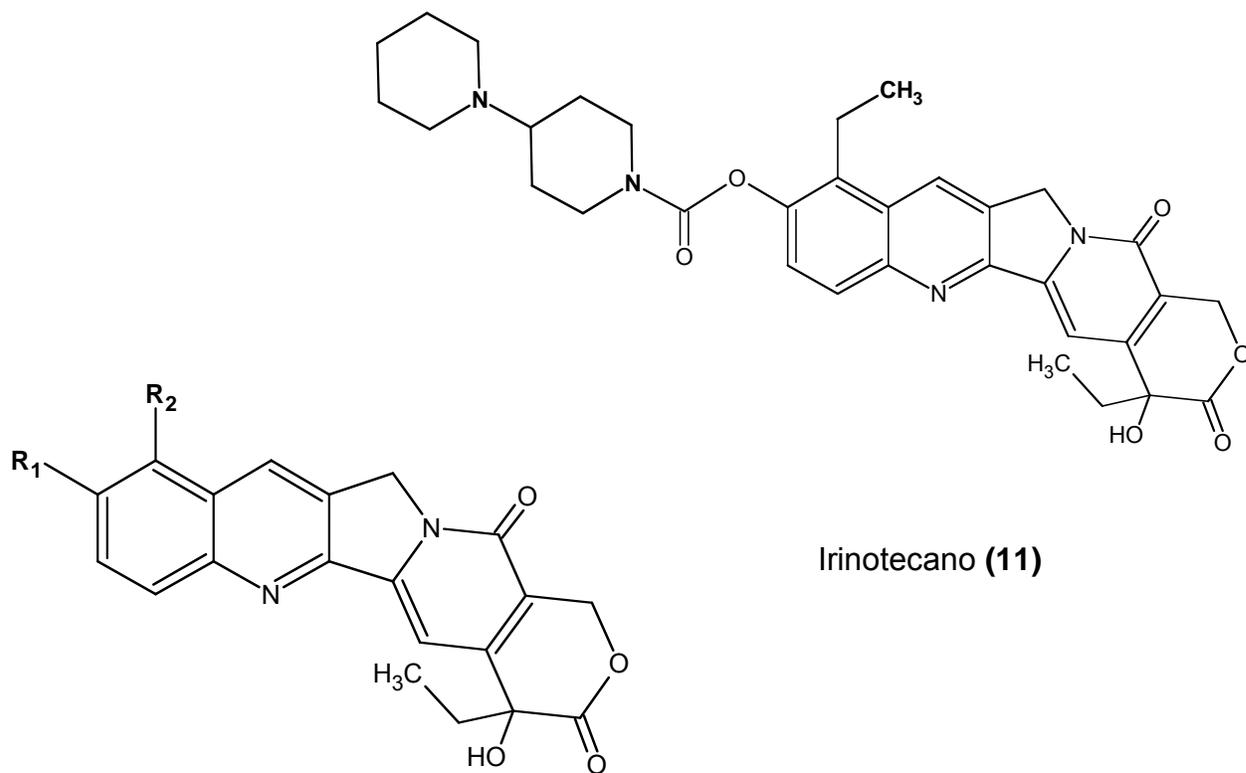
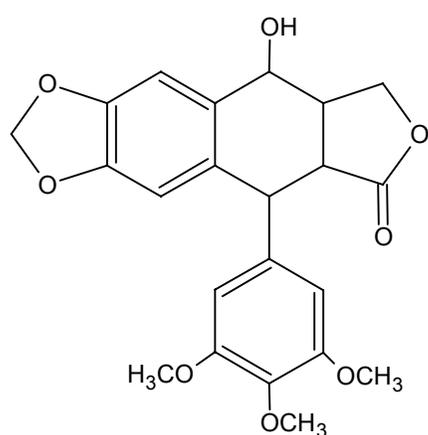
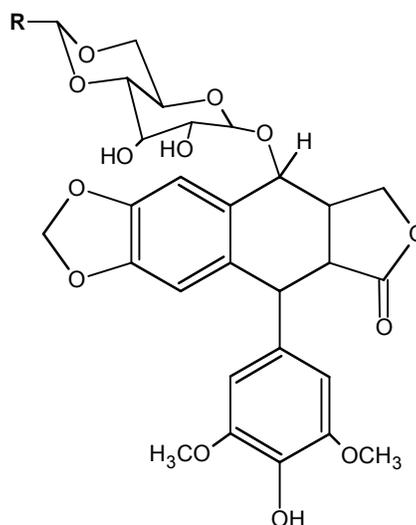


Figura 4 - Estruturas químicas da camptotecina (9), do topotecano (10) e do irinotecano (11).

A podofilotoxina (**12**) é conhecida há muitos anos como o agente citotóxico encontrado no rizoma da planta *Podophyllum peltatum* (KOROLKOVAS, 1998). De fato, os índios americanos já utilizavam o extrato das raízes de *P. peltatum* no tratamento do câncer de pele e verrugas (MANN, 2002). Análogos semi-sintéticos da podofilotoxina (**12**), o etoposídeo (**13**) e o tenoposídeo (**14**) foram obtidos através do estudo da relação estrutura-atividade. Esses compostos diferem somente pela presença do grupamento metila (**13**) no lugar do grupo tenillidíno (**14**) no açúcar piranosídico (BOHLIN & ROSEN, 1996). Essas substâncias têm como mecanismo de ação a inibição da topoisomerase II.



Podofilotoxina (**12**)



Etoposídeo (**13**)

R

—CH₃

Teniposídeo (**14**)

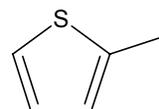


Figura 5 – Estruturas químicas da podofilotoxina (**12**), do etoposídeo (**13**) e do tenoposídeo (**14**).

A terapia anticâncer moderna também tem encontrado no oceano e nos microorganismos uma vasta fonte de compostos com importante potencial terapêutico. Exemplos de drogas obtidas de microorganismos que já foram aprovadas para uso clínico são: actinomicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirrubicina, idarrubicina, mitomicina C e estreptozocina (ROCHA *et al.*, 2001). Quanto aos organismos marinhos podemos citar: discodermolida, eleuterobina, sarcodictina e laulimalida, que apresentam potente atividade antitumoral e possuem mecanismo de ação similar ao do paclitaxel, sendo compostos promissores na luta contra o câncer (STACHEL *et al.*, 2001).

1.3. Temperos

Dada a ampla variabilidade de espécies botânicas e partes de plantas das quais os temperos são derivados, estes podem contribuir potencialmente para a dieta humana. No passado, o uso medicinal dos temperos e ervas era freqüentemente indistinguível do seu uso na culinária. Atualmente, na área da prevenção do câncer, o uso dos temperos e seus constituintes como agentes quimioprotetores são pontos de intensa pesquisa (LAMPE, 2003).

Muitos dos fitoquímicos de temperos são agentes biológicos que podem afetar o câncer. Mecanismos relacionados a inibição da mutagênese e epigênese do DNA inclui atividade antioxidante, alterações da atividade das enzimas de biotransformação, efeitos antibacteriano e antivirais. Mecanismos que afetam a proliferação e progressão do câncer incluem alterações na função imune, redução da inflamação, modulação da concentração de hormônios esteróides, alterações na progressão do ciclo celular e indução da apoptose (LAMPE, 2003).

Vários temperos e seus constituintes químicos foram avaliados em modelos animais de carcinogênese e apresentaram resultados positivos (SURH, 1999). Extratos de safrona (*Crocus sativus*) apresentaram inibição da formação de tumores de tecidos de pele e cólon e em combinação com cisteína e vitamina E protegem contra toxicidade induzida por cisplatina em camundongos e ratos

(revisado por ABDULLAEV, 2002). Crocetina (um ácido polieno dicarboxílico do safrão) inibiu, de maneira dependente da concentração, a síntese de DNA e RNA em células tumorais (revisado por ABDULLAEV, 2002). Similarmente, crocina (um glicosil éster da crocetina) apresentou atividade antitumoral em ratos, sugerindo que pode existir um componente hormonal para o seu mecanismo (GARCIA-OLMO *et al.*, 1999).

Curcumina também apresentou efeito quimiopreventivo contra câncer de pele, estômago, cólon e boca em camundongos (CHUANG *et al.*, 2000). Ginger e capsaicina (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida), ingredientes purgantes de uma pimenta, também protegem da mutagenicidade e tumorigenicidade induzidas experimentalmente (KATIYAR *et al.*, 1996; SURH, 1999).

1.4. Gênero *Piper*

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae, apresentando cerca de 700 espécies. As espécies do gênero *Piper*, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, são usadas medicinalmente para fins diversos. As espécies do gênero *Piper* apresentam uma alta importância comercial e econômica por serem pimentas usadas, mundialmente, como “temperos picantes” (revisado por PARMAR *et al.*, 1997).

O interesse pela química desse gênero evoluiu bastante ao longo dos anos devido ao grande número de espécies estudadas e compostos isolados com importante valor farmacológico. Algumas espécies deste gênero têm sido bem investigadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico. Espécies do gênero *Piper* são fontes de óleos essenciais bioativos e de grande interesse para as indústrias farmacêuticas (SILVA & MACHADO, 1999).

Na Jamaica, de onze espécies do gênero *Piper* conhecidas, *P. aduncum* e *P. hispidum* são usadas para dores de estômago e como repelente para insetos. *P. amalago*, distribuída do México até o Brasil, é usada para aliviar dores no peito e como agente antiinflamatório. Raízes de *P. syvaticum* são usadas como

antídoto efetivo no envenenamento por serpentes na medicina indiana (revisado por PARMAR *et al.*, 1997).

Raízes e frutos de *P. chaba* apresentam numerosas aplicações na medicina. Em particular, elas são úteis na asma, bronquite, febre, dor abdominal, como estimulante e nas afeições hemorroidais. *P. brachystachyum* apresenta propriedades inseticidas, já *P. futokadsura* é uma planta medicinal que cresce em províncias de Taiwan. O caule de *P. futokadsura*, conhecido como *haifengteng*, é amplamente usado na medicina natural da China indicado para o tratamento da asma e artrites. O extrato benzênico de suas folhas apresentou atividade tóxica para a larva de *Spodoptera fitura* F (revisado por PARMAR *et al.*, 1997).

A pimenta preta (*P. Guineens*) é uma trepadeira que está distribuída por todo oeste africano e cujos frutos são usados como agente aromatizante. Preparações de suas folhas, raízes e sementes são usadas oralmente como agentes medicinais para o tratamento de bronquite, doenças gastrintestinais e reumatismo. Preparações obtidas de suas sementes apresentaram atividades inseticidas. O extrato de pimenta preta provocou carcinogênese em camundongos. Há evidências de que tumores malignos foram potencializados com o tratamento da pimenta em camundongos em relação ao tratamento com o veículo (revisado por PARMAR *et al.*, 1997).

Os extratos éterico e diclorometânico das folhas e caule de *P. falconeri* apresentaram atividade inseticida para *Musca domestica* e *Aedes aegyptii*. O extrato diclorometânico de *P. acutisleginum* também apresentou atividade inseticida para *M. domestica* e *A. aegyptii*. O extrato de *P. betle* apresentou atividade antihipertensiva e extratos de *P. acutisleginum* apresentaram potente ação inibitória na ligação aflatoxina B₁-DNA (revisado por PARMAR *et al.*, 1997).

O extrato metanólico de *P. aduncum* apresentou atividade citotóxica e antiviral com potente atividade para Poliovírus (LOHEZIC *et al.*, 2002). O extrato metanólico de *P. lanceaefolium* apresentou atividade antifúngica para *Candida albicans* (LOPEZ *et al.*, 2001). O extrato de *P. reticulatum* apresentou efeito no teste inibitório da beta-glucosidase, o qual é utilizado para avaliar atividades

antiobesidade e antidiabética de drogas (GUERRERO *et al.*, 2003). Extrato etanólico de *P. longum* apresentou uma potente atividade tóxica em náuplios de *Artemia sp.*, além de ter sido descrito como agente imunomodulador e antitumoral (PADMAJA *et al.*, 2002; SUNILA & KUTTAN, 2004).

Muitos autores enfatizam que compostos isolados das espécies do gênero *Piper* são agentes biológicos potentes com propriedades anticâncer (LAMPE, 2003). O extrato clorofórmico do caule de *P. aborescens* apresentou atividade citotóxica para células KB e para células P-388 (leucemia linfocítica) *in vitro*. Em estudos fitoquímicos realizados com o gênero *Piper*, verificou-se a presença de várias classes de metabólitos secundários. Os compostos isolados de diferentes espécies foram classificados em doze categorias: alcalóides/amidas, propenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, cavapironas, piperolidas, chalconas e dihidrochalconas, flavonas, flavanonas e compostos miscelâneos (revisado por PARMAR *et al.*, 1997). Estes apresentaram atividades farmacológicas comprovadas como: antimicrobiana, moluscicida, fungicida, inseticida e antiinflamatória (BALDOQUI *et al.*, 1999). Dentre estes, os alcalóides/amidas apresentam vários compostos farmacologicamente ativos.

A guineensina (**15**), um alcalóide/amida isolado de plantas do gênero *Piper*, exibiu atividade larvicida em *Culex pipiens pallens* (CL₅₀ de 0,17 ppm), *A. aegypti* (CL₅₀ de 0,89 ppm) e *A. togoi* (CL₅₀ de 0,75 ppm). Estudos da relação estrutura-atividade indicam que o grupo N-isobutilamina é fundamental para a atividade larvicida, enquanto que o grupo metilenedioxifenil parece não ser essencial para a toxicidade (PARK *et al.*, 2002). A piperonalina (**16**), outro alcalóide/amida isolado de plantas do gênero *Piper*, também apresentou atividade larvicida quando testado em larvas de *A. aegypti* (CL₅₀ de 0.25 mg/L) e *Culex pipiens pallens* (CL₅₀ de 0,21 mg/L) (YANG *et al.*, 2002; LEE, 2000). A amida, dehidropiperonalina (**17**) isolada de frutos de *P. longum* apresentou atividade vasorelaxante coronariana (revisado por PARMAR *et al.*, 1997).

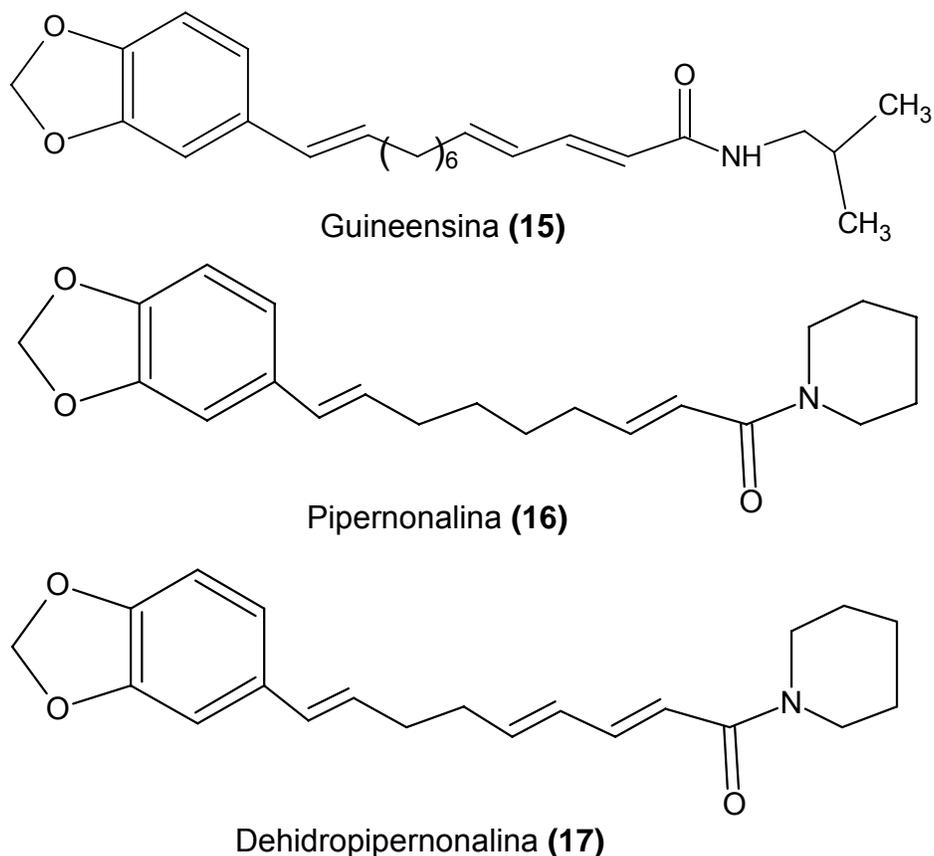
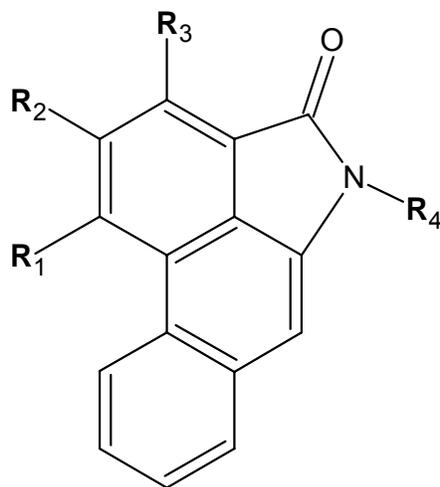


Figura 6 – Estruturas químicas da guineensina **(15)**, piperonalina **(16)** e dehidropiperonalina **(17)**.

A piperolactama A **(18)** causou inibição do crescimento da *Mycobacterium tuberculosis in vitro*, além disso, apresentou atividade citotóxica em várias linhagens tumorais (A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498 e HCT-15). As piperolactama B **(19)** e C **(20)** também apresentaram atividade anti-agregante plaquetária (MATA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2001; TSAI *et al.*, 2005).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Piperolactama A (18)	-OH	-OCH ₃	-H	-H
Piperolactama B (19)	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-H
Piperolactama C (20)	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H

Figura 7 – Estruturas químicas da piperolactama A (**18**), piperolactama B (**19**) e piperolactama C (**20**).

Pipericida (**21**), isolada de *P. nigrum*, apresentou atividade inseticida para *Callosobruchus chinensis*. (2E,8E)-N-9-(3,4-Metilenedioxifenil) nonadienoilpiperidina (**22**), também isolada de *P. Nigrum*, causou dilatação do coração de coelhos. Aduncamide (**23**), um outro alcalóide/amida isolado de *P. aduncum*, apresentou atividade bacteriana para *Bacillus subtilis* e *Micrococcus*

luteus. Este também apresentou atividade citotóxica para células de carcinoma nasofaríngeo (revisado por PARMAR *et al.*, 1997).

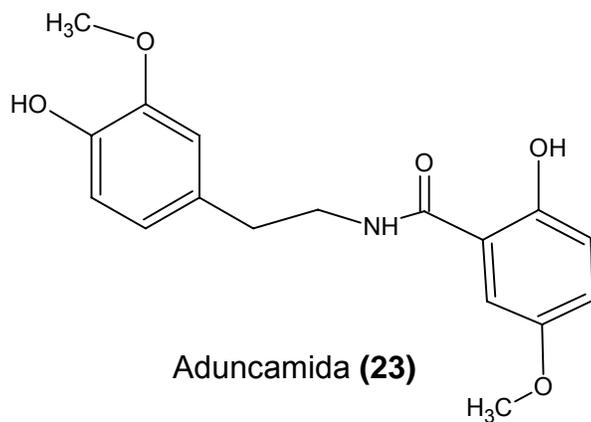
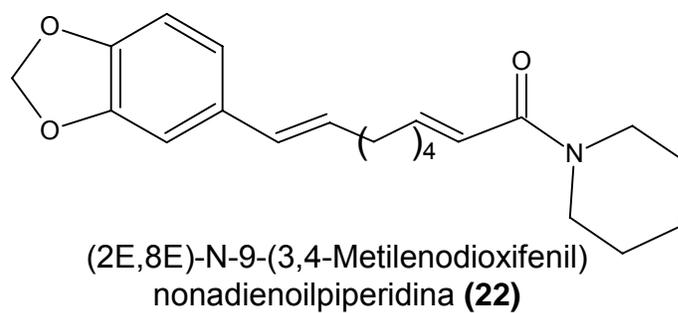
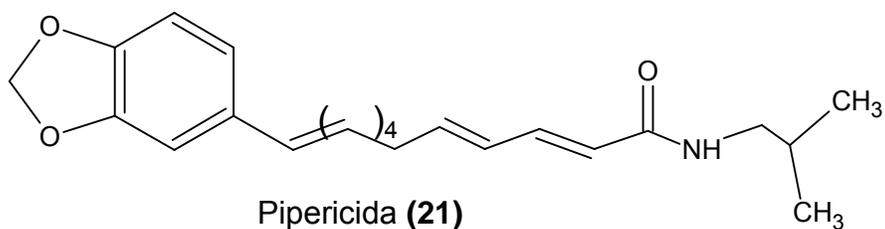


Figura 8 – Estruturas químicas da pipericida (21), (2E,8E)-N-9-(3,4-Metilenodioxifenil)nonadienoilpiperidina (22) e aduncamida (23).

1.5. Piperina

A piperina (**24**) foi a primeira amida isolada do gênero *Piper*. Vários alcalóides/amidas têm sido apresentados como agentes citotóxicos em várias linhagens tumorais (TSAI *et al.*, 2005). A piperina apresenta atividade depressora no sistema nervoso central, atividade antifertilizante, analgésica, antipirética, anti-inflamatória e atividade antioxidante (revisado por PARMAR *et al.*, 1997; MITTAL & GUPTA, 2000).

A piperina também previne carcinogênese de estômago e fígado induzida por carcinógenos químicos (KHAJURIA *et al.*, 1998) e protege da citotoxicidade induzida por aflatoxina B₁ (AFB₁) e genotoxicidade em células de hepatoma de rato H4IIEC3 (SINGH *et al.*, 1994). A piperina foi um agente não genotóxico quando testado no teste de Ames usando *Salmonella typhimurium*, teste do micronúcleo, teste de anormalidades na forma do esperma e teste de letalidade usando camundongos suíços albino (KAREKAR *et al.*, 1996), mas inibe enzimas do metabolismo enzimático hepático (ATAL *et al.*, 1985), podendo assim, causar alterações na sua biodisponibilidade.

Além disso, a piperina tem sido recentemente estudada quanto ao seu efeito inibitório na metástase de pulmão induzida por células melanoma B16F-10 em camundongos (PRADEEP & KUTTAN, 2002), na estimulação, proliferação e diferenciação de melanócitos (VENKATASAMY *et al.*, 2004), toxicidade no ensaio de letalidade usando *Artemia sp* (PADMAJA *et al.*, 2002), efeito protetor em carcinogênese de pulmão induzida por benzo(a)pireno em camundongos suíços albinos (SELVENDIRAN *et al.*, 2004) e atividades imunomodulatória e antitumoral (SUNILA & KUTTAN, 2004).

A piperina também apresentou efeito inibitório na produção de óxido nítrico e TNF- α *in vitro* e *in vivo* (PRADEEP & KUTTAN, 1999), além de apresentar propriedades hipotensoras *in vivo* (DUARTE *et al.*, 2004) e efeitos inibitório na monoamino oxidase (LEE *et al.*, 2005). Pradeep & Kuttan (2004) demonstraram que a piperina também é um inibidor do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) e da expressão

de genes de citocinas pro-inflamatórias em células melanoma B16F-10, o que de acordo com os autores, pode explicar a atividade antimetastática da piperina.

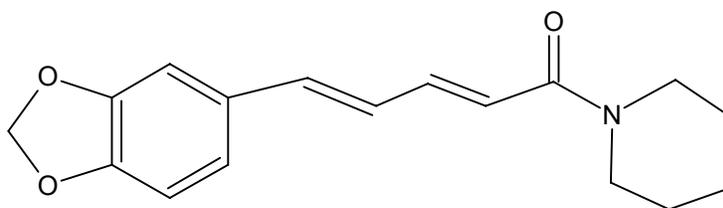


Figura 9 – Estrutura química da piperina (**24**).

1.6. Piplartina

A pipartina (**25**) também é um alcalóide/amida isolado do gênero *Piper* e apresentou potente atividade citotóxica *in vitro* em células tumorais KB (carcinoma nasofarínge), P-388 (leucemia linfocítica), A-549 (carcinoma de pulmão) e HT-29 (carcinoma de colo) (DUH *et al.*, 1990; DUH & WU, 1990).

Recentemente, a pipartina tem sido estudada quanto a sua atividade antifúngica em *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioedes* (NAVICKIENE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002) e a sua atividade anti-agregante plaquetária (TSAI *et al.*, 2005).

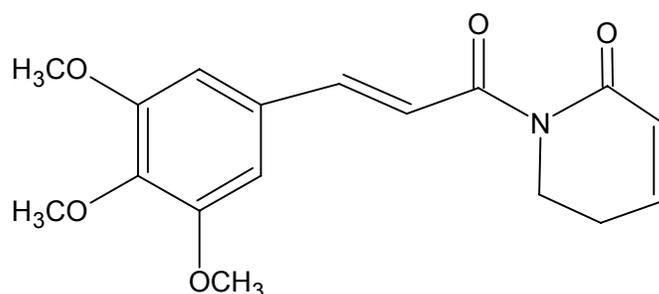


Figura 10 – Estrutura química da pipartina (**25**).

A atividade biológica das substâncias anticâncer envolve, na maioria das vezes, alta citotoxicidade e baixa seletividade, tornando-as desinteressantes do ponto de vista terapêutico. A busca por novos agentes anticâncer em fontes naturais permanecem no intuito da descoberta de novos protótipos com mecanismos de ação mais seletivos, eficácia contra tumores resistentes e menor toxicidade para os pacientes.

Diante de várias substâncias isoladas a partir da flora brasileira é necessário conhecer o potencial farmacológico dessas substâncias com o objetivo de descobrir uma nova molécula guia no tratamento do câncer, que pode inclusive, apresentar novo mecanismo de ação. Sendo assim, o presente trabalho propõe o estudo da atividade citotóxica e antitumoral da piperina e da piperonal, amidas isoladas de espécies de pimentas. Como dito anteriormente, há um crescente interesse na pesquisa do potencial terapêutico de substâncias presentes nos temperos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o potencial anticâncer de duas amidas, piplartina e piperina, de plantas do gênero *Piper* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Específicos

- Determinar e comparar as atividades citotóxicas das amidas em células tumorais e no desenvolvimento embrionário do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.
- Determinar a capacidade hemolítica das amidas.
- Determinar a toxicidade aguda das amidas em náupilo de *Artemia sp.*
- Avaliação do mecanismo de ação da piplartina, usando células HL60 e K-562 como modelo.
- Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* das amidas em animais transplantados com tumor Sarcoma 180.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais utilizados

3.1.1. Equipamentos

Agitador de placa MLW Modelo Thys 2

Aquário marinho

Centrífuga Excelsa Baby I FANEN Modelo 206

Centrífuga de placas Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga de lâminas Shandon Southern Cytospin

Espectrofotômetro de placas Packard Spectra Count

Fluxo laminar VECO

Incubadora de células (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow

Microscópio de fluorescência Olympus Modelo BX41

Microscópio óptico Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

Microscópio óptico de inversão Nikon Diaphot

3.1.2. Soluções

NOMES	CONCENTRAÇÕES	MARCA
Ácido Acético	32 N	REAGEN
Ácido Clorídrico	0,1 N	VE TEC
Água do mar filtrada	-	-
Álcool Etílico	70%	VE TEC
Anticorpo Anti - BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU	SIGMA
	BSA 5% q.s.p. 500 µL de solução	DAKO
Anticorpo secundário biotinilado	1 µL de anticorpo biotinilado	DAKO
Anticorpo monoclonal Anti - Ki-67	1 µL de anticorpo anti-Ki-67	DAKO
	BSA 5% q.s.p. 50 µL de solução	DAKO
Azul de tripan 4%	4 mg de Azul de tripan	SIGMA
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
BrdU	10mM	SIGMA
Brometo de etídio 100 µg/mL	1mg de Brometo de etídeo	SIGMA
	PBS q.s.p 10 mL de solução	-
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB	IMMUNOTECH
	1 mL de Tris-Hcl (Tris 0,05M) pH= 7,6	PROQUIMIOS
	2 µL de H ₂ O ₂	PROQUIMIOS

Doxorrubicina	0,3 µg/mL	ZODIAC
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina	DOLES
	80 mL de EtOH	VETEC
	0,5 mL de Ácido acético	VETEC
	20 mL de H ₂ O	-
Estreptavidina – peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase	DAKO
	BSA 5% q.s.p. 100 µL de solução	DAKO
Formalina neutra 10%	100 mL de Formaldeído 37%	VETEC
	4 g de Fosfato de sódio monobásico	LABSYNTH
	6,5 g Fosfato de sódio dibásico	LABSYNTH
	H ₂ O q.s.p. 900 mL	-
5- Fluorouracil	250 mg/10 mL	ICN FARMACÊUTI CA
Hematoxilina 0,1%	0,5 g de Hematoxilina	DOLES
	10 mL de Glicerina	LABSYNTH
	25 g de Sulfato de alumínio	LABSYNTH
	0,1 g de Iodeto de potássio	LABSYNTH
KCl 0,5M	37,3 g de Cloreto de potássio	LABSYNTH
	H ₂ O q.s.p 1 L de solução.	-

Laranja de Acridina	1g de laranja de acridina (100µg/mL)	FLUKA
	H ₂ O q.s.p. 10mL de solução	-
MTT (5mg/mL)	50mg de MTT	SIGMA
	PBS q.s.p. 10 mL de solução	-
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	CULTILAB
	Estreptomicina 10 mg/mL	CULTILAB
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85%)	LABSYNTH
	1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM)	REAGEN
	H ₂ O q.s.p 1 L de solução	-
Soro fetal bovino	-	CULTILAB
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	LABSYNTH
	Citrato de sódio 0,15 M	GRUPO QUÍMICA
	H ₂ O	-
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio	LABSYNTH
	2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O	LABSYNTH
	0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O	LABSYNTH
	H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	LABSYNTH
	Tris 0,5 M (pH= 7,6)	PROQUÍMIOS
	H ₂ O	-

Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5%	CULTILAB
	0,125 g de EDTA	PROQUÍMIOS
	500 mL de PBS	-
Triton X -100 1%	1 mL de Triton X-100	ISO FAR
	H ₂ O q.s.p. 100 mL de solução	-

3.1.3. Modelos biológicos experimentais

Camundongos *Mus musculus Swiss*

Cistos de *Artemia sp.*

Ovos do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

Linhagens celulares tumorais cultivadas (tabela 1)

Tabela 1 - Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Linhagem	Tipo Histológico	Origem
HL-60	Leucemia promielocítica	humana
K-562	Leucemia mielocítica crônica	humana
CEM	Leucemia linfocítica	humana
JUKART	Leucemia de células T	humana
MOLT-4	Leucemia de células T	humana
HCT-8	Carcinoma de cólon	humana
B16	Melanoma	murina

3.2. Metodologia Experimental

3.2.1. Obtenção da piplartina e da piperina

Para obtenção da piplartina raízes de *Piper tuberculatum* foram coletadas em setembro de 2004 no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará, Brasil. A exsicata (nº 34736) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

420,0 g de raízes de *P. tuberculatum* foram macerados com uma mistura de éter de petróleo e acetato de etila 1:1 (1,5 L) por 24 h (3x). A mistura de solventes foi removida por rotoevaporação produzindo um sólido amarelado (13,24 g), o qual foi cristalizado com metanol quente para obter piplartina (4,35 g, e ponto de fusão de 122,2 – 122,6 °C). A estrutura da piplartina foi determinada por análise espectroscópica e comparação dos dados da literatura (BRAZ-FILHO *et al.*, 1981).

O estudo fitoquímico foi realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação do professor Dr. Edilberto Rocha Silveira.

A piperina, isolada de sementes de *P. guinees*, usada neste trabalho foi obtida da Acros Organics (New Jersey, USA).

3.2.2. Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

3.2.2.1. Estudo da toxicidade aguda em larvas de *Artemia sp.*

O gênero *Artemia* é classificado como pertencente ao Filo Artropoda, Subfilo Crustacea, Classe Branchiopoda (RUPERT & BARNES, 1996). *Artemia sp.* é um pequeno crustáceo que tem sido bastante utilizado em muitos estudos fisiológicos. A *Artemia sp.* possui o desenvolvimento indireto, com capacidade de encistamento. Os náuplios (larvas características) são facilmente obtidos através da hidratação dos cistos. Passam por vários estágios larvais, antes da maturação. No primeiro estágio, náupilo I (24 horas), o trato digestivo desses animais não entra em contato com o meio externo e sua alimentação consiste basicamente do vitelo do próprio ovo. Com a mudança para o estágio II (48 horas), os náupilos começam a se alimentar de matéria orgânica em suspensão, através da ingestão contínua da água circulante. Sendo os náupilos mais sensíveis nesse estágio, os mesmos são utilizados nos testes de toxicidade. É uma metodologia simples que permite a avaliação da toxicidade aguda de extratos brutos, frações ou substâncias puras provenientes de produtos naturais.

3.2.2.1.1. Procedimento Experimental

Os cistos de *Artemia sp.* foram mantidos por 24h em um béquer com água do mar filtrada, sob aeração suave e iluminação intensa, até a eclosão dos náuplios I. Estas larvas foram separadas em um segundo béquer e mantidas ali

por mais 24h para atingirem o estágio de náuplio II. O plaqueamento foi realizado pela adição de 10 náuplios/poços, contados a olho nú, em placas com 24 poços, contendo os compostos em concentrações diferentes (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL), em triplicata. Como controle negativo, foi utilizada água do mar filtrada e o veículo usado para diluir as substâncias (DMSO 1%). As placas foram incubadas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), por 24h. Depois foram contados os animais vivos (animais em movimento) e mortos correspondentes a cada poço (Como descrito em JIMENEZ *et al.*, 2003).



Figura 11 – Fotografia de um náuplio de *Artemia sp.*

3.2.2.1.2. Análise dos dados

O cálculo da dose que causa letalidade de 50% dos náuplios (DL_{50}) foi obtido pelo método dos probitos (LITCHFIELD & WILCOXON, 1949).

3.2.2.2. Avaliação da atividade antimetabólica nos ovos do ouriço-do-mar

Foram utilizados exemplares da espécie *Lytechinus variegatus* (figura 12), coletados na praia da Lagoinha, litoral cearense. Esses animais são facilmente coletados e mantidos em aquários no laboratório. Além disso, apresentam ovos não muito pigmentados, facilitando a visualização dos estágios de

desenvolvimento. Esse teste pode dar uma visão geral sobre o mecanismo de ação da droga, dependendo do estágio em que a droga inibe o desenvolvimento.

3.2.2.2.1. Procedimento Experimental

A eliminação dos gametas foi induzida pela injeção de até 3 mL de KCl 0,5 M na cavidade celômica (perivisceral) dos ouriços. Após o término da eliminação dos gametas, os óvulos foram lavados em uma proveta com água do mar filtrada. Esse processo foi repetido por mais duas vezes, para remoção da camada gelatinosa que envolve o óvulo. Após a última lavagem, os óvulos foram ressuspensos em 50 mL de água do mar filtrada. Os espermatozoides concentrados foram coletados e mantidos em baixa temperatura, 4°C, até o momento do uso. A fecundação foi realizada pela adição de 1 mL da suspensão de espermatozoides (0,05 mL de suspensão concentrada dos espermatozoides/ 2,45 mL de água do mar) à suspensão de óvulos (50 mL). Após cerca de dois minutos, a fecundação foi confirmada pela presença da membrana da fecundação (figura 13b), através da observação de uma amostra das células em microscópio óptico. Os ovos (1 mL) foram distribuídos numa placa com 24 cavidades, contendo as substâncias teste em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo do experimento nas concentrações de 0,1, 0,3, 1, 3 e 10 µg/mL. Os ovos foram incubados num volume final de 2 mL, mantidos à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) sob agitação constante. Nos intervalos correspondentes a primeira e terceira divisões (figuras 13c e 13e) foram fixadas alíquotas de 0,2 mL em formalina 10%. Já na blástula (figura 13f), 0,1 mL de formaldeído foi adicionado ao volume restante na placa. Cem embriões foram contados em cada amostra para obtenção da porcentagem de células divididas (Como descrito em JIMENEZ *et al.*, 2003).



Figura 12 – Fotografia de um ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*)

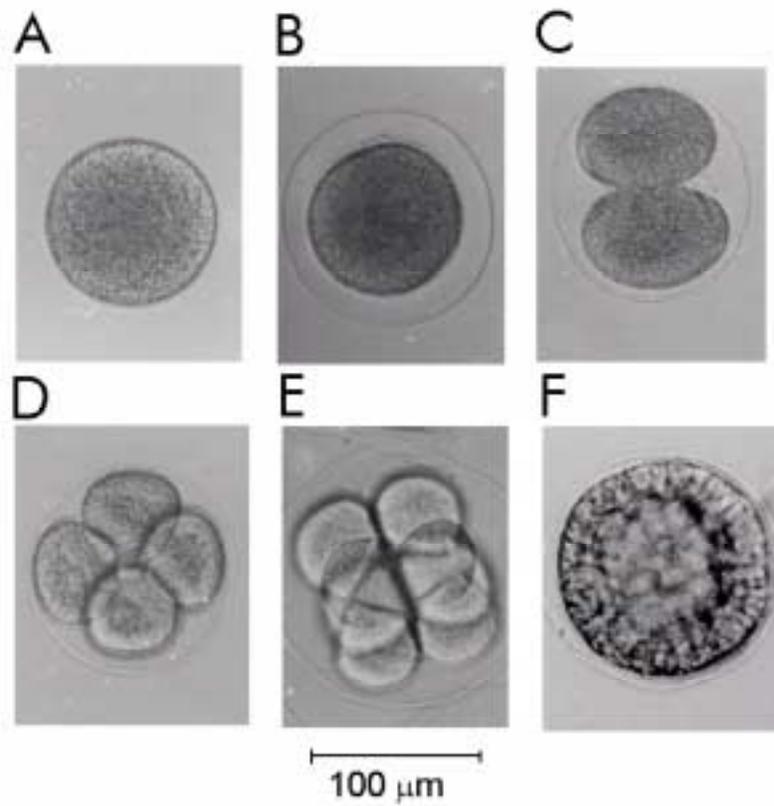


Figura 13 - Fotomicrografias das primeiras fases do desenvolvimento embrionário do ouriço *Lytechinus variegatus*. A - óvulo; B - ovo com membrana de fecundação; C - 1^a. divisão; D - 2^a. divisão; E - 3^a. divisão; F - blástula.

3.2.2.2. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos. O cálculo da CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seu respectivo intervalo de confiança (IC) 95% foi realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.2.2.3. Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos *Mus musculus* Swiss

Esta metodologia, segundo descrita por Costa-Lotufo *et. al.* 2002; Dresch *et al.* 2005, permitiu avaliar o potencial das substâncias-teste em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

3.2.2.3.1. Procedimento Experimental

Foi coletado o sangue de três camundongos (*Mus musculus* Swiss) por via orbital (animais previamente anestesiados com éter etílico), sendo diluído em 1:30 de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (15 g/3 min.) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados em multiplacas com 96 cavidades. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL das substâncias teste em

solução. Da 4^a fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X – 100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3^a à 11^a cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 1,5 a 200 µg/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 hora, sob agitação constante à temperatura ambiente ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$), as amostras foram centrifugadas (50 g/3 min.) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância da hemoglobina no espectrofotômetro de placas a 540 nm. A atividade das substâncias teste foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo.

3.2.2.4. Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais

A citotoxicidade foi obtida através do método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) (MOSMANN, 1983) utilizando as seguintes linhagens celulares: CEM (leucemia – humana), HL-60 (leucemia – humana), HCT-8 (cólon – humana) e B-16 (melanoma – murino) obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD). O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão); utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com

atmosfera de 5% de CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas, quando necessário as células foram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ céls/ mL (BUTLER & DAWSON, 1992).

3.2.2.4.1. Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de 0,3 x 10⁶ células/mL, para células suspensas (CEM e HL60), 0,7 x 10⁵ células/mL para HCT-8 e 0,6 x 10⁵ células/mL para B-16. As substâncias testes foram incubadas durante 72 horas juntamente com a suspensão de células com concentrações variando de 0,39 a 25 µg/mL. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 0,25 µg/mL. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (15 g/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (30 g/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspenso em 150µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

3.2.2.4.2. Análise dos dados

As drogas foram testadas em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão

não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.2.3. Estudo do mecanismo de ação em células leucêmicas

3.2.3.1. Curva de Crescimento Celular

A construção da curva de crescimento celular pode fornecer informações importantes sobre a cinética da cultura de células em questão. A observação, em curtos intervalos, dessas culturas tratadas permite avaliar a ação citotóxica temporal da droga assim como o acompanhamento das alterações morfológicas das células a medida que vão acontecendo.

3.2.3.1.1. Procedimento Experimental

Inicialmente, as células HL-60, K-562, JUKART ou MOLT-4 foram distribuídas em multiplacas de 24 cavidades numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL e incubadas com a piplartina nas concentrações de 0,1, 0,3, 1, 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Nos intervalos programados de 3h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h após o plaqueamento, uma alíquota de cada amostra foi retirada e as células viáveis foram diferenciadas por exclusão de azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer.

3.2.3.1.2. Análise dos dados

O valor obtido para cada contagem foi plotado em um gráfico e construído uma curva com as variáveis: percentagem de células viáveis x log da

concentração, para cada tempo analisado, para a observação da cinética de crescimento das células tratadas. Foi determinado também suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os valores das CI_{50} foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.2.3.2. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de tripán permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripán para fora, sendo possível dessa maneira observar uma coloração azulada nas células mortas.

3.2.3.2.1. Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60 ou K-562, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, foram incubadas por 24 h com as drogas e examinadas ao microscópio de inversão. As concentrações utilizadas (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada nas curvas de crescimentos para estas mesmas linhagens celulares. Foi retirado 90 μL da suspensão de células e adicionado a 10 μL do azul de tripán. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. A Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (como descrito em VERAS *et al.*, 2004).

3.2.3.2. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.2.3.3. Inibição da síntese de DNA – BrDU

A bromodeoxiuridina (BrDU) é uma base nitrogenada análoga a Timina. Quando as células estão sintetizando DNA o BrDU é incorporado no lugar da timina. A detecção do BrDU incorporado nas células é feita por técnicas imunohistoquímicas. O BrDU é adicionado 3h antes do término do período de incubação (24 horas), para que esse seja incorporado ao DNA das células em mitose. Em seguida são adicionados os anticorpos e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB). Para corar as células não marcadas pelo cromógeno, utiliza-se Hematoxilina (0,1%). São contadas as 200 (duzentas) primeiras células observadas em microscópio óptico. Considera-se positivas para proliferação, as células de núcleo corado pelo DAB (cor marrom) e, negativas, as células de núcleo corado com Hematoxilina (cor azul).

3.2.3.3.1. Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60 ou K-562, plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ cél/mL, foram incubadas por 24h com a piplartina. As concentrações utilizadas (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada nas curvas de crescimentos para estas mesmas linhagens celulares. Três horas após a adição do BrdU (0,01 μM) na cultura de células HL60 ou K-562, lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem foram fixadas em metanol por 1 minutos. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a 60°C e

pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e incubadas com anticorpo primário e deixadas na geladeira durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotilado por 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Foi adicionado o cromógeno DAB por 1-5 minutos e, em seguida, removido com água destilada. A contracoloração das células foi realizada com hematoxilina da Hanks a 0,1%. A Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (como descrito em VERAS *et al.*, 2004).

3.2.3.3.2. Análise dos dados

Duzentas células foram contadas diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrDU) e não-marrom. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.2.3.4. Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina

A coloração utilizada nesse experimento permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea.

3.2.3.4.1. Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60 ou K-562, plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ cél/mL, foram incubadas por 24h com as drogas e examinadas ao microscópio de inversão. As concentrações utilizadas (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada nas curvas de crescimentos para estas mesmas linhagens celulares. Para observar a morfologia, 50 μL da suspensão de células foram adicionadas a centrífuga de lâmina (cytospin). Após a adesão das células na lâmina a fixação foi feita com metanol por 1 minutos e a coloração primeiramente utilizada foi a hematoxilina, seguida pela eosina. A Doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (como descrito em VERAS *et al.*, 2004).

3.2.3.4.2. Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

3.2.3.5. Análise morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

O método de coloração pelo brometo de etídio / laranja de acridina (MCGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência. Este método baseia-se na revelação das células (controle e tratadas) com a coloração por brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) no núcleo. A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente

ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA; O BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa a membrana íntegra. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE; morfológicamente observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (KUMMAR *et. al.* 2004).

3.2.3.5.1. Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60 ou K-562, plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ cél/mL, foram incubadas por 24h com as drogas. As concentrações utilizadas (2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada nas curvas de crescimentos para estas mesmas linhagens celulares. A suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 μL de solução de PBS. Em seguida, 1 μL da solução de BE:LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferido para uma lâmina e montado com lamínula e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares. A Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (como descrito em GENG *et al.*, 2003).

3.2.3.5.2. Análise dos Dados

Foram contadas 300 células, em duplicata, cada amostra para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas)

e montadas lâminas que foram fotografadas para o registro visual dos efeitos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.2.4. Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

3.2.4.1. Obtenção e manutenção dos animais

Os testes para avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram realizados utilizando camundongos (*Mus musculus* Swiss) fêmeas pesando entre 25-30g oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará, mantidos com água e alimento *ad libitum*. O manejo dos animais foi realizado procurando seguir a todos princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais.

O tumor sólido do tipo Sarcoma 180, com 10 dias de implante na forma ascítica foi utilizado para determinar a atividade antitumoral da piplartina e da piperina.

O animal de manutenção ou doador foi anestesiado com éter etílico e sacrificado por meio de deslocamento cervical. Fez-se o procedimento asséptico com álcool iodado e, em seguida, coletou-se o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem das células. Os animais receptores foram inoculados com 2×10^6 células/0,5 mL na região intraperitoneal dos camundongos (*Mus musculus* Swiss). Conforme aprovado pelo comitê de ética de pesquisas em animais da UFC (CEPA).

3.2.4.2. Avaliação do efeito da piplartina e piperina em camundongos transplantados com Sarcoma 180

A avaliação da atividade antitumoral está relacionada à regressão total de tumores nos animais, à redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os não tratados. Ficou demonstrado que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral (SCHABEL *et al.*, 1977). O tumor utilizado foi o Sarcoma 180 o qual foi descoberto em 1914 no *Crocker Laboratory (Columbia University, New York)*, é originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos, e foi inicialmente classificado como carcinoma mamário. Após vários transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa, por volta de 1919, e mantém-se sem alterações até os dias de hoje.

3.2.4.2.1. Procedimento Experimental

Para o teste de atividade antitumoral, foi utilizado o tumor sólido do tipo Sarcoma 180, com 8 dias de implantação na região axilar direita. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizado assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparado uma suspensão de células com 5,0mL de Ringer lactato, 0,2mL de gentamicina (5mg/mL) e 0,5mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas 2×10^6 céls/0,5mL na região axilar esquerda dos camundongos (*Mus musculus* Swiss). Nesse experimento, foram utilizados 10 animais por grupos, num total de 6 grupos, sendo todas fêmeas, apresentando massa corpórea variando entre 25-30 g, os quais foram inoculados com tumor Sarcoma 180. Em seguida, 24 h após a inoculação do tumor foi iniciado o tratamento durante 7 dias consecutivos, utilizando as doses de 50 ou 100 mg/Kg para piplartina ou peperina e no controle positivo 25 mg/Kg de 5 - Fluorouracil, além dos animais tratados com veiculo

(DMSO 10%). Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal. Vinte quatro horas após o término do tratamento os animais foram sacrificados, sendo em seguida retirados os tumores, rins, fígado e baço para pesagem, análise histológica e realização da imunohistoquímica dos tumores através do marcador para proliferação tumoral: ki-67.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde:

A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

3.2.4.2.2. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.2.4.3. Detecção de Ki-67 por imunohistoquímica

O marcador denominado Ki-67 foi descrito por Gerdes *et al.* em 1983. A expressão deste antígeno está intimamente associada com o ciclo celular, podendo ser usado para medir a fração de crescimento das células. Sua expressão ocorre durante a fase G1 e progride durante o ciclo celular, alcançando o máximo em G2 e M, diminuindo rapidamente após a mitose, não sendo

expresso em G0 (FALINI *et al.*, 1989; QUINN & WRIGHT, 1990). A quantificação deste antígeno é útil para avaliar proliferação celular.

3.2.4.3.1. Procedimento Experimental

O tecido tumoral parafinizado dos animais dos grupos controle negativo (DMSO 10%), controle positivo (5 – Fluorouracil-25 mg/Kg) e dos animais tratados com piplartina ou piperina (100 mg/Kg) foram colados às lâminas e em seguida desparafinizados e rehidratados e acondicionados em jarras plásticas de Colpe (furadas no fundo) com tampão citrato em pH 6,0 cobrindo todas as lâminas dentro de um béquer. O béquer foi levado ao microondas em potência máxima por 10 minutos até atingir ebulição, a partir daí deixou-se por mais 7 minutos. Retirou-se o béquer com o material sendo deixado por 20 minutos em temperatura ambiente. O tampão citrato foi descartado e as lâminas foram lavadas com TBS (de forma indireta e com cuidado para não remover os cortes histológicos). Acrescentou-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol com a finalidade de bloquear a peroxidase endógena (interferente do experimento) por 10 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com TBS e enxugando-as em seguida e retirando o excesso de parafina oriunda do processo de fixação. As lâminas foram circundadas com caneta hidrofóbica adicionando o TBS sobre a região circundada. Posteriormente, o TBS foi aspirado e as lâminas foram incubadas em câmara úmida com soro normal de coelho – BSA (1:5) por 20 minutos (70µL de soro/lâmina). O BSA foi aspirado e o material foi incubado novamente em câmara úmida com anticorpo primário (1:5), sendo mantido por um período de 16 - 24 horas em refrigerador ($\pm 8^{\circ}\text{C}$). Após o período determinado, o material foi retirado da geladeira deixando-se por 15 minutos em temperatura ambiente. Removeu-se o anticorpo primário, lavando-se o material com TBS (deixando-se por 5 minutos) sendo retirado, e em seguida incubou-se novamente as lâminas com anticorpo secundário (coelho anti-mouse biotilado), onde foi deixado por 30 minutos; As lâminas foram lavadas com TBS, acrescentou-se então Estreptavidina e 30 minutos depois o material foi lavado com TBS por 5 minutos em borel vertical com

ranhura. Adicionou-se o fotoreagente (DAB) por 3 minutos (ou até os fragmentos adquirirem coloração mais escura). Retirou-se então o DAB e corou-se o material em hematoxilina na concentração de 1:1, deixando-se o material secar a temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram lavadas 3 vezes em etanol absoluto 100% e em xilol 100% para desidratação. Finalmente as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá.

3.2.4.3.2. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da contagem de células Ki67 positivo presente em cada 4-6 campos por lâmina de cada grupo. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.2.4.4. Análise morfológica e histopatológica

A técnica de coloração hematoxilina e eosina (H/E) permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise morfológica e histopatológica de tecidos dos animais tratadas permitem identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir os efeitos tóxico causados pela droga.

3.2.4.4.1. Procedimento Experimental

Após o sacrifício dos animais, ocorreu a retirada e pesagem de órgãos e tumores, os quais foram armazenados em formol a 10%. As peças foram retiradas do formol e seccionadas em pequenas fatias para posterior preparação das lâminas. O material foi fixado em formol a 10% por 24 horas, desparafinado em xilol por 15 minutos, e desidratado em concentrações crescentes de álcool até

70% (mergulhando-se rapidamente as lâminas), sendo posteriormente lavadas em água destilada até ter sido removido todo o álcool. Posteriormente as lâminas foram coradas com Hematoxilina 0,1%.

3.2.4.4.2. Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

4.1.1. Toxicidade Aguda em *Artemia sp.*

No teste de toxicidade aguda em larvas de *Artemia sp.*, a piperina apresentou valor para a dose letal média (DL₅₀) de $2,8 \pm 0,3$ µg/ml (9,8 µM). A piplartina apresentou toxicidade com valores de DL₅₀ correspondente a $32,3 \pm 3,4$ µg/ml (101,7 µM) (figura 14).

4.1.2. Potencial Antimitótico em Ovos de Ouriço do Mar

Esse ensaio avaliou o potencial antimitótico da piplartina e piperina. Para este ensaio, foram consideradas ativas aquelas substancias que foram capazes de inibirem completamente a mitose na concentração mínima de 16 µg/ml (JACOBS *et al.*, 1981). Ambas as amidas, piplartina e piperina, induziram inibição do desenvolvimento dos ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus* durante todas as fases examinadas, primeira e terceira divisão e blástula. Os valores de CI₅₀ estão na tabela 2. Doxorubicina foi usada como controle positivo.

Piperina induziu irregularidades na membrana associada com a inibição da mitose iniciando desde a primeira divisão, enquanto que nos ovos tratados com piplartina a irregularidade na membrana só foi visualizada algumas horas depois do contato (figura 15).

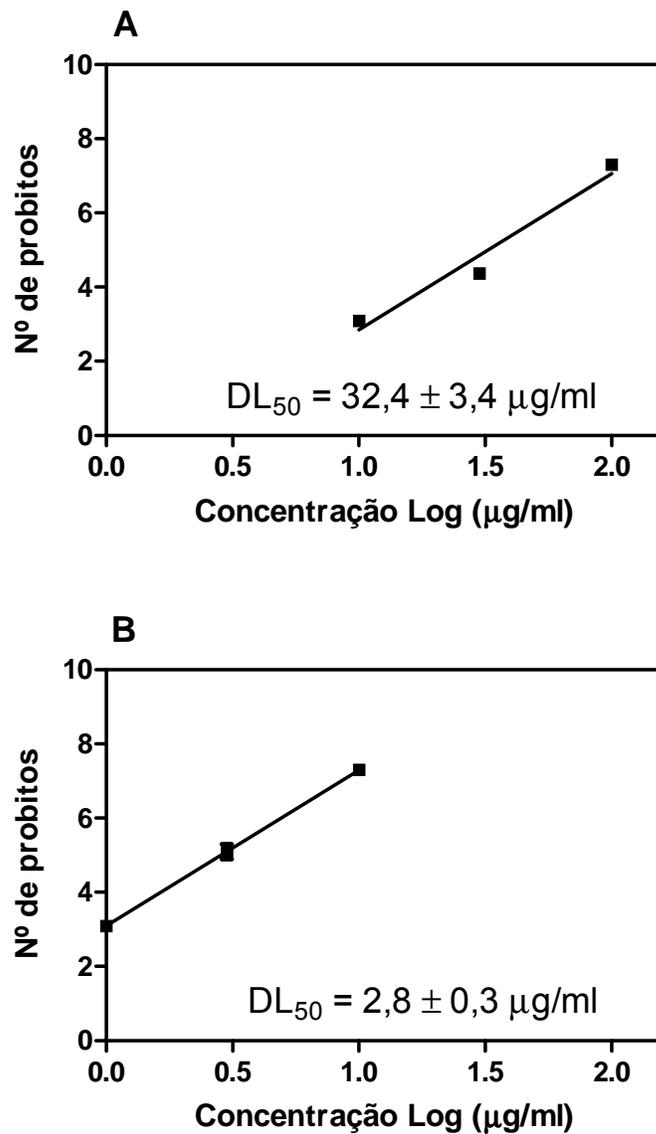


Figura 14 – Toxicidade aguda da piplartina (A) e da piperina (B) em *Artemia sp.* Os valores de DL_{50} foram obtidos pelo método dos probitos, após 24 horas de incubação. Os dados correspondem à média e ao erro-padrão da média de dois experimentos independentes realizado em triplicata. As curvas foram obtidas por regressão linear através do programa GraphPad Prism.

Tabela 2 – Atividade antimetabólica da pirlartina e da piperina no desenvolvimento de ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. Doxorubicina foi usada como controle positivo. A tabela esta apresentando os valores de CI_{50} e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em triplicata para as primeira e terceira divisões e blástula obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prism.

Estágio	Doxorubicina	Piplartina	Piperina
Embrionário	CI_{50} [μg/ml (μM)]	CI_{50} [μg/ml (μM)]	CI_{50} [μg/ml (μM)]
1 ^a Divisão	6,3 (10,8)	3,4 (10,6) ^a	6,8 (23,9)
	4,3 – 9,1	3,0 – 3,8	5,4 – 8,2
3 ^a Divisão	0,3 (0,7) ^a	2,5 (7,8) ^a	5,7 (20,1) ^a
	0,2 – 0,7	2,0 – 3,0	4,8 – 6,7
Blástula	0,5 (0,9)	1,0 (3,3)	3,7 (13,1) ^a
	0,3 – 1,1	1,0 – 1,1	2,9 – 4,6

a, ($p < 0,05$) comparado entre as substâncias por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

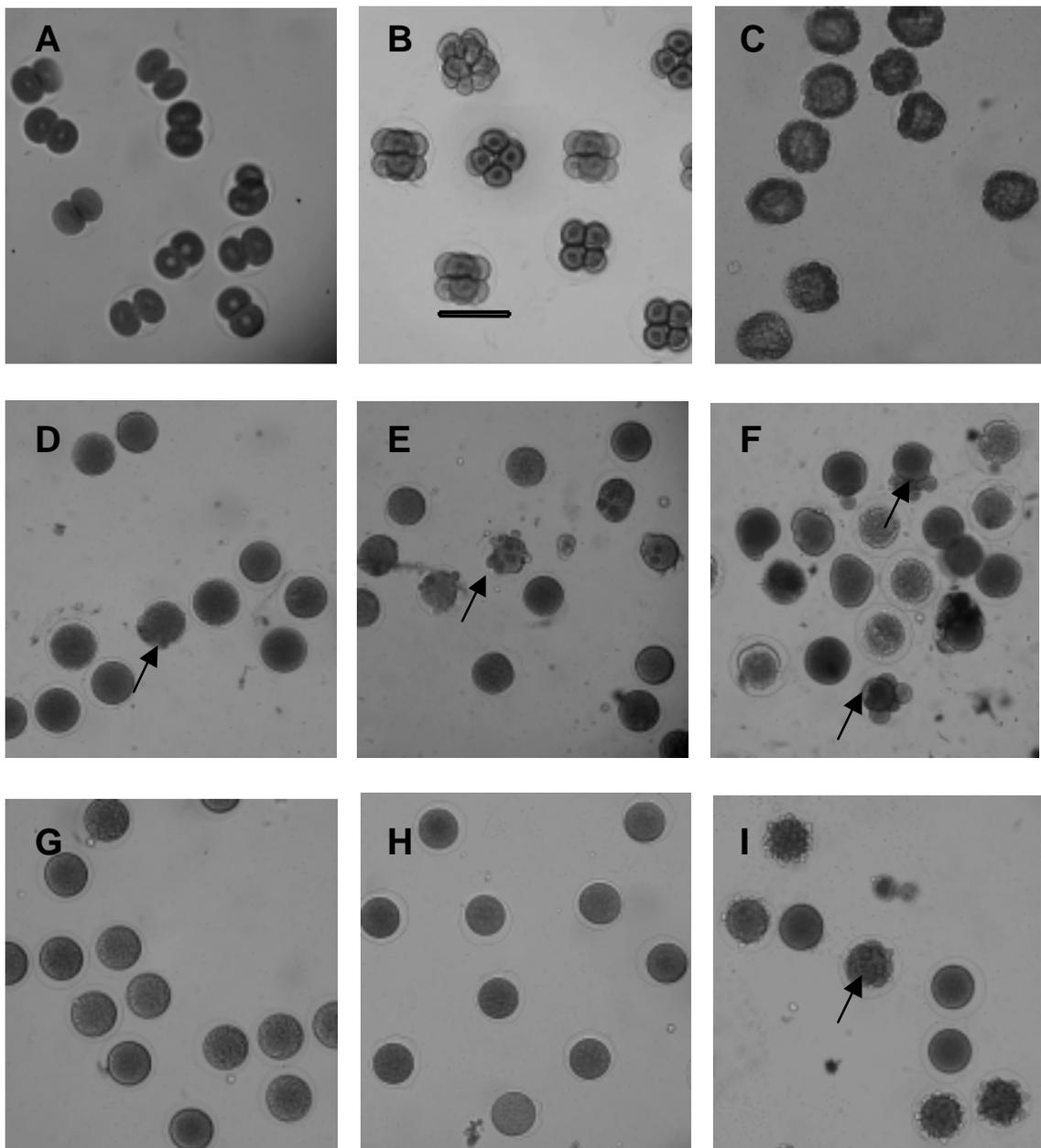


Figura 15 – Fotomicrografia apresentando o efeito da piperartina e da piperina no desenvolvimento de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. A, B e C controle; D, E e F, tratados com piperina (30µg/ml) (105,1 µM); G, H e I, tratados com piperartina (30µg/ml) (94,5 µM) as primeira e terceira divisões e blástula, respectivamente. Barra horizontal = 100µm.

4.1.3. Atividade Hemolítica

O efeito hemolítico da piplartina e piperina foi avaliado em eritrócitos de camundongos *Mus musculus*. Neste ensaio, observou-se ausência de atividade hemolítica nas concentrações testadas (200 µg/ml) perante ambas as amidas, piplartina (629,9 µM) e piperina (700,5 µM). Para este ensaio, foram consideradas ativas aquelas substâncias que apresentaram $CE_{50} < 200 \mu\text{g/ml}$.

4.1.4. Inibição da Proliferação de Células Tumorais *in vitro* – Ensaio do MTT

O potencial citotóxico da piplartina e piperina foi avaliado em células de linhagens tumorais humanas e murina (HL-60, CEM, HCT-8 e B-16) através do método do MTT, após 72 horas de exposição. A tabela 3 apresenta os valores de CI_{50} obtidos.

Como observado no ensaio de atividade antimetabólica em ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*, a piplartina foi mais ativa apresentando alta citotoxicidade em todas as linhagens testadas, sendo que os valores de CI_{50} variaram de 0,7 a 1,7 µg/mL. Já a piperina mostrou toxicidade seletiva apenas para as células da linhagem de cólon (HCT-8) e células da linhagem de pele (melanoma B-16), com CI_{50} de 18,8 µg/ml e 19,9 µg/ml, respectivamente. A doxorubicina foi usada como controle positivo. Para este ensaio, foram consideradas ativas aquelas substâncias que apresentaram $CI_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$ (BOIK, 2001).

Tabela 3 – Atividade citotóxica da piplartina e da piperina em linhagens de células tumorais. Doxorubicina foi usada como controle positivo. A tabela esta apresentando os valores de CI_{50} e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em triplicata pelo método do MTT após 72 horas de incubação para as células HL-60, CEM, HCT-8 e B-16 obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prism.

Células	Doxorubicina	Piplartina	Piperina
	CI_{50} [$\mu\text{g/ml}$ (μM)]	CI_{50} [$\mu\text{g/ml}$ (μM)]	CI_{50} [$\mu\text{g/ml}$ (μM)]
CEM	0,02 (0,04) ^a	1,4 (4,5) ^a	>25,0 (87,6)
	0,02 – 0,03	1,3 – 1,5	
HL-60	0,02 (0,04) ^a	1,7 (5,4) ^a	>25,0 (87,6)
	0,01 – 0,02	1,5 – 1,9	
HCT-8	0,01 (0,02) ^a	0,7 (2,2) ^a	18,8 (66,0) ^a
	0,01 – 0,02	0,6 – 0,8	12,5 – 28,2
B-16	0,03 (0,06) ^a	1,7 (5,3) ^a	19,9 (69,9) ^a
	0,02 – 0,04	1,4 – 2,0	17,0 – 23,3

a, ($p < 0,05$) comparado entre as substâncias por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

4.2. Estudo do mecanismo de ação em células leucêmicas

O mecanismo de ação da piplartina foi, então, estudado usando células leucêmicas como modelo. Vale ressaltar que a piperina não foi estudada nas células leucêmicas, uma vez que nas concentrações testadas no ensaio do MTT não se observou atividade.

4.2.1. Curva de crescimento celular

Este ensaio avaliou a cinética de crescimento das células tratadas com piplartina nos intervalos de tempo de 3h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h em células leucêmicas. A piplartina causou uma significativa redução na viabilidade celular em todas as linhagens celulares de leucemia humana testadas, que ocorreu de modo dependente da concentração e do tempo (Figura 16).

Nas células expostas à piplartina por 3h, 6h e 12h não foram observadas alterações na viabilidade celular. Depois de 24h de exposição à piplartina, ocorreu uma significativa redução no número de células viáveis nas concentrações de 1, 3 e 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$). Assim, baseado nos dados de três experimentos independentes realizados em duplicata, os valores de CI_{50} após 24h foram de 5,3 $\mu\text{g/ml}$ (16,6 μM), 5,5 $\mu\text{g/ml}$ (17,4 μM), 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (7,8 μM) e 4,1 $\mu\text{g/ml}$ (12,9 μM) para as células leucêmicas HL-60, K-562, JUKART e MOLT-4, respectivamente (Tabela 4). Depois de uma exposição de 36h, a citotoxicidade da piplartina foi mais potente do que aquela encontrada no tempo de exposição de 24h ($p < 0,05$). Os valores de CI_{50} no tempo de 36h foram de 2,0 $\mu\text{g/ml}$ (6,2 μM), 2,1 $\mu\text{g/ml}$ (6,6 μM), 1,5 $\mu\text{g/ml}$ (4,8 μM) e 1,8 $\mu\text{g/ml}$ (5,8 μM) para as células HL-60, K-562, JUKART e MOLT-4, respectivamente (Tabela 4). Entretanto, depois de 36 horas de exposição o efeito citotóxico da piplartina tornou-se similar as demais tempos 48h, 60h e 72h (Figura 16). Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade citotóxica da piplartina entre as diferentes linhagens de células leucêmicas humana ($p > 0,05$).

Tabela 4 – Atividade citotóxica da piplartina em diferentes linhagens de células de leucemia humana. Os dados correspondem aos valores de CI_{50} (média \pm E.P.M.) de três experimentos independentes realizados em duplicata para as células de leucemia humana HL-60 (leucemia promielocítica), K-562 (leucemia mielocítica crônica), JUKART (leucemia de células T) e MOLT-4 (leucemia de células T).

Tempo	HL-60	K-562	JUKART	MOLT-4
	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$
3 horas	>10 (31,5)	>10 (31,5)	>10 (31,5)	>10 (31,5)
6 horas	>10 (31,5)	>10 (31,5)	>10 (31,5)	>10 (31,5)
12 horas	>10 (31,5)	>10 (31,5)	$7,5 \pm 0,6^a$ (23,5)	>10 (31,5)
24 horas	$5,3 \pm 0,7^a$ (16,6)	$5,5 \pm 0,9^a$ (17,4)	$2,5 \pm 0,04^a$ (7,8)	$4,1 \pm 0,9^a$ (12,9)
36 horas	$2,0 \pm 0,2$ (6,2)	$2,1 \pm 0,3$ (6,6)	$1,5 \pm 0,05$ (4,8)	$1,8 \pm 0,1$ (5,8)
48 horas	$1,2 \pm 0,2$ (3,69)	$2,0 \pm 0,9$ (6,4)	$1,6 \pm 0,1$ (5,0)	$1,0 \pm 0,1$ (3,2)
60 horas	$0,9 \pm 0,1$ (2,7)	$1,9 \pm 0,1$ (6,0)	$1,4 \pm 0,05$ (4,5)	$1,0 \pm 0,2$ (3,1)
72 horas	$0,4 \pm 0,02$ (1,4)	$1,8 \pm 0,2$ (5,7)	$1,7 \pm 0,2$ (5,4)	$0,5 \pm 0,03$ (1,7)

a, ($p < 0,05$) ANOVA seguido por Student Newman Keuls comparado entre as horas de cada linhagem. Os valores de CI_{50} foram determinados por regressão não-linear usando o programa Prism versão 4.0 (Graphpad Software, Inc).

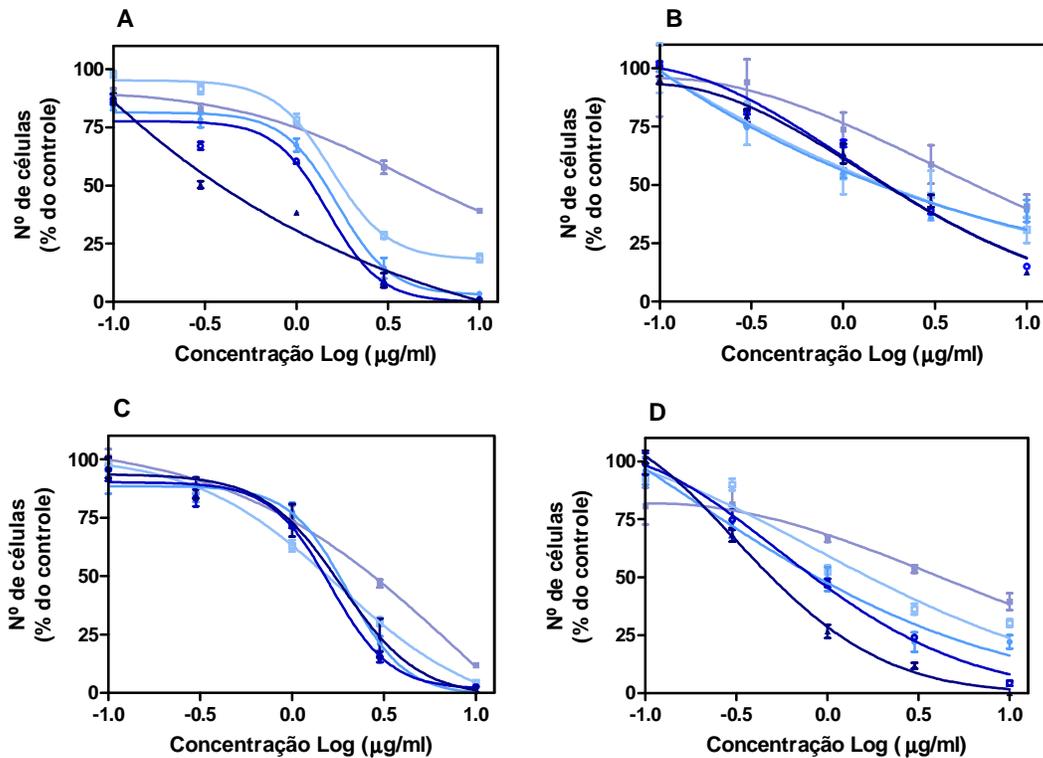


Figura 16 – Curva de crescimento de células de leucemia humana tratadas com piplartina. A viabilidade celular foi determinada por exclusão de azul de tripan nos tempos de 24 (■), 36 (□), 48 (●), 60 (○) e 72 (▲) horas após a incubação. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizado em duplicata para as células de leucemia humana HL-60 (A), JUKART (B), K-562 (C) e MOLT-4 (D). Os resultados com 3h, 6h e 12h não foram mostrados.

4.2.2. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O ensaio de viabilidade celular de exclusão por azul de tripan permitiu a comparação do padrão de crescimento das células tratadas e não-tratadas pela contagem diferencial de células viáveis e não-viáveis de cada tratamento.

A análise da viabilidade celular em linhagens leucêmicas HL-60 e K-562 por exclusão de azul de tripan, depois de 24 horas de exposição demonstram que a piplartina causou uma significativa redução no número de células viáveis nas concentrações 2,5, 5, e 10 µg/ml (Figura 17), mas apenas nas células tratadas com piplartina 10µg/ml um aumento do número de células não-viáveis foi observado ($p < 0,05$). A piplartina apresentou efeitos similares em ambas as linhagens celulares. A doxorubicina foi testada como controle positivo na concentração de 0,3 µg/mL causando 68,8% e 57,3% de redução no número de células viáveis para HL-60 e K-562, respectivamente.

4.2.3. Inibição da síntese de DNA – Incorporação de BrdU

Neste ensaio, foi avaliada a capacidade proliferativa das células tratadas em comparação as não-tratadas pela incorporação de BrdU no DNA. A figura 18 apresenta o efeito da piplartina na inibição da síntese de DNA por células leucêmicas HL-60 e K-562 depois de 24 horas de exposição.

Como observado no ensaio de citotoxicidade, a piplartina apresentou efeitos similares em ambas as linhagens, porem de maneira mais intensa na linhagem HL-60. Na concentração de 5 µg/ml, piplartina causou uma inibição da síntese de DNA de 88% e 37% para as células leucêmicas HL-60 e K-562 respectivamente. Na concentração de 2,5 µg/ml a inibição foi de 50% e 49% para as mesmas células. Na concentração de 10 µg/ml a inibição da síntese de DNA pela piplartina foi de 100% em ambas as linhagens celulares ($p < 0,05$). A doxorubicina (0,3 µg/ml) foi usada como controle positivo e causou inibição da síntese de DNA em 40,3% e 33,1% em HL-60 e K-562 respectivamente.

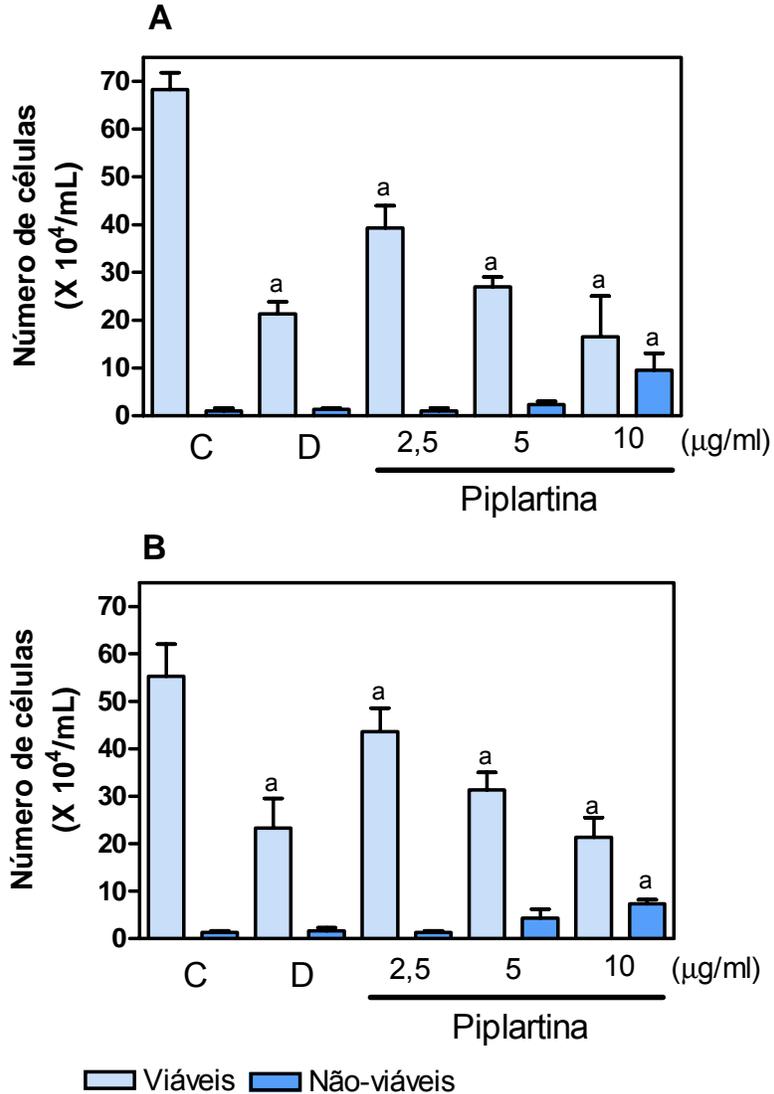


Figura 17 – Efeito da piplartina na viabilidade das células leucêmicas HL-60 (A) e K-562 (B) determinada por exclusão de azul de tripan depois de 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 0,2%). Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentes independentes. a, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

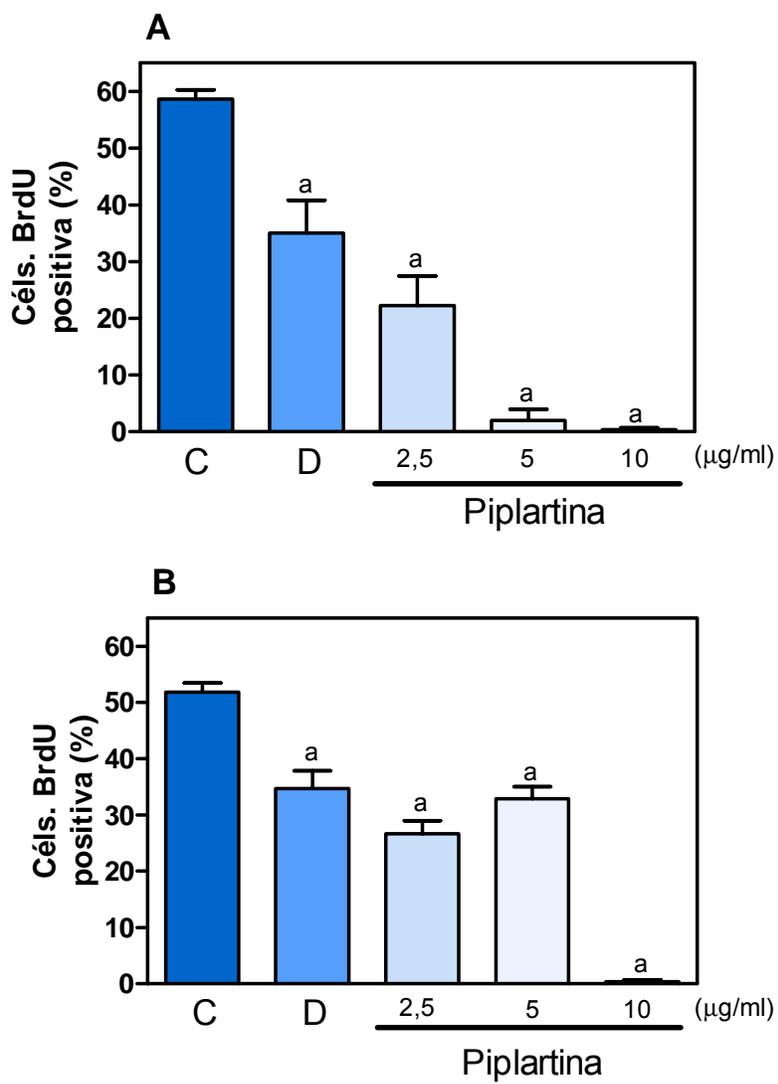


Figura 18 – Efeito da piplartina na síntese de DNA em células leucêmicas HL-60 (A) e K-562 (B) depois de 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 0,2%). Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentes independentes. a, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

4.2.4. Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina

As figuras 19 e 20 apresentam a análise morfológica das células HL-60 e K-562, respectivamente, tratadas e não-tratadas com piplartina. A coloração das células não-tratadas permitiu observar que estas se apresentam normais, com núcleos volumosos, citoplasmas homogêneos e ocasionais figuras mitóticas.

As células tratadas com piplartina na concentração de 2,5 µg/mL apresentaram condensação da cromatina e fragmentação nuclear (Figuras 19C e 20C). Na concentração de 5 µg/mL, piplartina causou redução no volume das células, vacuolização, condensação da cromatina, núcleo picnótico e fragmentação do DNA (Figuras 19D e 20D). Na presença de 10 µg/mL de piplartina, muitas células foram vistas com núcleo picnótico, fragmentação do DNA, vacuolização e desestabilização da membrana plasmática, indicando um aumento no número de células mortas (Figuras 19E e 20E). Condensação da cromatina e fragmentação nuclear também foram observadas na presença de doxorubicina 0,3 µg/ml (Figuras 19B e 20B). Estes dados foram observados em ambas as linhagens celulares, porém de maneira mais intensa na linhagem HL-60.

4.2.5. Análise morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Após as células HL-60 e K562 terem sido tratadas com 5 µg/mL e 10 µg/mL da piplartina por 24 horas ocorreu um significativo aumento do número de células necróticas (Figura 21). A necrose induzida por piplartina ocorreu de forma dependente da concentração ($p < 0,05$). Em contrário, as células tratadas com doxorubicina apresentaram características de células apoptóticas. Estes dados foram observados em ambas as linhagens celulares, porém de maneira mais intensa na linhagem HL-60. As figuras 22 e 23 ilustram o processo de indução de morte celular observado por microscopia de fluorescência. O controle experimental apresentou ocasionais células apoptóticas e raras células necróticas.

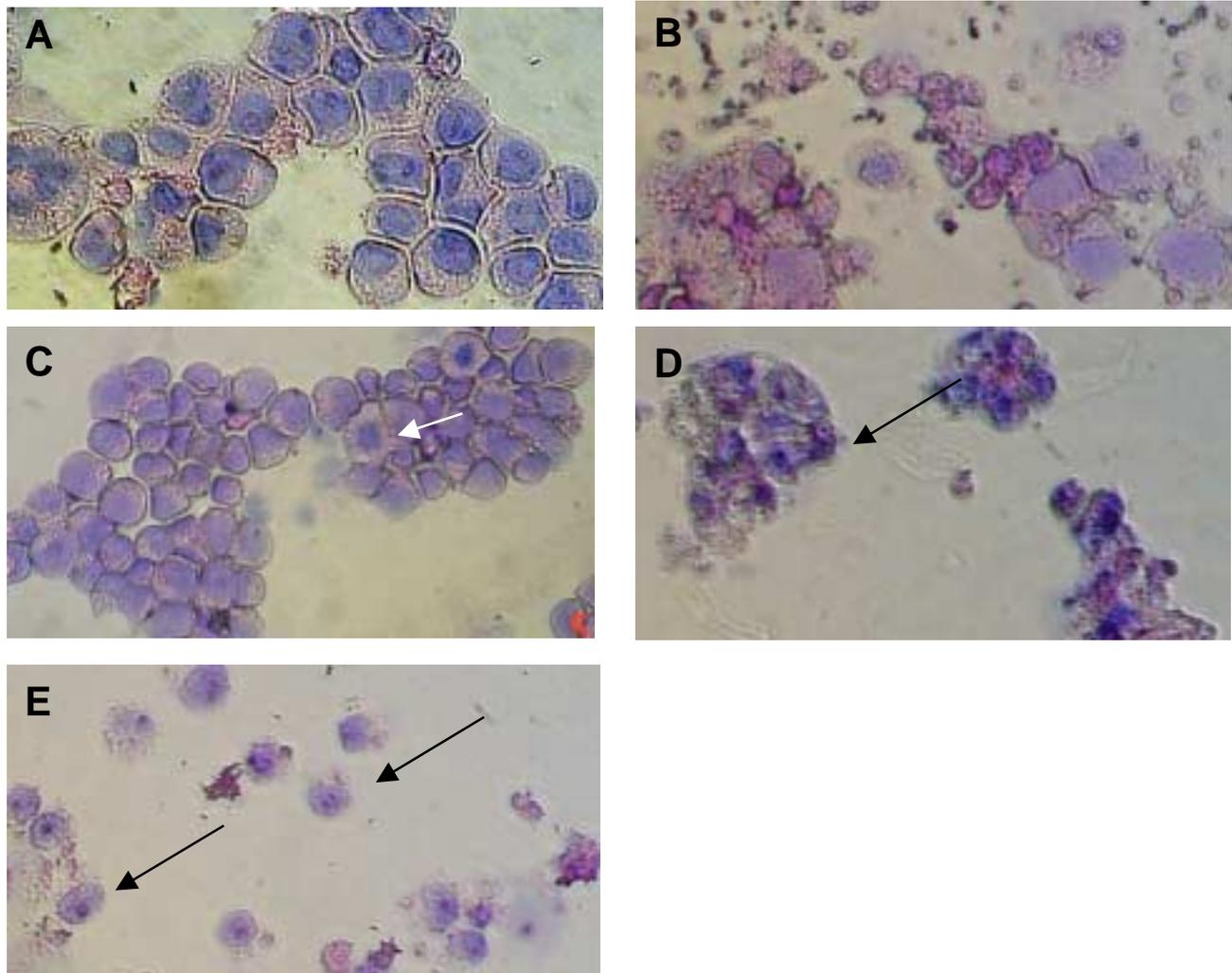


Figura 19 – Fotomicrografia das células HL-60 coradas com hematoxilina/eosina. Células não-tratadas (A), tratadas com piplartina (2,5 µg/mL, C), piplartina (5 µg/mL, D) ou piplartina (10 µg/mL, E) foram analisados por microscopia óptica (x400). Doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (B). As setas brancas indicam fragmentação e condensação da cromatina e as setas pretas indicam núcleo picnóticos.

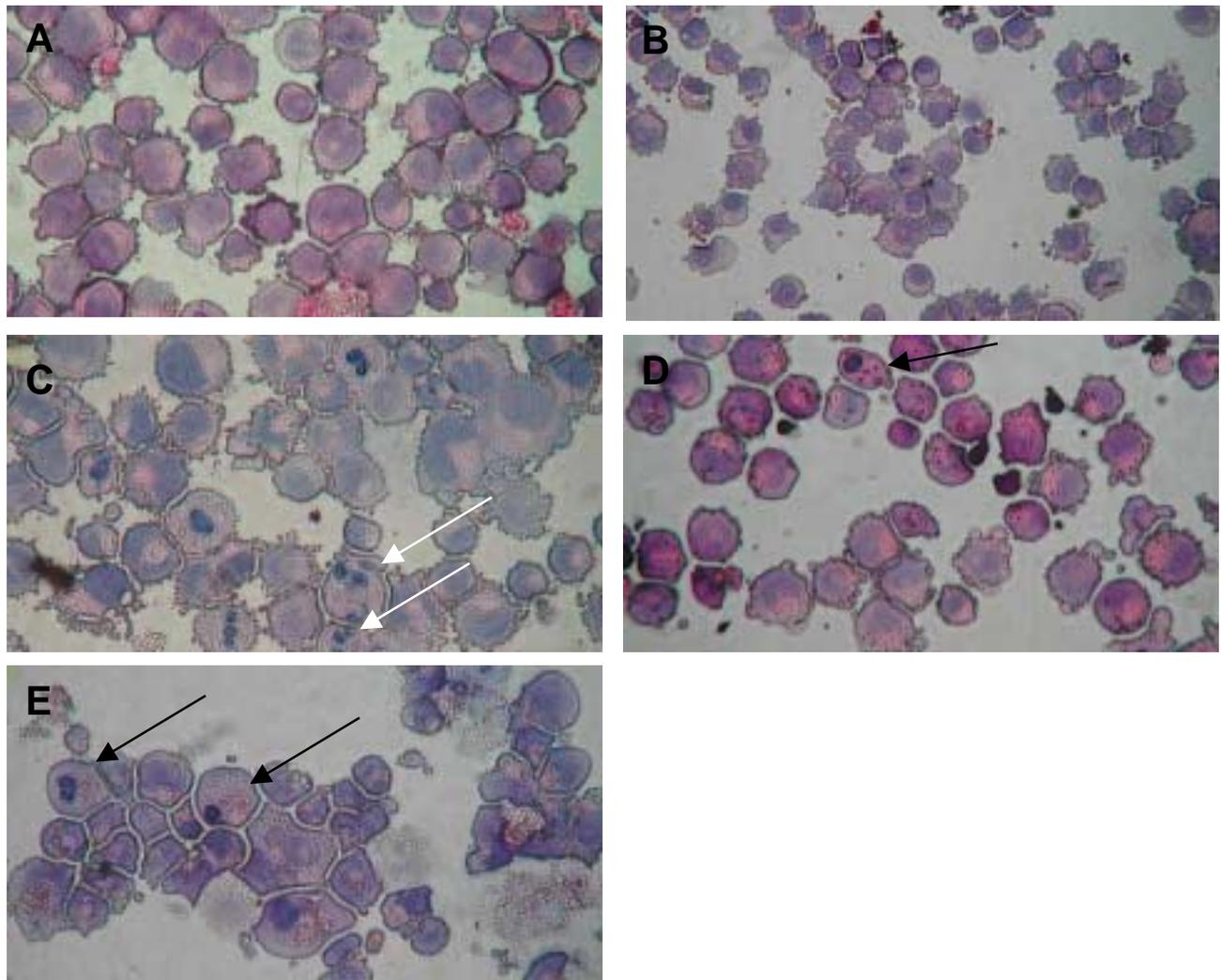


Figura 20 – Fotomicrografia das células K-562 coradas com hematoxilina/eosina. Células não-tratadas (A), tratadas com piplartina (2,5 µg/mL, C), piplartina (5 µg/mL, D) ou piplartina (10 µg/mL, E) foram analisados por microscopia óptica (x400). Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (B). As setas brancas indicam fragmentação e condensação da cromatina e as setas pretas indicam núcleo picnóticos.

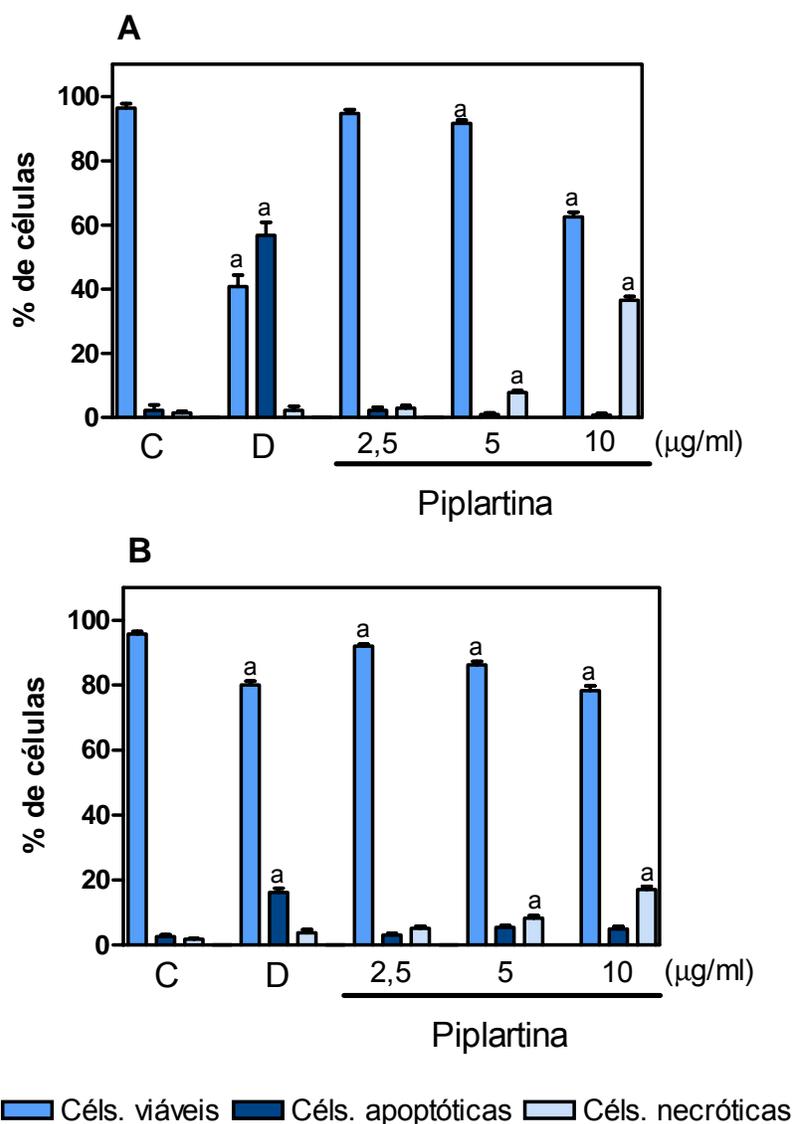


Figura 21 – Efeito da piplartina em células leucêmicas HL-60 (A) e K-562 (B), analisados por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina depois de 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 0,2%). Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentes independentes. a, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

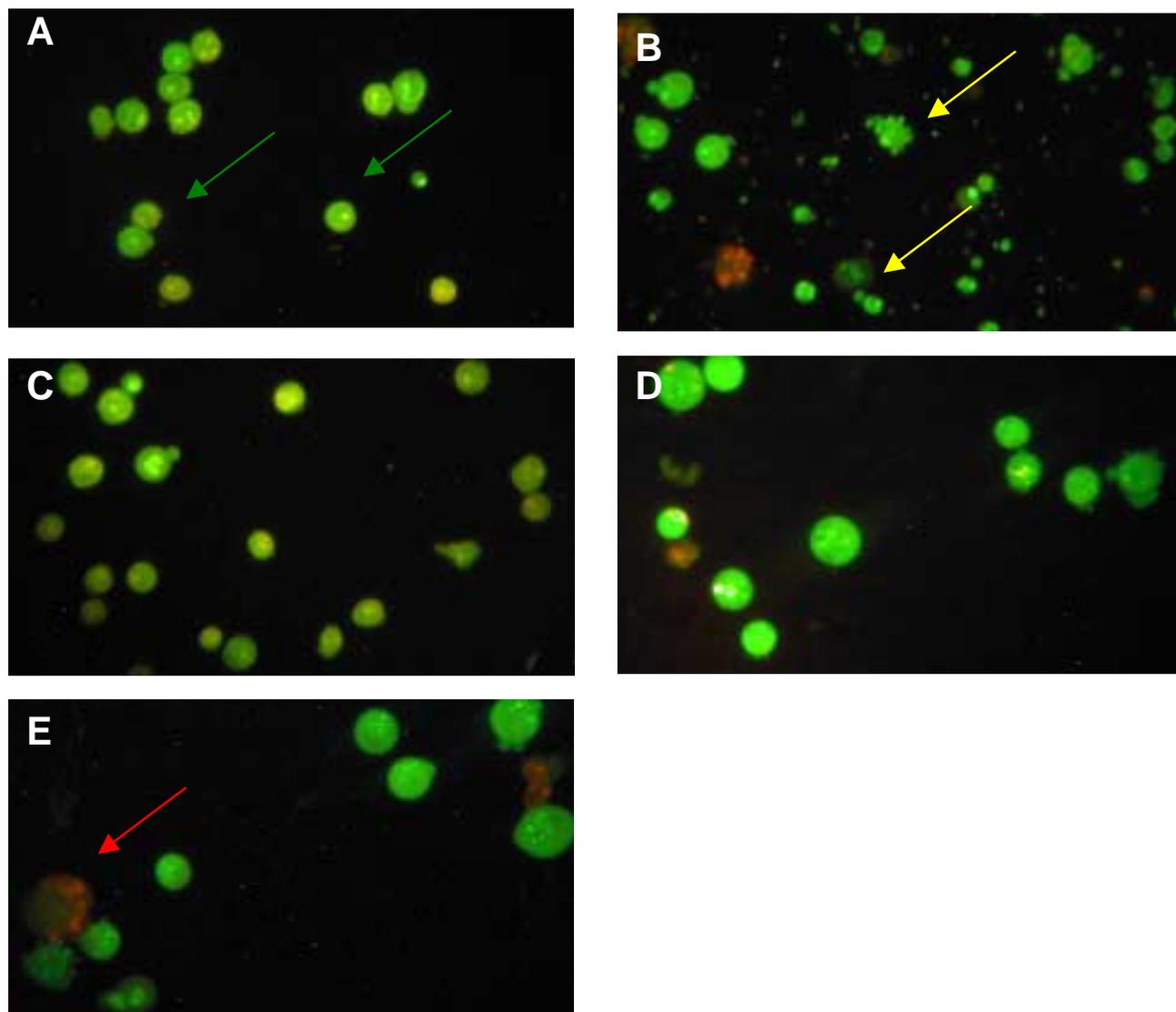


Figura 22 – Fotomicrografia das células HL-60 coradas com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina. Células não-tratadas (A), tratadas com piplartina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, C), piplartina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, D) ou piplartina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, E) foram analisados por microscopia de fluorescência (x400). Doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usada como controle positivo (B). As setas verdes indicam células viáveis, as amarelas indicam células apoptóticas e as vermelhas indicam células necróticas.

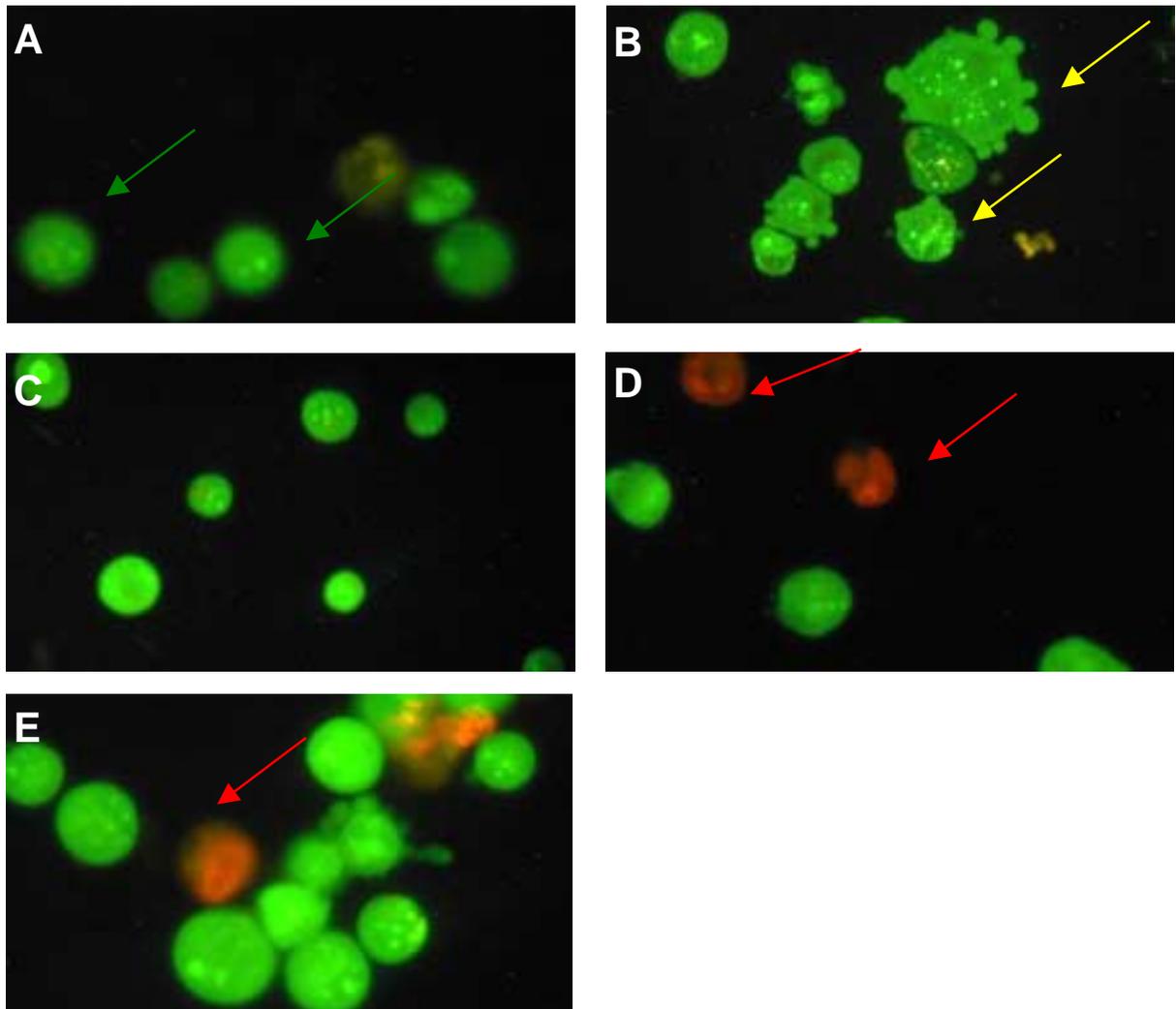


Figura 23 – Fotomicrografia das células K-562 coradas com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina. Células não-tratadas (A), tratadas com piplartina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, C), piplartina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, D) ou piplartina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, E) foram analisados por microscopia de fluorescência (x400). Doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usada como controle positivo (B). As setas verdes indicam células viáveis, as amarelas indicam células apoptóticas e as vermelhas indicam células necróticas.

4.3. Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

4.3.1. Avaliação do efeito da piplartina e piperina em camundongos transplantados com Sarcoma 180

A atividade antitumoral *in vivo* da piplartina e da piperina foi determinada utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180. Foi observado que ambas as amidas inibiram de forma significativa o crescimento tumoral. 24 horas após a última dose os animais foram sacrificados e os tumores foram dessecados e pesados. A figura 24 apresenta valores da massa úmida dos tumores dos animais tratados e não-tratados. A massa úmida dos tumores dos animais controle (DMSO 10%) foi de $1,96 \pm 0,13$ g, enquanto que os animais tratados com piplartina foram de $1,41 \pm 0,11$ g e $0,94 \pm 0,16$ g para as doses de 50 e 100 mg/kg/dia respectivamente ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com piperina apresentaram valores de $0,89 \pm 0,20$ g e $0,85 \pm 0,12$ g para as mesmas doses ($p < 0,05$). Já os animais tratados com 5-Fluorouracil (25mg/kg/dia) apresentaram valores de $0,46 \pm 0,08$ g ($p < 0,05$). Os percentuais para inibição do crescimento tumoral foram de 28,67 % e 52,27 % nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia para a piplartina, respectivamente, enquanto que a piperina inibiu em 55,01 % e 56,79% nas mesmas doses, respectivamente. Nos animais tratados com 5-fluorouracil (25mg/Kg/dia), a inibição tumoral foi de 76,74 %.

4.3.2. Detecção de Ki-67 por imunohistoquímica

A Figura 25 mostra a quantidade de células reativas para o marcador Ki67 nos tumores de animais tratados e não-tratados. Foi observado que os tumores dos animais tratados com piplartina (inibição de 45,1%) e 5-FU (inibição de 94,3%) apresentaram uma redução significativa no número de células Ki67 positivas quando comparado com o controle ($p < 0,05$). A piperina não foi capaz de reduzir o número de células Ki67 positivas ($p < 0,05$).

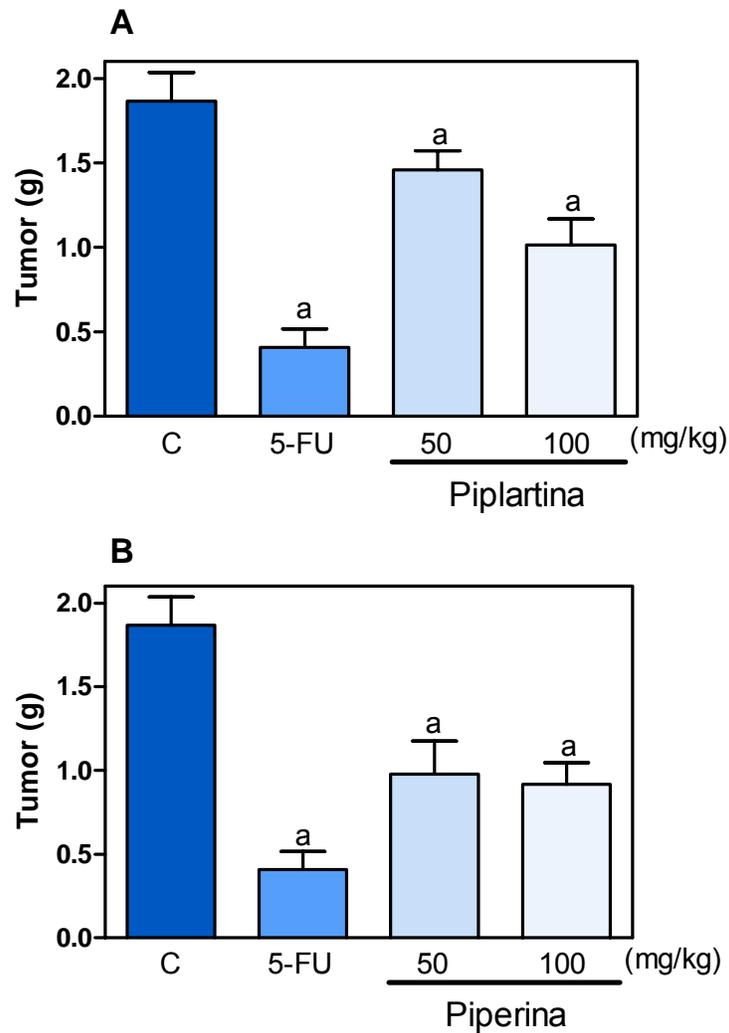


Figura 24 – Efeito da piplartina (50 ou 100 mg/Kg/dia, A) e da piperina (50 ou 100 mg/Kg/dia, B) sobre a massa tumoral de animais transplantados com Sarcoma 180. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 10%). 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo (5-FU). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de dez animais. a, $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

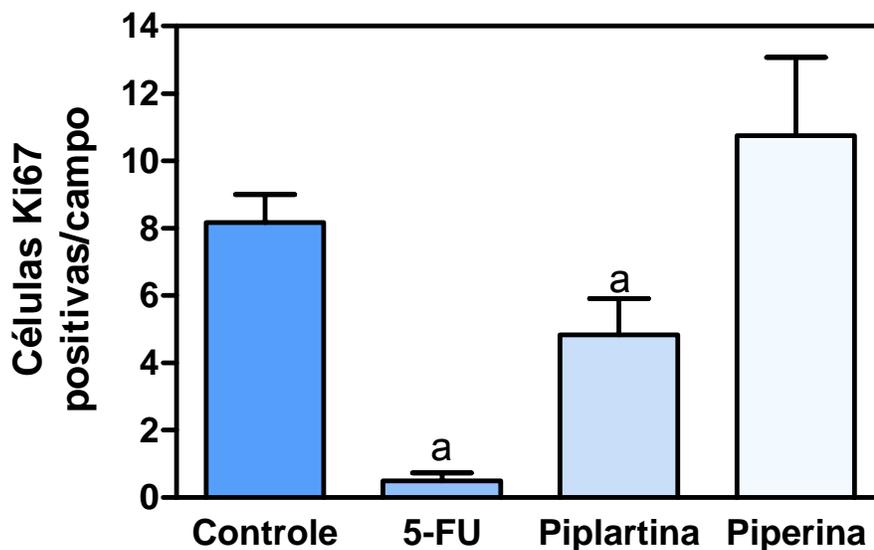


Figura 25 – Efeito da pipartina (100 mg/Kg/dia) e da piperina (100 mg/Kg/dia) sobre a proliferação tumoral de animais transplantados com Sarcoma 180 usando o anticorpo Ki67. O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 10%). 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo (5-FU). Os valores correspondem à média ± E.P.M. da contagem de células Ki67 positivas de 4-6 campos/ tumor. a, $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

4.3.3. Análise morfológica e histopatológica

Após o tratamento com as amidas, piplartina ou piperina, os pesos dos rins e fígados não mostraram diferenças significantes em nenhuma das doses utilizadas (50 ou 100mg/Kg/dia) quando comparados com o grupo controle, enquanto os pesos dos baços dos animais tratados com piperina (100mg/kg/dia) mostraram redução significativa ($p < 0,05$). Já o tratamento com 5-fluorouracil (25mg/Kg/dia) apresentou uma redução significativa nos pesos dos órgãos ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Tabela 5).

As análises histopatológicas dos animais do grupo controle apresentaram o rim com estrutura glomerular preservada e sem maiores peculiaridades. As análises histopatológicas dos rins de animais tratados com as amidas, piplartina e piperina, mostraram discretas alterações no epitélio tubular proximal, com preservação da estrutura glomerular. As alterações parecem ser mais intensas nos animais tratados com piplartina. Porém, as alterações epiteliais observadas podem ser consideradas reversíveis não indicando quadro de nefrotoxicidade (Figuras 26 e 27).

Por outro lado, a análise histopatológica do fígado demonstrou moderada toxicidade frente às amidas, piplartina e piperina. Diferente do que foi observado nos rins, a análise histopatológica dos fígados dos animais tratados com piperina apresentou-se de maneira mais intensa. Tais aspectos histológicos incluíram hiperplasia das células de Kupffer, áreas de congestão venosa centrolobular, infiltrado local de células inflamatórias crônicas, intensa tumefação turva de hepatócitos, graus variados de esteatose em microgotas e hemorragia sinusoidal (Figuras 28 e 29). Não foi encontrada diferença nas análises dos baços dos animais tratados com as amidas em relação ao grupo controle.

As análises histopatológicas realizadas nos rins após tratamento com 5-FU (25mg/Kg/dia) apresentaram discretas áreas de tumefação turva do epitélio tubular. Enquanto no fígado foram observadas: congestão da veia portal e da veia centrolobular, tumefação turva dos hepatócitos (indicando intenso trabalho do

fígado para a metabolização da droga), hiperplasia das células de Kupffer, além de muitos focos inflamatórios. Estas alterações indicam discreta hepatotoxicidade, porém de natureza reversível.

As análises histopatológicas dos tumores retirados de camundongos do grupo controle negativo mostraram neoplasia constituída por células redondas e poligonais, com núcleos hipercromáticos, exibindo por vezes binucleação e graus variados de pleomorfismo celular e nuclear. Foram visualizadas mitoses, invasão muscular e áreas de necrose de coagulação. Nos tumores dos animais tratados com 5-FU, piperina ou piplartina, as áreas de necrose de coagulação eram mais extensas do que as observadas no animais do grupo controle, demonstrando morte celular.

A tabela 6 apresenta um resumo dos resultados obtidos com as amidas piplartina e piperina.

Tabela 5 – Efeito da piplartina (50 ou 100 mg/Kg/dia), piperina (50 ou 100 mg/Kg/dia) ou 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) sobre o peso dos órgãos (fígado, rins e baço) dos animais, transplantados com Sarcoma 180. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de dez animais.

Droga	Dose (mg/kg/dia)	Fígado (g/100g de massa corpórea)	Baço (g/100g de massa corpórea)	Rins (g/100g de massa corpórea)
Controle	-	4,99 ± 0,18	0,61 ± 0,06	1,22 ± 0,08
Piplartina	50	4,58 ± 0,26	0,63 ± 0,05	1,04 ± 0,05
	100	5,10 ± 0,32	0,69 ± 0,06	1,25 ± 0,07
Piperina	50	4,40 ± 0,24	0,48 ± 0,06	1,02 ± 0,04
	100	5,06 ± 0,19	0,40 ± 0,03 ^a	1,12 ± 0,04
5-FU	25	4,93 ± 0,24	0,25 ± 0,05 ^a	1,18 ± 0,08

a, $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

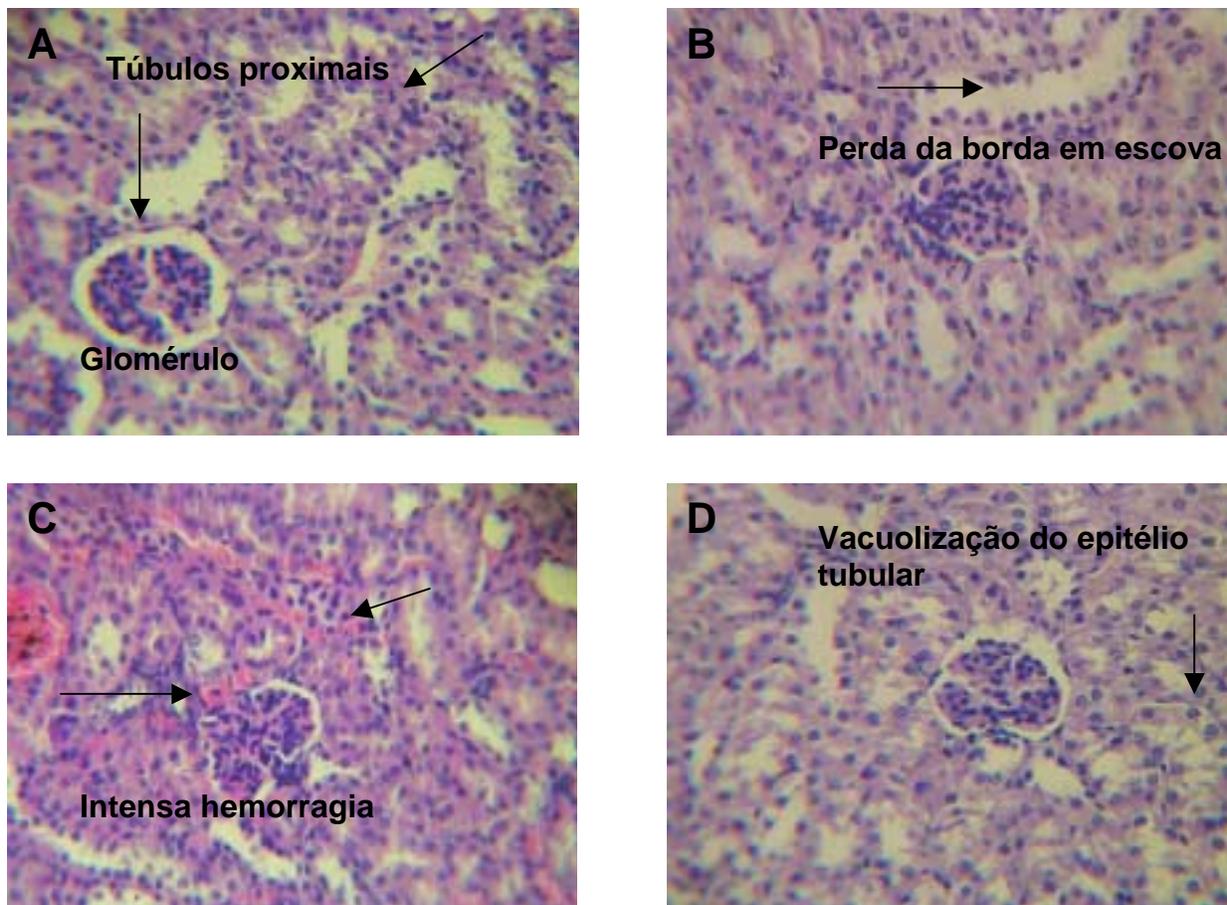


Figura 26 – Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 10%). 5-fluorouracil (25 mg/Kg/dia, B) foi usado como controle positivo (5-FU). Os animais foram tratados com piplartina (50 ou 100mg/Kg/dia, C ou D), respectivamente (400X).

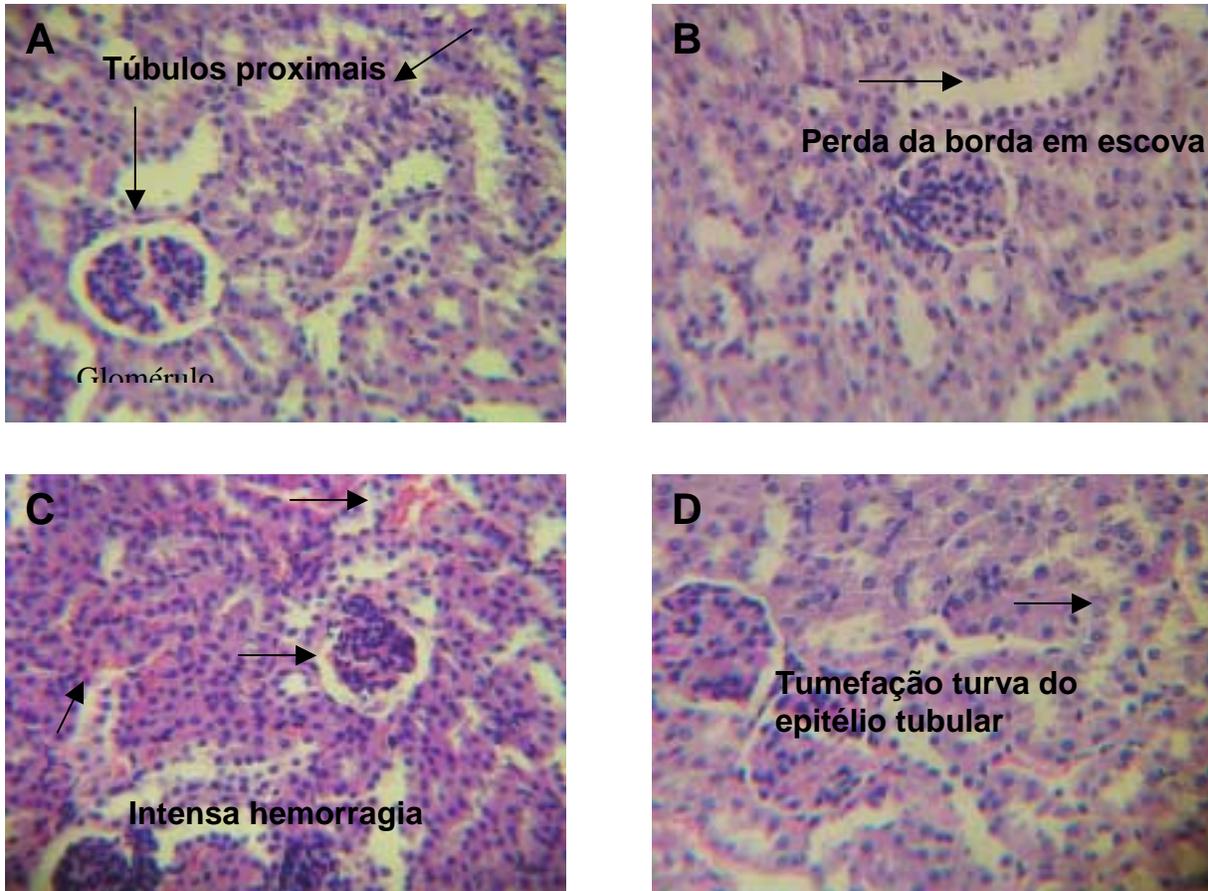


Figura 27 – Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 10%). 5-fluorouracil (25 mg/Kg/dia, B) foi usado como controle positivo (5-FU). Os animais foram tratados com piperina (50 ou 100 mg/Kg/dia, C ou D), respectivamente (400X).

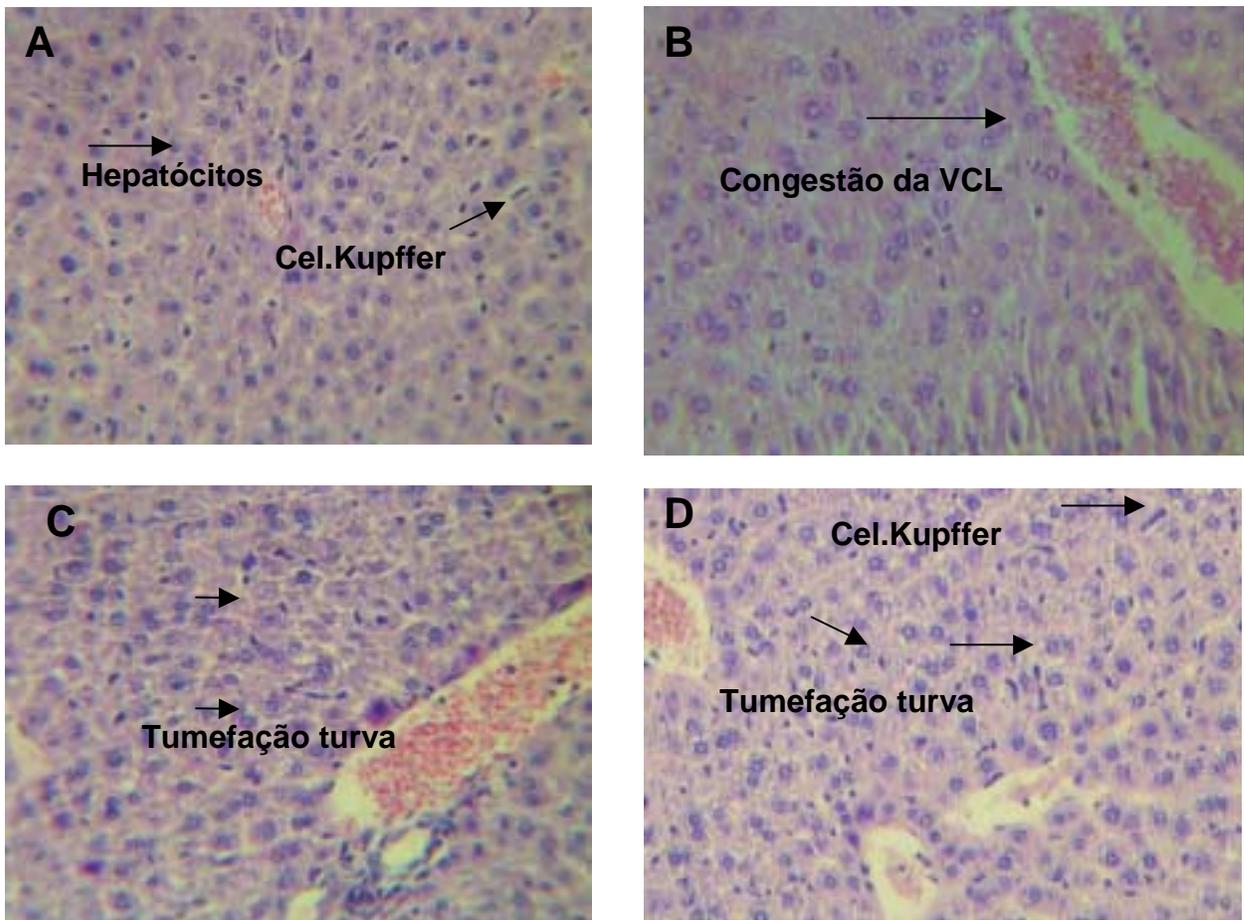


Figura 28 – Histopatologia do fígado de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 10%). 5-fluorouracil (25 mg/Kg/dia, B) foi usado como controle positivo (5-FU). Os animais foram tratados com piplartina (50 ou 100mg/Kg/dia, C ou D), respectivamente (400X).

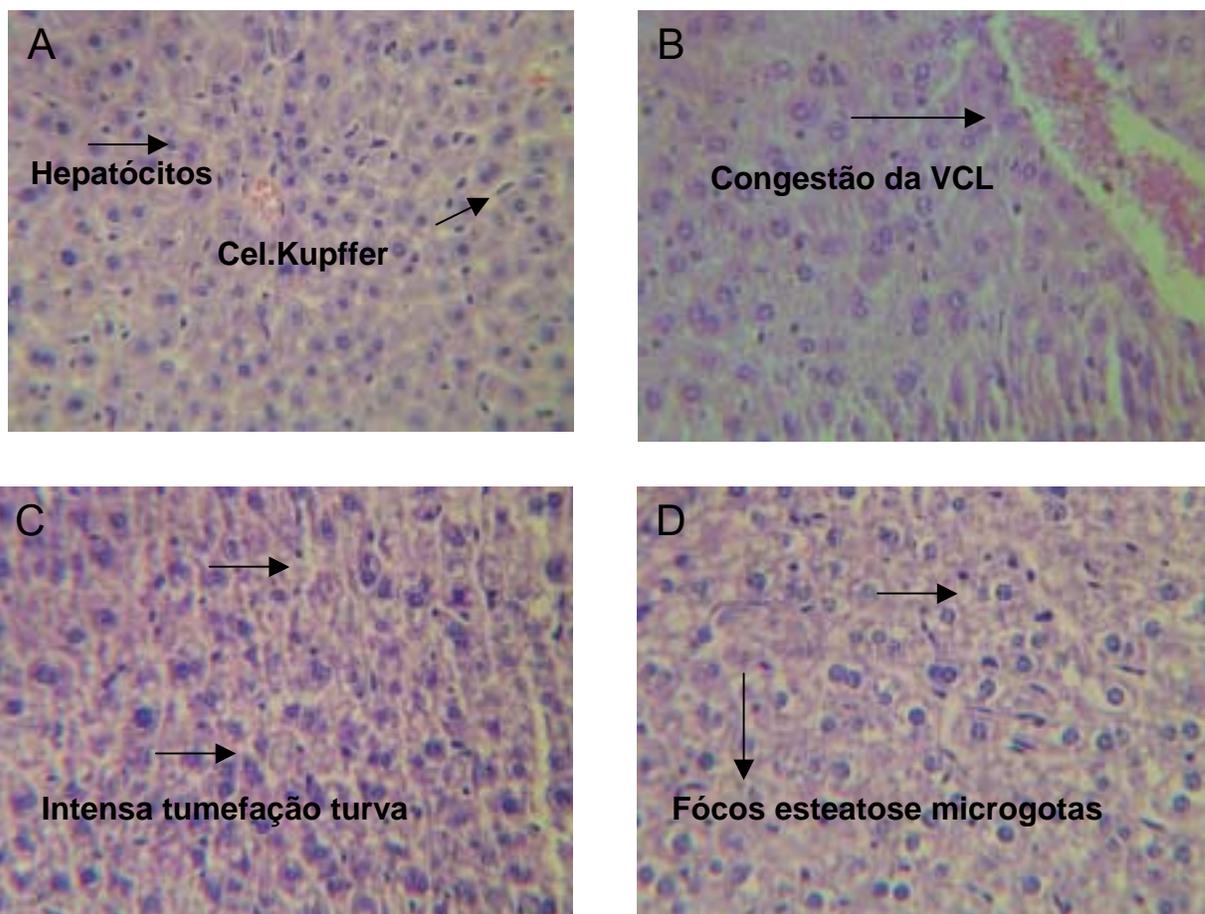


Figura 29 – Histopatologia do fígado de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 10%). 5-fluorouracil (25 mg/Kg/dia, B) foi usado como controle positivo (5-FU). Os animais foram tratados com piperina (50 ou 100 mg/Kg/dia, C ou D), respectivamente (400X).

Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos com as amidas piplartina e piperina.

	Piplartina	Piperina
Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>		
Toxicidade Aguda em <i>Artemia sp</i>	++	+++
Potencial Antimitótico em Ovos de Ouriço do Mar	+++	++
Atividade Hemolítica	-	-
Inibição da Proliferação de Células Tumorais -MTT	++	+
Estudo do mecanismo de ação em células leucêmicas		
Curva de crescimento celular	++	N.D.
Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripan	++	N.D.
Inibição da síntese de DNA	++	N.D.
Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>		
Avaliação do efeito da piplartina e piperina em camundongos transplantados com Sarcoma 180	++	++
Detecção de Ki-67 por imunohistoquímica.	++	-

+ Fracamente ativa

++ Ativa

+++ Fortemente ativa

- Não ativa

N.D. Não determinado.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O potencial de plantas superiores como fonte de substâncias bioativas é um campo ainda praticamente inexplorado. Dentre as 250 mil espécies vegetais estimadas no planeta, somente uma pequena porcentagem foi estudada quanto a sua composição micromolecular. Quando se considera o número de plantas submetidas a ensaios biológicos ou farmacológicos esse percentual é ainda menor (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; RATES, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003). Produtos naturais continuam sendo a principal fonte de novos compostos para o desenvolvimento de agentes anticâncer mais eficientes (PEZZUTO, 1997; NEWMAN *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de novas drogas bioativas necessita de modelos apropriados para a identificação de alvos moleculares que sejam fundamentais no crescimento celular seja *in vitro* ou *in vivo*. Entre os principais alvos intracelulares temos o DNA, RNA, microtúbulos e enzimas (LODISH, *et al.*, 1999; CRAGG & NEWMAN, 2005). Moléculas isoladas de plantas e outros organismos naturais estão provando ser importantes fontes de novos inibidores da ação destas moléculas chave, e possuem o potencial para desenvolvimento de agentes anticâncer seletivos (CRAGG & NEWMAN, 2005).

Em geral, as espécies do gênero *Piper* são importantes econômica e medicinalmente. O interesse pela química desse gênero evolui bastante ao longo dos anos devido ao grande número de espécies estudadas e compostos isolados com importante valor farmacológico. Algumas espécies deste gênero têm sido bem investigadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico. Nos estudos fitoquímicos realizados com as espécies do gênero *Piper*, verificou-se a presença de várias classes de metabólitos secundários. Estes apresentaram atividades farmacológicas comprovadas como: antimicrobiana, moluscicida, fungicida, inseticida e antiinflamatória (revisado por BALDOQUI *et al.*, 1999). Dentre estes,

os alcalóides/amidas apresentam vários compostos farmacologicamente ativos (revisado por PARMAR *et al.*, 1997).

Piplartina e piperina são alcalóides/amidas obtidos de plantas do gênero *Piper*. Vários alcalóides/amidas têm sido apresentados como agentes citotóxicos em linhagens tumorais (TSAI *et al.*, 2005). O presente trabalho avaliou, inicialmente, a atividade da piplartina e da piperina em três modelos celulares, a saber, células tumorais, eritrócitos de camundongos e ovos de ouriço do mar; além da toxicidade aguda em náuplios de artêmia. Posteriormente, foi avaliado o possível mecanismo pelo qual a piplartina apresenta seu efeito citotóxico utilizando células leucêmicas. E finalmente, foi avaliada a atividade antitumoral dessas amidas em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180. Vale ressaltar que a piperina não foi estudada nas células leucêmicas, uma vez que nas concentrações testadas no ensaio do MTT não se observou atividade.

O ensaio da letalidade de organismos simples, como o microcrustáceo marinho *Artemia sp.*, permite a avaliação da toxicidade geral e é considerado um bioensaio preliminar no estudo de extratos e metabólitos secundários com potencial atividade biológica (MEYER *et al.*, 1982). Este ensaio, apesar de não selecionar compostos com atividade antitumoral, tem mostrado uma boa correlação com a existência de substâncias que possuem esse tipo de toxicidade e tem sido amplamente utilizado para *screenings* com essa finalidade (MUNRO *et al.*, 1987). Neste ensaio, a piperina apresentou-se pelo menos 14 vezes mais potente que a piplartina.

A toxicidade aguda em *Artemia sp.* da piperina foi previamente descrita por Padmaja e colaboradores em 2002 quando estes através de um programa de *screening* descreveram o potencial tóxico de varias plantas utilizadas na medicina hindu, onde a piperina apresentou um $DL_{50} = 2,4 \mu\text{g/mL}$ (PADMAJA *et al.*, 2002) que é semelhante ao encontrado neste trabalho $DL_{50} = 2,8 \mu\text{g/mL}$. A Piperina também apresentou atividade repelente e inseticida mais potente quando comparada com outras amidas, e este efeito foi atribuído a presença de um grupo metilenedioxifenil e uma amida cíclica (Figura 26 - revisado por PARMAR *et al.*,

1997). Este grupo também parece ser importante para o ensaio de toxicidade aguda em *Artemia sp.*, pois a piperina apresentou maior atividade neste ensaio quando comparada à piplartina.

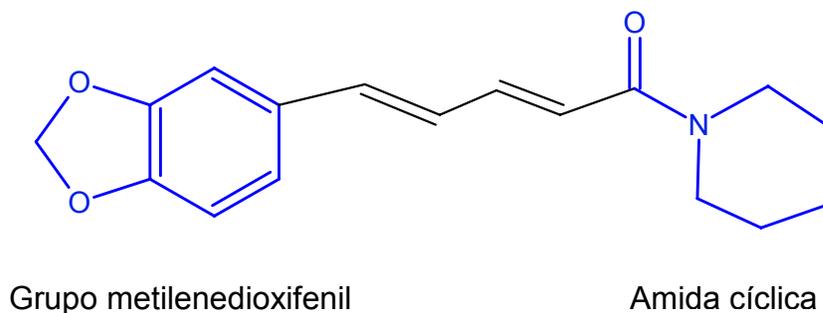


Figura 30 – Estrutura química da piperina. Em azul estão sendo detalhados os grupos farmacofóricos para a atividade repelente para inseto e toxicidade aguda em *Artemia sp.*

O teste do ouriço-do-mar, por sua vez, é amplamente utilizado no estudo de drogas com efeitos citotóxicos e teratogênicos (JACOBS & WILSON, 1986). Os ovos de ouriço apresentam extrema sensibilidade a agentes tóxicos e uma série de peculiaridades no seu ciclo de desenvolvimento, tornando-o bastante elucidativo no estudo de drogas com potencial antiproliferativo. A inibição da divisão celular pode estar relacionada a vários eventos envolvidos nesse processo, como a síntese de DNA e RNA, síntese protéica e polimerização de microtúbulos. No ensaio dos ovos do ouriço-do-mar, esses processos podem, muitas vezes, ser analisados individualmente (FUSETANI, 1987). O ciclo celular das células embrionárias de ouriço-do-mar é bastante abreviado. É destituído da fase G_1 , que antecede a fase S e a fase G_2 encontra-se bastante reduzida. Desta maneira, drogas que atuam durante a fase G_1 não apresentam atividades neste bioensaio.

Ambas as amidas, piplartina e piperina, induziram inibição do desenvolvimento dos ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus* de maneira dependente da concentração durante todas as fases examinadas, primeira e

terceira divisões e blástula. Neste ensaio, a piplartina foi a mais ativa, sendo 2, 2,3 e 3,5 vezes mais potente que a piperina na primeira e terceira divisões e blástula, respectivamente. De acordo com Jacobs *et al.*, (1981), se uma substância pura promove 100% de inibição neste ensaio na concentração de 16 µg/ml ou menos, esta pode ser considerada muito ativa. Assim ambas as amidas podem ser consideradas muito ativas, pois inibiram completamente a mitose dos ovos em concentrações menores que 7 µg/ml.

A síntese de RNA, por sua vez, não ocorre nas primeiras divisões dessas células, sendo todo o RNA utilizado na síntese protéica proveniente do gameta feminino (BRANDHORST, 1985). Drogas como a actinomicina D, que bloqueiam este processo, somente inibem o desenvolvimento embrionário do ouriço a partir do estágio de mórula, quando novo RNA é sintetizado (FUSETANI, 1987). Compostos que atuam no fuso mitótico da célula inibem, tão logo, a primeira clivagem dos ovos. O tratamento com Citocalasina B, um inibidor da polimerização dos microfilamentos, induz o aparecimento de embriões unicelulares polinucleados (FUSETANI, 1987). Manchas circulares esbranquiçadas, correspondentes à região nuclear, interrompem a homogeneidade do citoplasma e aparecem duplicadas, quadruplicadas ou em maior número numa única célula. Isto sugere que houve a duplicação do núcleo sem a ocorrência de citocinese. Os ovos tratados com piplartina e piperina apresentaram o citoplasma homogêneo, assim este processo parece não ser afetado.

Compostos que inibem a síntese de DNA podem mostrar seus efeitos desde a primeira clivagem, quando há um pico de produção de DNA. No entanto, também foi observado que, em alguns casos, ovos tratados com drogas com este mecanismo de ação específico continuam a se dividir, em média, oito ou nove vezes antes de morrer. Os efeitos de inibidores da síntese de DNA foram descritos como retardo no desenvolvimento e o surgimento de blastômeros com tamanhos variados numa única célula. A sincronia de divisão dos ovos também é afetada. Estes efeitos foram relatados para ovos tratado com afidilcolina, um inibidor seletivo de DNA polimerase α e para o quimioterápico 5-fluorouracil (FUSETANI,

1987). Estes compostos afetam especificamente a síntese de DNA, sem causar qualquer interferência na síntese de RNA ou proteínas. Inibidores da síntese protéica como, por exemplo, a ciclohexamida, bloqueiam o desenvolvimento embrionário dos ovos desde a primeira divisão (FUSETANI, 1987). Sendo assim, a atividade antimitótica da piplartina e pipereina parece estar relacionada com a inibição da síntese de proteína e/ou DNA. Entretanto, ambas substâncias parecem desestabilizar a membrana das células do embrião. A piperina induz alterações na membrana associada com a inibição da mitose desde a primeira divisão, enquanto que células destruídas por piplartina só foram observadas depois de algumas horas de contato.

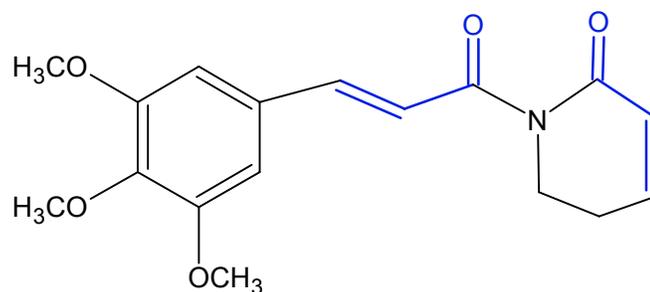
A membrana dos eritrócitos é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada através de interações com drogas (AKI & YAMAMOTO, 1991). Estudos da literatura indicam que algumas substâncias isoladas de plantas como polifenóis, epicatequinas, glicosídeos estéril, saponinas triterpenenóides e outros podem causar alterações na membrana de células vermelhas e produzir hemólise (NG *et al.*, 1986; BADER *et al.*, 1996; GRINBERG *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 1997).

Desde que a inibição da mitose dos ovos de ouriço parece estar associada com danos na membrana, os compostos foram testados quanto ao seu potencial de induzir lise em hemácias de camundongos. No entanto, nenhuma das amidas apresentaram efeito hemolítico nas concentrações testadas. Isto sugere que o mecanismo de citotoxicidade dessas amidas não está relacionado a danos nas membranas celulares e provavelmente estas estejam atuando por caminhos mais específicos.

A determinação da citotoxicidade *in vitro* tem se mostrado eficaz na descoberta de novos agentes anti-tumorais. A maneira mais rápida, fácil e sensível é o *screen* com modelos *in vitro* (CRAGG & NEWMANN, 2000). Os testes em linhagens celulares humanas *in vitro* foram escolhidos, pois, segundo Venditi (1983), os ensaios com células leucêmicas murinas *in vivo* apresentavam muitas vezes resultados falso-negativos para atividade anti-tumoral de novos compostos.

Enquanto que os mesmos compostos quando testados em células tumorais humanas apresentavam resultados positivos na inibição da formação de colônias. Esta constatação sugeriu que o *screening* usando células tumorais humanas *in vitro* era preferencial no desenvolvimento de novas drogas antitumorais (SHOEMAKER *et al.*, 1984). Pelo fato de os modelos celulares para o estudo da toxicidade serem mais econômicos, rápidos e fornecerem resultados mais facilmente quantificáveis e com maior reprodutibilidade que os *in vivo*, o interesse por inovações neste campo aumenta tanto quanto as necessidades das limitações já existentes (FORNELLI *et al.*, 2004).

Como observado no ensaio de atividade antimetabólica em ovos de ouriço do mar, a pipartina foi mais potente que a piperina quanto a citotoxicidade em linhagens de células tumorais. A citotoxicidade de ambas as amidas são descritas na literatura (DUH *et al.*, 1990; DUH & WU, 1990; SUNILA & KUTTAN, 2004). Como demonstrado antes, a pipartina apresentou uma forte citotoxicidade para as linhagens celulares KB (carcinoma nasofaringe), P-388 (leucemia linfocítica), A-549 (carcinoma de pulmão) e HT-29 (carcinoma de colon) e através de estudos da relação estrutura-atividade, os autores sugeriram que esta maior citotoxicidade deve-se a presença de duas carbonilas α,β -insaturadas (Figura 27 - DUH *et al.*, 1990; DUH & WU, 1990). Nossos dados corroboram com esta hipótese, uma vez que a piperina não apresenta este grupamento, sendo fracamente citotóxica. Outros estudos mostraram que a piperina foi citotóxica para as células de linfoma de Dalton (DLA), carcinoma de Erlich (EAC), L929 e B16 em concentrações iguais ou maiores que 25 $\mu\text{g/ml}$ (SUNILA & KUTTAN, 2004; PRADEEP & KUTTAN, 2002).



Grupos carbonilas α,β -insaturadas

Figura 31 – Estrutura química da pipartina. Em azul estão sendo detalhados os grupos farmacofóricos para a atividade citotóxica.

De qualquer modo, a pipartina apresentou os resultados mais promissores como agente citotóxico do que a piperina, que foi apenas fracamente ativa. Assim, a pipartina foi estudada quanto ao seu mecanismo de ação em modelos experimentais *in vitro*.

A construção da curva de crescimento celular pode fornecer informações importantes sobre a cinética da cultura de células em questão. A observação, em curtos intervalos, dessas culturas tratadas permite avaliar a ação citotóxica temporal da droga assim como o acompanhamento das alterações morfológicas das células a medida que vão acontecendo. Assim, foi avaliado o efeito da pipartina durante vários intervalos de tempo em células leucêmicas de linhagens linfocíticas (JUKART e MOLT-4) e mielóides (HL-60 e K-562).

A determinação da curva de crescimento celular ilustra bem esses achados. O efeito da pipartina na proliferação de células leucêmicas das linhagens T e mielóides parece ser semelhante. A pipartina apenas foi capaz de afetar a viabilidade celular depois de um período de exposição de 24 horas. Isto sugere que a atividade citotóxica da pipartina pode ser devida a alguma interferência com uma fase específica do ciclo celular.

A pipartina apresentou um efeito citostático e citotóxico dependente da concentração. Nas maiores concentrações, a pipartina causou uma redução do número de células viáveis associada com um aumento do número de células não-

viáveis, o que seria um efeito citotóxico. Entretanto, nas menores concentrações não houve um aumento do número de células não-viáveis, mas apenas uma redução da proliferação celular, o que corresponde a uma ação citostática. Assim, a piplartina parece atuar por mais de uma via, na qual dependendo da intensidade do dano esta pode apresentar-se como uma droga citotóxica ou citostática. Isto confirma que a indução da morte celular e o efeito citostático causados pela piplartina são devido a alterações em alguma fase específica do ciclo celular (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 1997; FENECH, 2000).

Modelos celulares são ferramentas úteis e necessárias para estudar o potencial citotóxico de um composto, traduzido, inicialmente, pela sua capacidade de induzir a morte celular, e as linhagens HL-60 (leucemia promielocítica) e K-562 (leucemia mielocítica crônica) estão entre os modelos celulares de origem mielóide mais amplamente utilizados (GRZANKA *et al.*, 2003; DELGADO *et al.*, 2005; STEFANSKA *et al.*, 2005). Sendo assim, essas linhagens foram escolhidas para o estudo do mecanismo de ação citotóxica da piplartina

As células da linhagem HL-60 são derivadas do sangue periférico de um paciente com leucemia promielocítica aguda, tendo sido caracterizada e sua cultura primeiramente estabelecida por Collins *et al.* (1977). A linhagem HL-60 pode ser caracterizada pela predominância de neutrófilos promielocíticos proeminentemente assincrônicos na relação núcleo/citoplasma, diferenciação espontânea de 10% das células cultivadas para o estágio monocítico e atividade fagocitária e quimiotática (COLLINS *et al.*, 1977; GALLAGHER *et al.*, 1979; COLLINS, 1987).

Leucemia mielocítica crônica humana (LMC) é uma malignidade hematológica caracterizada pela translocação recíproca balanceada do protooncogene c-abl do cromossomo 9 para uma região do gene Bcr no cromossomo 22 (Maru, 2001). Isto leva à formação do cromossomo Filadélfia (cromossomo Ph). As células de linhagens de LMC, como, por exemplo, K-562, são relativamente resistentes a apoptose induzido por vários agentes anticâncer incluindo etoposídeo e cisplatina. Esta apresenta o cromossomo Ph, que confere

resistência a vários agentes antileucêmicos (SLUPIANEK *et al.*, 2000; DI BACCO *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002).

Os modelos propostos para estudar a citotoxicidade da piplartina em células HL-60 e K-562 após 24h foram: análise da viabilidade celular por exclusão de azul de tripan, inibição de síntese de DNA por incorporação de BrdU, análise morfológica por coloração diferencial por hematoxilina/eosina ou brometo de etídio/acridina laranja. A doxorubicina, um agente anticâncer de amplo espectro vastamente utilizado na clínica tanto para o tratamento de tumores sólidos quanto para leucemias, foi usada como controle positivo dos experimentos na concentração de 0,3 µg/mL por apresentar mecanismo de ação conhecido.

A exclusão por azul de tripan é um ensaio de viabilidade celular que quantifica as células capazes de drenar o corante ácido azul de tripan para fora da célula em contraposição àquelas que não possuem essa capacidade. A absorção deste corante é um forte indicativo de dano na membrana plasmática que culmina na morte celular e fornece uma resposta sobre a viabilidade através da comparação do padrão de crescimento das células tratadas e não-tratadas pela contagem diferencial de células viáveis e não-viáveis (CHAROENPORNSOOK *et al.* 1998; HYNES *et al.*, 2003; MINERVINI *et al.* 2004).

A piplartina nas menores concentrações diminuiu o número de células viáveis, sem aumentar o número de células não-viáveis, esses dados confirmam com os encontrados na curva de crescimento celular, indicando que possivelmente seu efeito consista no bloqueio da divisão celular. Entretanto, quando as células foram tratadas com piplartina na maior concentração houve uma diminuição do número de células viáveis associada com um aumento no número de células não-viáveis, apresentando assim um mecanismo diferente do que o proposto anteriormente, sugerindo uma ação dependente da concentração.

Como citado anteriormente, a piplartina apresentou atividade antimitótica em ovos de ouriço do mar desde a primeira divisão e esta pode estar relacionada com inibição da síntese de proteína e/ou DNA. Os dados da curva de

crescimentos colaboram com esta hipótese já que o efeito da piplartina sobre a proliferação celular apenas foi significativa após um período de incubação de 24 horas. Assim, piplartina foi testada quanto a sua capacidade de inibir a síntese de DNA através da detecção da incorporação de BrdU.

O conteúdo de DNA e a incorporação de 5-BrdU podem ser medidos conjuntamente para determinar o índice de síntese de DNA através da porcentagem de células que incorporaram a 5-BrdU (DOLBEARE *et al.*, 1983). Na cinética celular clássica, o ciclo celular é dividido nas fases $G_1 - S - G_2 - M$ para as células em divisão, enquanto a fase G_0 refere-se às células quiescentes ou não-proliferantes (RAZA *et al.*, 1991). As células na fase S, de síntese, estão fabricando novo material genético e, portanto, utilizando-se dos nucleotídeos do meio (HOLM *et al.*, 1998). Estas células estão fadadas a incorporar BrdU em seu DNA que, por sua vez, pode ser detectado com o uso de anticorpos conjugados anti-BrdU e técnicas de imuno-histoquímica para sua marcação.

Nesse ensaio, a piplartina diminuiu a síntese de DNA em todas as concentrações testadas, resultando em menor número de divisões celulares, o que complementa os resultados do ensaio do MTT, a curva de crescimento celular e a exclusão por azul de tripan.

As colorações por H/E e brometo de etídio e acridina laranja (BE/AL) permitem analisar as características morfológicas das células, assim estas são úteis para sugerir o tipo de morte celular, seja por necrose ou apoptose.

Morte celular é um fenômeno essencial na homeostase do organismo e sua ocorrência tem sido documentada durante o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário. Esta não é apenas importante para o desenvolvimento normal, mas também para a vida adulta de muitos organismos vivos (GERCHENSON & ROTELLO, 1992; WEIL *et al.*, 1996). Dois processos distintos comandam a morte celular, nomeados apoptose e necrose (MAJNO & JORIS, 1995).

Apoptose é definido por alterações morfológicas incluindo condensação da cromatina, expulsão de vesículas, fragmentação nuclear e formação de corpos

apoptóticos. Caminhos centrais de sinalização responsáveis pela iniciação e progressão da apoptose foram identificados. De uma maneira geral, as muitas formas da apoptose se dão através da ativação de uma família de enzimas de pelo menos 14 proteases diferentes chamadas de caspases. Caspases são sintetizadas como precursores inativos chamados procaspases. A clivagem e ativação das procaspases podem ocorrer devido a uma série de estimulações incluindo ativação de receptores de morte e danos no DNA (HERR & DEBATIN, 2001; JOZA *et al.*, 2002). A apoptose é importante durante o desenvolvimento embrionário, metamorfose, atrofia dependente de hormônio e inibição tumoral, seja regulando o número de células ou eliminando células danificadas. O processo de apoptose induz a morte celular de forma altamente regulada que elimina células ou tecidos indesejados protegendo o organismo contra a formação de neoplasmas. O mecanismo defeituoso de apoptose pode ocasionar diversas patologias, inclusive câncer (MAJNO & JORIS, 1995; OPALKA *et al.*, 2002).

Necrose pode ocorrer no desenvolvimento de várias doenças incluindo câncer (DYPBUKT *et al.*, 1994), doenças neurodegenerativas (STAUNTON & GAFFNEY, 1998) e doenças autoimune (BARINAGA, 1998). Esta pode ser causada por estímulos tóxicos, bem como depleção de O₂ e stress oxidativo (LEIST & NICOTERA, 1997). Em contraste à apoptose, a morte por necrose é, freqüentemente, atribuída simplesmente a perturbações metabólicas ou injúrias mecânicas, onde há uma rápida desestabilização da membrana plasmática, sendo relacionada com a resposta inflamatória. Muitos estímulos indutores de apoptose (p. ex., citocinas, isquemia, calor, irradiação e patógenos) fazem com que células da mesma população morram por necrose (SERGEY *et al.*, 2003).

Necrose tem sido considerada um processo de degeneração completamente diferente da apoptose. Entretanto, tem sido demonstrado que a magnitude da injúria inicial e a variação do tipo de estímulo decide se a morte celular será seguida por apoptose ou necrose (HETTS, 1998). Estudos revelam que apoptose e necrose não são necessariamente caminhos patológicos

diferentes. Pois, eles podem apresentar os mesmos mensageiros, ativadores e inibidores (FORMIGLI *et al.*, 2000).

Na análise morfológica por H/E das células tratadas com piplartina, na menor concentração, por 24 horas, ambas as células revelaram uma aparência de sinais morfológicos de apoptose, incluindo condensação e fragmentação do DNA (HU *et al.*, 2003). Entretanto, alterações típicas de necrose foram observadas, em ambas as colorações H/E e brometo de etídio e acridina laranja (BE/AL), nas maiores concentrações, incluindo núcleo picnótico e desestabilização da membrana plasmática (KUMMAR *et al.*, 2004).

A evolução da oncologia experimental tem permitido a identificação de parâmetros que vêm sendo utilizados na descoberta de diversos compostos úteis no tratamento clínico das neoplasias (CARTER, 1980). Acredita-se que a quimioterapia do câncer, em animais e no homem, tem como objetivo reduzir o número de células tumorais viáveis, abaixo do qual, as células que sobrevivam ao tratamento à droga não sejam capazes de restabelecer a doença. Dessa maneira, os critérios estabelecidos das condições experimentais são primordiais. Assim, a seleção de tumores deverá ser baseada em alguns fatores como: diferentes índices cinéticos (*pool* proliferativo), diferentes susceptibilidades a compostos antitumorais conhecidos, ser universalmente usado e fazer comparações com resultados obtidos por outros investigadores, ser preferencialmente realizado em camundongos para reduzir a quantidade necessária do composto a ser testado, entre outras (PESSOA, 2000). Fundamentado no uso de tumores experimentais para a identificação de produtos naturais originais de plantas com potencial antitumoral, a atividade antitumoral da piplartina e da piperina foi avaliada em modelo experimental usando camundongos transplantados com Sarcoma 180. O 5-fluorouracil, um agente anticâncer de amplo espectro, vastamente utilizado na clínica para o tratamento de tumores sólidos, foi usado como controle na dose de 25 mg/kg.

Sarcoma 180 é um tumor original de camundongo e uma das linhagens celulares mais freqüentemente usadas na pesquisa de atividade antitumoral *in*

vivo (LEE *et al.*, 2003). Ambas as amidas, piplartina e piperina, apresentaram atividade neste modelo. A atividade antitumoral *in vivo* da piperina foi demonstrada anteriormente em modelo murino usando células ascíticas de linfoma de Dalton (SUNILA & KUTTAN, 2004), entretanto, este foi o primeiro trabalho a relatar a atividade antitumoral *in vivo* da piplartina.

Quanto à análise do tecido tumoral, os animais do grupo controle negativo apresentaram áreas de necrose de coagulação, sendo, provavelmente devido a hipóxia tecidual. Nos grupos tratados com as amidas, piplartina e piperina, e 5-FU essas áreas devem-se provavelmente a atividade antitumoral (KUMMAR *et al.*, 2004).

De acordo com Sunila & Kuttan (2004), a administração da piperina pode inibir significativamente o crescimento de tumor sólido induzido por células de linfoma de Dalton e carcinoma de Ehrlich e esta atividade antitumoral pode esta relacionada com sua propriedade imunomoduladora, que envolve a ativação celular e resposta imune humoral. Entretanto, Selvendiran *et al.* (2004) sugeriram que um ou mais caminhos patológicas independentes e interdependentes como a inibição da ativação de carcinógenos, sua atividade antioxidante e sua propriedade anti-radical livre podem ser responsáveis pelo potencial anticâncer da piperina.

A piperina também apresenta efeito inibitório em metástase de pulmão em modelo experimental em células B16F-10 (PRADEEP & KUTTAN, 2002). A piperina inibe o crescimento de células B16F-10. Isto pode ser devido à inibição de isoenzimas p450. N-hexano, um derivado da piperina, também inibe a expressão de ciclooxigenase-1 (STOHR *et al.*, 2001). Estas propriedades podem contribuir para a atividade antimetastática da piperina (PRADEEP & KUTTAN, 2002). A piperina é um potente inibidor do fator- $\kappa\beta$ nuclear (NF- $\kappa\beta$), metaloproteinase e genes de citocinas pro-inflamatórias (PRADEEP & KUTTAN, 2004). O fator- $\kappa\beta$ nuclear (NF- $\kappa\beta$) está superexpresso em tumores malignos como por exemplo câncer coloretal, câncer de mama, leucemias de células T e adenocarcinoma pancreático (LIND *et al.*, 2001; NAKSHATRI *et al.*, 1997; MORI *et al.*, 1999).

Metaloproteinasas apresentam um relevante papel na disseminação do tumor bem como na degradação dos componentes da matrix extracelular, o qual regula positivamente a invasão e a metástase (CAZORLA, 1998). Assim, essa inibição da expressão do fator- $\kappa\beta$ nuclear (NF- $\kappa\beta$) e metaloproteinasas podem ser responsáveis pela atividade antimetastática da piperina (PRADEEP & KUTTAN, 2004).

Como já mencionado o mecanismo que envolve a atividade antitumoral da piperina ainda não está elucidado. Sua atividade imunomoestimulante é, ainda, controversa. Dogras *et al.* (2004) demonstraram que a piperina na dose de 4,5 mg/kg causou um significativo efeito imunodepressor, diminuindo a massa e a população de células do baço dos animais tratados. Em nossos resultados, foi também observada uma redução na massa do baço nos animais tratados com piperina, mas apenas na dose de 100 mg/kg. A piplartina, por sua vez, não afetou o baço dos animais tratados.

Através da metodologia de imunohistoquímica, onde utilizou um anticorpo de proteínas nucleares de células em proliferação, obtemos dados sobre a taxa de proliferação das células tumorais. O anticorpo monoclonal Ki67, descrito por (GERDES *et al.*, 1983), é um anticorpo monoclonal de rato que identifica um antígeno nuclear associado com as fases G₁, S, G₂ e M do ciclo celular. Esta molécula é expressa ao longo de todo o ciclo celular, menos em G₀ e início de G₁ (GERDES *et al.*, 1983). Assim, resultados obtidos pela marcação com Ki67 reforçam que a atividade antitumor da piperina não está relacionada com uma redução da taxa de proliferação do tumor. De fato, a piperina possui apenas uma fraca atividade citotóxica, o que enfatiza que sua atividade antitumoral não está relacionada com um efeito antiproliferativo direto nas células tumorais.

De qualquer modo, a atividade da piplartina parece ser diferente daquela encontrada para a piperina. A atividade antitumoral da piperina parece ser mediada pelo hospedeiro enquanto que a piplartina parece atuar de maneira direta nas células tumorais. Como observado nos modelos *in vitro*, a piplartina causou inibição da síntese de DNA e induziu morte celular por necrose. Estudos de

imunohistoquímica observados com marcação com Ki67 demonstraram que a atividade antitumoral da piplartina é associada com uma redução na taxa de proliferação tumoral, o qual confirma o seu efeito antiproliferativo.

As análises histopatológicas dos órgãos removidos de animais tratados sugerem que o fígado pode ser considerado como alvo potencial da toxicidade da piperina. A piplartina também afetou o fígado, porém de maneira menos intensa. Muitos achados em biópsias sugerem que as drogas devem ser consideradas como possível causa de qualquer lesão *in vivo*. Um grande número de drogas com atividade antitumoral *in vivo* e também de substâncias com estruturas químicas variadas diferem ocasionalmente e amplamente de suas ações farmacológicas dando origem às lesões mais importantes *in vivo* (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000).

Degeneração dos hepatócitos acompanhado por esteatose microvesicular em algumas áreas foram observadas nos animais tratados com piperina, sugerindo hepatopoxidade intrínseca, o qual produz danos ao fígado quando tomada em quantidade suficiente. De qualquer modo, regeneração do tecido hepático ocorre em muitas doenças, exceto quando ocorre um grande dano. Até quando a necrose hepatocelular está presente, mas o tecido conjuntivo está preservado, a regeneração é quase completa (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000; KUMMAR, 2004). As alterações hepáticas observadas nos animais tratados com piperina podem ser consideradas reversíveis (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000; KUMMAR, 2004; MCGEE *et al.*, 1992).

Em animais do grupo controle negativo também foi visualizada tumefação turva dos hepatócitos e áreas de congestão portal e da centrolobular, sugerindo que estes efeitos estão relacionados ao metabolismo dos hepatócitos (KUMMAR *et al.*, 2004) que podem ter sido causado pelo tumor ou pelo veículo (DMSO 10%). Além disso, os animais tratados com 5-FU também apresentaram hiperplasia das células de Kupffer, o que sugere a toxicidade da droga (KUMMAR *et al.*, 2004).

Ambas as amidas afetaram os rins, porém este órgão parece ser o maior alvo de toxicidade para a piplartina. Vacuolização do epitélio e trechos

hemorrágicos em algumas áreas foram observadas nos animais tratados com piplartina, sugerindo discreta nefrotoxicidade, entretanto, quando o tecido é preservado, a regeneração é completa. Assim, as alterações observadas nos animais tratados com a piplartina e a piperina podem ser consideradas reversíveis (TISHER & BRENNER, 1994).

De qualquer modo, os dados *in vivo* reforçam o potencial anticâncer de ambas as amidas, sugerindo que a piplartina e a piperina apresentam potencial atividade antineoplásica. Entretanto as amidas parecem atuar por vias diferentes, piplartina agindo de maneira direta na célula, inibindo a síntese de DNA da célula tumoral, levando-a a morte enquanto que a piperina apresenta uma atividade anticâncer mediada pelo hospedeiro. Estas também diferem quanto à toxicidade *in vivo*, piperina é mais tóxica para o fígado que piplartina que por sua vez afeta mais os rins. Estudos mais detalhados são necessários para elucidar o mecanismo de ação de ambas as amidas, bem como a relação estrutura-atividade.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Ambas as amidas, piplartina e piperina, apresentam potencial antimitótico, entretanto, a piplartina apresenta um potencial citotóxico superior ao da piperina. De qualquer modo, o potencial citotóxico de nenhuma das amidas parece estar relacionado com danos na membrana. Quando avaliado o possível mecanismo de ação da piplartina, verificou-se que esta se comporta como um agente citotóxico causando alterações no ciclo celular como inibição na síntese de DNA e indução de morte por apoptose e necrose.

Quando testadas em modelo pré-clínico *in vivo*, ambas as amidas reduzem o crescimento de tumores da linhagem Sarcoma 180, o que as confere um promissor potencial antitumoral. Porém, as amidas parece atuar de maneira diferente. A toxicidade também é diferente, piperina é mais tóxica para o fígado que piplartina que por sua vez afeta mais os rins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAEV, F.I. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus L.*). **Exp. Biol. Med.**, 227, 20 – 25, 2002.

AKERELE, O. WHO Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. **HerbalGram**, 28, 13-20, 1993.

AKI, H. & YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. Flow microcalorimetric approaches. **Biochem. Pharmacol.**, 41, 133 – 138, 1991.

ALTMANN, K. H. Recent developments in the chemical biology of epothilones. **Curr. Pharm. Des.**, 11, 1595 – 1613, 2005.

ATAL, C. K., DUBEY, R. K. & SINGH, J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: Evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. **J. Pharm. Exp. Ther.**, 232, 258 – 262, 1985.

BADER, G., PLOHMANN, B., HILLER, K. & FRANZ, G. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. **Pharmazie**, 51, 414 - 417, 1996.

BALDOQUI, D.C., KATO, M.J., CAVALHEIRO, A.J., BOLZANI, V.S., YOUNG, M.C.M. & FURLAN, M.A. Chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, 51, 899 - 902, 1999.

BARINAGA, M. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? **Science**, 281, 1302 – 1303, 1998.

BARNETT, C.J., CULLINAN, G.J., GERZON, K., HOYING, R.C., JONES, W.E., NEWLON, W.M., POORE, G.A., ROBISON, R.L., SWEENEY, M.J., TODD, G.C., DYKE, R.W. & NELSON, R.L. Structure-activity relationships of dimeric

Catharanthus alkaloids. 1. Deacetylvinblastine amide (vindesine) sulfate. **J. Med. Chem.**, 21, 88 - 96, 1978.

BARREIRO, E.J. & FRAGA, C.A.M. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. **São Paulo- ARTMED Editora Ltda**, 2001.

BOHLIN, L. & ROSÉN, B. Podophyllotoxin derivatives: drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, 1, 343 - 351, 1996.

BOIK, J. Natural compounds in cancer therapy. **Oregon Medical Press**, Minnesota, USA, p. 25, 2001.

BOLLAG, D. M., MCQUENEY, Z. J., HENSENS, O., KOUPAL, K., LIESCH, J., GOETZ, M., LAZARIDES, D. & WOODS, C. M. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. **Cancer Res.**, 55, 2325 - 2333, 1995.

BORRIS, R.P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **J. Ethnopharmac.**, 51, 29 - 38, 1996.

BRANDHORST, B.P. Informational content of the echinoderm egg. **Dev. Biol.**, 1, 525 - 576, 1985.

BRAZ-FILHO, R., SOUZA, M.P. & MATTOS, M.E.O. Piplartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, 20, 345 - 346, 1981.

BRUCE, A.C. Anticancer drugs. In Devitta VT, Hellman S, Rosenberg SA (ed), *Cancer, principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: **Lippincott**, 325 - 340, 1993.

BUTLER & DAWSON. Cell culture. Blackwell, **Scientific Publications**, 1992.

CARTER, S.K. Cancer chemotherapy: new developments and changing concepts. **Drugs.**, 20, 375 - 397, 1980.

CARVALHO, P., TIRNAUER, J. S. & PELLMAN, D. Surfing on microtubule ends. **Trends Cell. Biol.**, 5, 229 - 237, 2003.

CAZORLA, M., HERNANDEZ, L. & NADAL, A. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. **J. Pathol.**, 186, 144 –150, 1998.

CHAROENPORNSOOK, K., FITZPATRICK, J.L. & SMITH, J.E. The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Mycophatologia**, 143, 105 – 111, 1998.

CHUANG, S.E, KUO, M.L., HSU, C.H., CHEN, C.R., LIN, J.K., LAI, G.M., HSIEH, C.Y. & CHENG, A.L. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, 21, 331 – 335, 2000.

COLLINS, S.J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, 70, 1233 - 1244, 1987.

COLLINS, S.J., GALLO, R.C. & GALLAGHER, R.E. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. **Nature**, 270, 347 - 349, 1977.

CONNORS, J. M. State-of-the-art therapeutics: Hodgkin's lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, 23, 6400 – 6408, 2005.

CORDELL, G.A., QUINN-BEATTIE, M.L. & FARNSWORTH, N.R. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. **Phytother. Res.**, 15, 183 – 205, 2001.

CORTNER, J. & WOUDE, G.F.V. Essentials of Molecular Biology. In: Devita, V.T., Hellman, S., Rosenbreg, S.A. Cancer: Principles and Practice of Oncology. 5 ed. Philadelphia: **Lippincott-Raven Publishers**, 3 - 33, 1997.

COSTA-LOTUFO, L.V., CUNHA, G.M.A, FARIAS, P.A.M., VIANA, G.S.B, CUNHA, K.M.A., PESSOA, C., MORAES, M.O., SILVEIRA, E.R., GRAMOSA, N.V., RAO, V.S.N. The Cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffi* oleo-resin. **Toxicol.**, 40, 1231 - 1234, 2002.

CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Exp. Opin. Invest. Drugs.**, 9, 1 - 15, 2000.

CRAGG, M.G. & NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmac.**, 100, 72-79, 2005.

DELGADO, H. P., PILLADO, F. G., SORDO, M., APAN, T.R., VAZQUEZ, M. M. & WEGMAN, P.O. Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentatins A and B from *Parthenium argentatum* (Gray). **Life Sciences**, 77, 2855 - 2865, 2005.

DI BACCO, A., KEESHAN, K., MCKENNA, S.L. & COTTER, T.G. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia deregulation of cell growth and apoptosis. **Oncologist.**, 5, 405 – 410, 2000.

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

DOLBEARE, F., GRATZNER, H., PALLAVICINI, M.G. & GRAY, J.W. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 80, 5573 - 5577, 1983.

DRESCH, R.R., HAESER, A.S., LERNER, C., MOTHE, B., VOZÁRI-HAMPE, M.M. & HENRIQUES, A.T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Ver. Brás. Farmacog.** 15, 16 - 22, 2005.

DUARTE, C. M., VERLI, H., ARAUJO-JUNIOR, J.X., MEDEIROS, I.A., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A. New optimized piperamide analogues with potent in vivo hypotensive properties. **Eur. J. Pharm. Sci.**, 23, 363 - 369, 2004.

DUH, C. Y. & WU, Y. C. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. **J. Nat. Prod.**, 53, 1575 – 1577, 1990.

DUH, C. Y., WU, Y. C. & WANG, S. K. Cytotoxic pyridone alkaloids from *Piper aborescens*. **Phytochemistry** , 29, 2689 – 2691, 1990.

DYPBUKT, J.M., ANKARCORONA, M., BURKITT, M., SJOHOLM, A., STROM, K., ORRENIUS, S. & NICOTERA, P. Different pro-oxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. **J. Biologic. Chem.**, 269, 30533 – 30560, 1994.

FALINI, B., FLENGHI, L., FAGIOLI, M., STEIN, H., SCHWARTING, R., RICCARDI, C., MANOCCHIO, I., PILERI, S., PELICCI, P.G. & LANFRANCONE, L. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. **J. Histochem. Cytochem.**, 37, 1471 – 1478, 1989.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mut. Res.**, 455, 81 – 95, 2000.

FLECK, J. Câncer-Integração Clínico Biológico. **Ed. Médica e Científica Ltda**, Rio de Janeiro, 1992.

FORMIGLI, L., PAPUCCI, L., TANI, A., SCHIAVONE, N., TEMPESTINI, A., ORLANDINI, G.E., CAPACCIOLI, S. & ORLANDINI, S.Z. Apoptosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. **J. Cellul. Physiol.**, 182, 41 – 49, 2000.

FORNELLI, F., MINERVINI, F. & LOGRIECO, A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). **J. Inverteb. Pathol.**, 85, 74 – 79, 2004.

FUSETANI, N. Marine metabolites which inhibit development of echinoderm embryos. In: Biorganic Marine Chemistry. Ed. P. J. Scheur. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 175, 1987.

GALLAGHER, R., COLLINS, S., TRUJILLO, J., MCCREDIE, K., AHEARN, M., TSAI, S., METZGAR, R., AULAKH, G., TING, R., RUSCETTI, F. & GALLO, R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, 54, 713 - 733, 1979.

GARCIA-OLMO, D.C., RIESE H.H., ESCRIBANO, J., ONTANON, J., FERNANDEZ, J.A., ATIENZAR, M. & GARCIA-OLMO, D. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus L.*): an experimental study in the rat. **Nutr. Cancer**, 35, 120–126, 1999.

GEBHARDT, R. In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Med.**, 66, 99 - 105, 2000.

GENG, C.X., ZENG, Z.C. & WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World J. Gastroenterol.**, 9, 696 - 700, 2003.

GERCHENSON, M.A. & ROTELLO, R.J. Apoptosis: a different type of cell death. **FASEB J.**, 6, 2450 – 2455, 1992.

GERDES, J., SCHWAB, U., LEMKE, H. & STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer.**, 1, 13 - 20, 1983.

GRINBERG, L.N., NEWMARK, H., KITROSSKY, N., RAHAMIM, E., CHEVION, M. & RACHMILEWITZ, E.A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochem Pharmacol.**, 54, 973 - 978, 1997.

GRZANKA, A., GRZANKA, D. & ORLIKOWSKA, M. Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. **Biochem. Pharmacol.**, 66, 1611 – 1617, 2003.

GUERRERO, R.O., RIVERA, S.M., RIVERA, S. & SUEIRO, L.A. Bioassay screening of Amazonian plants. **P. R. Health Sci. J.**, 22, 291 - 297, 2003.

HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, 30, 3864 - 3874, 1991.

HARRIS, C. R. & DANISHEFSKY, S. J. "Complex Target Oriented Synthesis in the Drug Discovery Process: A Case History in the dEpoB Series". **J. Org. Chem.**, 64, 8434 - 8456, 1999.

HARTWELL, J.L. Plants used against cancer. A. **Survey Lloydia (cinci)**, 30, 379 - 436, 1967.

HERR, I. & DEBATIN, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, 98, 2603 – 2614, 2001.

HETTS, S.W. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. **J. Americ. Medic. Associat.**, 279, 300 – 307, 1998.

HOFLE, G., BEDORF, N., STEINMETZ, H., SCHOMBURG, D., GERTH, K. & REICHENBACH, H. Epothilone A and B -- novel 16-membered macrolides with cytotoxic activity: isolation, crystal structure, and conformation in solution. **Angew Chem. Int. Ed.**, 35, 1567, 1996.

HOFLE, G., GLASER, N., LEIBOLD, T. & SEFKOW. M. Epothilone A-D and their thiazole-modified analogs as novel anticancer agents. **Pure Appl. Chem.**, 71, 2019 - 2024, 1999.

HOLM, M., THOMSEN, M., & HOYER, M. Hokaland P Optimization of a flow cytometric method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and in vitro BrdU incorporation into normal and malignant hematopoietic cells. **Cytometry**, 32, 28 - 36, 1998.

HU, W. & KAVANAGH, J.J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **Lancet Oncol.**, 4, 721 - 29, 2003.

HYNES, J., FLOYD, S., SOINI, A.E., O'CONNOR, R. & PAPKOVSKY, D.B. Fluorescence-Based Cell Viability Screening Assays Using Water-Soluble Oxygen Probes. **J. Biomolec. Screening**, 8, 264 - 272, 2003.

INCA. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, Brasil, 2004.

JACOBS, R. S., WHITE, S., & WILSON, L. Selective compounds derived from marine organisms: effects on cell division in fertilized sea urchin eggs. **Fed. Proc.**, 40, 26 – 29, 1981.

JACOBS, R.S. & WILSON, L. Fertilized sea urchin egg as a model for detecting cell division inhibitors. In: Modern analysis of antibiotics. **Ed. By A. Aszalor and Marcel Dekker**, Inc., 481 - 493, 1986.

JENKS, S. & SMIGEL, K. Updates: cancer drug approved; new leukemia treatment. **J. Nat. Cancer Inst.**, 87, 167 - 170, 1995.

JIMENEZ, P. C., FORTIER, S. C., LOTUFO, T. M. C., PESSOA, C., MORAES, M. E. A., MORAES, M. O. & COSTA-LOTUFO, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 287, 93 – 101, 2003.

JOZA, N., KROEMER, G. & PENNINGER, J.M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. **Trends Genet**, 18, 142 – 149, 2002.

KAREKAR, V. R., MUJUMDAR, A. M., JOSHI, S. S., DHULEY, J., SHINDE, S. L., & GHASKADBI, S. Assessment of genotoxic effect of piperine using *Salmonella typhimurium* and somatic and germ cells of Swiss albino mice. **Arzneimittelforschun.**, 46, 972 – 975, 1996.

KATIYAR, S.K., AGARWAL, R. & MUKHTAR, H. Inhibition of tumor promotion in SENCAR mouse skin by ethanol extract of *Zingiber officinale* rhizome. **Cancer Res.**, 56, 1023 – 1030, 1996.

KHAJURIA, A., THUSU, N., ZUTSHI, U. & BEDI, K.L. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. **Mol. Cell. Biochem.**, 189, 113 - 118, 1998.

KIM, S.K., RYU, S.Y., NO, J., CHOI, S.U. & KIM, Y.S. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. **Arch. Pharm. Res.**, 24, 518 - 521, 2001.

KINGSTON, D.G.I. "The Chemistry of Taxol". **Pharmac. Ther.**, 52, 1 - 34, 1991.

KINGSTON, D.G.I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: *The Practice of Medicinal Chemistry*. Ed. by Wermuth CG. **Academic Press Limited**, 102 - 114, 1996.

KINGSTON, D.G.I. Recent advances in the chemistry of taxol. **J. Nat. Prod.**, 63, 726 – 734, 2000.

KIRSCH-VOLDERS, M., ELHAJOUJI, A., CUNDARI, E. & VAN, H.P. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. **Mut. Res.**, 392, 19 – 30, 1997.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. Ed. **Guanabara**, Rio de Janeiro, 1998.

KUMMAR, V., ABBAS, A., FAUSTO, N., ROBBINS & COTRAN. *Pathology Basis of Disease*, 7th ed. China: **WB Saunders**, 1552, 2004.

LAMPE, J.W. Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. **Am. J. Clinic. Nutrit.**, 78, 579S - 583S, 2003.

LEE, K. H. Novel Antitumor Agents from Higher Plants. **Inc. Med. Res. Rev.**, 19, 569 – 596, 1999.

LEE, S.A, HONG, S.S., HAN, X.H., HWANG, J.S., OH, G.J., LEE, K.S., LEE, M.K., HWANG, B.Y., RO, J.S. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. **Chem. Pharm. Bull.**, 53, 832 - 835, 2005.

LEE, S.E. Mosquito larvicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum*. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, 16, 245 - 247, 2000.

LEE, Y.L., KIM, H.J., LEE, M.S., KIM, J.M., HAN, J.S., HONG, E.K., KWON, M.S. & LEE, M.J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Exp. Anim.**, 52, 371 - 375, 2003.

LEIST, M. & NICOTERA, P. The shape of cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 236, 1 – 9, 1997.

LIND, D.S., HOCHWALD, S.N., MALATY, J., REKKAS, S., HEBIG, P., MISHRA, G., MOLDAWER, L.L., COPELAND, E.M. & MACKAY, S. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. **Surgery**, 130, 363 - 369, 2001.

LITCHFIELD, J. T. & WILCOXON, F. A. simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharm. Exp. Ther.**, 95, 99 – 113, 1949.

LIU, W.M., STIMSON, L.A. & JOEL, S.P. The in vitro activity of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in Bcr-Abl positive chronic myeloid leukemia cells: Synergistic interactions with antileukemic agents. **Br. J. Cancer.**, 86, 1472 – 1478, 2002.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D. & DARNELL, J. *Molecular Cell Biology*, W. H.; **Freeman and Company Inc.**: New York, 475, 1999.

LOHEZIC, L.E., DEVEHAT, F., BAKHTIAR, A., BEZIVIN, C., AMOROS, M. & BOUSTIE, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. **Fitoterapia**, 73, 400 - 405, 2002.

LOPEZ, A., HUDSON, J.B. & TOWERS, G.H. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.**, 77, 189 - 196, 2001.

MAJNO, G. & JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **Americ. J. Pathol.**, 146, 3 – 15, 1995.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews/Cancer**, 2 143 - 148, 2002.

MARU, Y. Molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Int. J. Hematol.**, 73, 308 – 322, 2001.

MATA, R., MORALES, I., PEREZ, O., RIVERO-CRUZ, I., ACEVEDO, L., ENRIQUEZ-MENDOZA, I., BYE. R., FRANZBLAU, S. & TIMMERMANN, B. Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. **J. Nat. Prod.**, 67, 1961 - 1968, 2004.

MCGAHON, A. J., MARTIN, S. M., BISSONNETTE, R. P., MAHBOUBI, A., SHI, Y., MOGIL, R. J., NISHIOKA, W. K. & GREEN, D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Meth. Cell Biol.**, 46, 153 – 185, 1995.

MCGEE, J.O.D., ISAACSON, P.A. & WRIGHT, N.A. Oxford Textbook of Pathology: Pathology of Systems. New York: **Oxford University Press**, 1708, 1992.

MENDELSON, R. & BALICK, M.J. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. **Econ. Bot.**, 49, 223 - 228, 1995.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R, PUTNAM, J. E, JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., & MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.** 45, 31 – 34, 1982.

MINERVINI, F., FORNELLI, F. & FLYNN, K.M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, depxynivalenol, and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. **Toxicol. In Vitro**, 18, 21 – 28, 2004.

MITTAL, R. & GUPTA, R. L. In vitro antioxidant activity of piperine. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, 22, 271 – 274, 2000.

MORI, N., FUJII, M., IKEDA, S., YAMADA, Y., TOMONAGA, M., BALLARD, D.W. & YAMAMOTO, N. Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. **Blood**, 93, 2360 - 2368, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 16, 55 – 63, 1983.

MUNRO, M.H.G., LUIBRAND, R.T. & BLUNT, J.W. The search for antiviral and anticancer compounds in marine organisms. In: Scheuer, PJ (ED) Bioorganic Marine Chemistry. **Ed. By Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 1987.

NAKSHATRI, H., BHAT-NAKSHATRI, P., MARTIN, D.A., GOULET, R.J.J. & SLEDGE, G.W.J. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. **Mol. Cell. Biol.**, 17, 3629 - 3639, 1997.

NAVICKIENE, H.M.D., ALÉCIO, A.C., KATO, M.J., BOLZANI, V.S., YOUNG, M.C.M., CAVALHEIRO, A.J. & FURLAN, M. Antifungal amides from Piper hispidum and Piper tuberculatum. **Phytochemistry**, 55, 621 – 626, 2000.

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

NG, T.B., LI, W.W. & YEUNG, H.W. A sterol glycoside fraction with hemolytic activity from tubers of Momordica cochinchinensis. **J. Ethnopharmacol.**, 18, 55 - 61, 1986.

NICOLAOU, K.C.N., WINSSINGER, J., PASTOR, S., NINKOVIC, F., SARABIA, Y., HE, D., VOURLOUMIS, Z., YANG, T., LI, P., GIANNAKAKOU, E. & HAMEL. Synthesis of epothilones A and B in solid and solution phase. **Nature**, 387, 238 – 239, 1997.

OJIMA, I., PACK, Y. H., ZUCCO, M., PARK, Y. H., DUCLOS, O. & KUDUK, S. A Highly Efficient Route To Taxotere by The β -lactam Synthon Method, **Tetrahedron Lett.**, 34, 4149 - 4152, 1993.

OPALKA, B., DICKOPP, A. & KIRCH, H.C. Apoptotic genes in cancer therapy. **Cells Tissues Organs**, 172, 126 – 132, 2002.

ORTHOLAND, J.Y. & GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, B, 271 – 280, 2004.

OWELLEN, R.J., HARTKE, C.A. & HAINS, F.O. Pharmacokinetics and metabolism of vinblastine in humans. **Cancer Res.**, 37, 2597 – 2602, 1977.

PADMAJA, R., ARUN, P.C., PRASHANTH, D., DEEPAK, M., AMIT A. & ANJANA, M. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, 73, 508 – 510, 2002.

PARK, I.K., LEE, S.G., SHIN, S.C., PARK, J.D. & AHN, Y.J. Larvicidal activity of isobutylamides identified in Piper nigrum fruits against three mosquito species. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 1866 – 1870, 2002.

PARMAR, V.S., JAIN, S.C., BISHT, K.S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O.M., PRASAD, A.K., WENGEL, J., OLSEN, C.E. & BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, 46, 597 – 673, 1997.

PERKINS, A. S. & STERN, D.F. Molecular Biology of Cancer: Oncogenes. In: Devita, V.T., Hellman, S., Rosenbreg, S.A. Cancer: Principles and Practice of Oncology. 5 ed. Philadelphia: **Lippincott-Raven Publishers**, 79 - 102, 1997.

PESSOA, C. Determinação do mecanismo de ação citotóxica de alguns compostos extraídos de plantas do nordeste brasileiro. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** – Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2000.

PEZZUTO, J.M. Plant-derived anticancer agents. **Biochem. Pharmac.**, 53, 121 - 133, 1997.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, 56, 237 – 243, 2001.

PLASSCHAERT, S. L., GRONINGER, E., BOEZEN, M., KEMA, I., VRIES, E. G., UGES, D., VEERMAN, A. J., KAMPS, W. A., VELLENGA, E., GRAAF, S. S. & BONT, E. S. Influence of functional polymorphisms of the MDR1 gene on vincristine pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 76, 220 – 229, 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**, 19, 703 – 708, 2002.

PRADEEP, C.R. & KUTTAN, G. Effect of piperine on the production of nitric oxide and TNF- α in vitro as well as in vivo. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, 25, 337 – 346, 1999.

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

QUINN, C.M. & WRIGHT, N.A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and application as prognostic variables. **J. Pathol. Chinchester**, 160, 93 - 102, 1990.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39, 603-613, 2001.

RAZA, A., BOKHARIJ, YOUSU, N., MEDHI, A., MAZEWSKI, C., KHAN, S., BAKER, V. & LAMPKIN, B. Cell cycle kinetic studies in human cancers. **Arch. Pathol. Lab. Medic.**, 115, 873 - 879, 1991.

REDDY, L., ODHAV, B. & BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmac. Therap.**, 99, 1 – 13, 2003.

RINGEL, J. & HORWITZ, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. **J. Natl. Cancer Inst.**, 83, 288 – 291, 1991.

ROCHA, A.B., LOPES, R.M. & SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmac.**, 1, 364 – 369, 2001.

RUPERT, E.E. & BARNES, R.B. Zoologia dos Invertebrados. **Ed. Rocca Ltda**, 6ª edição. São Paulo, 1996.

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacol. Ther.**, 1, 411 - 435, 1977.

SCHEUER, P.J. & LEFKOWITCH, J.H. Drugs and Toxins. In: Scheuer PJ, Lefkowitz, JH, eds. Liver Biopsy Interpretation, 6th ed. London: **WB Saunders**, 134 - 150, 2000.

SELVENDIRAN, K., BANU, S.M. & SAKTHISEKARAN, D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Clin. Chim. Acta.**, 350, 73 – 78, 2004.

SERGEY, Y.A.P., ANATOLI, G.K., GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exp. Cell Res.**, 283, 1 - 16, 2003.

SHOEMAKER, R. Antitumor drug screening with a human tumor colony forming assay (HTCFA). **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, 25, 1292, 1984.

SILVA, R.V., NAVICKIENE, H.M.D., KATO, M.J., BOLZANI, V.S., MÉDA, C.I., YOUNG, M.C.M., FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, 59, 521 – 527, 2002.

SILVA, E.M.J. & MACHADO, S.R. Structure and development of the secretory trichomes in leaves of *Piper regnellii* (Miq) C. DC. var *regnellii* (Piperaceae). **Rev. Bras. Bot.**, 22, 117 - 124, 1999.

SINGH, J., REEM, R.K. & WIEBEL, F.J. Piperine, a major ingredient of black and long peppers protects against AFB1-induced cytotoxicity and micronuclei formation in H4IIEC3 rat hepatoma cells. **Cancer Lett.**, 86, 195 – 200, 1994.

SLUPIANEK, A., SCHMUTTE, C., TOMBLINE, G., NIEBOROWSKA-SKORSKA, M., HOSER, G., NOWICKI, M.O., PIERCE, A.J., FISHEL, R. & SKORSKI, T. Bcr/Abl regulates mammalian RecA homologs resulting in drug resistance. **Mol. Cell.**, 8, 795 – 806, 2000.

STACHEL, S. J., BISWAS, K. & DANISHEFSKY, S. J. The epothilones, eleutherobins, and related types of molecules. **Curr. Pharm. Des.**, 7, 1277 – 1290, 2001.

STAUNTON, M.J. & GAFFNEY, E.F. Apoptosis: basic concepts and potential significance in human cancer. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 122, 310 – 319, 1998.

STEFANSKA, B., BONTEMPS-GRACZ, M.M., ANTONINI, I., MARTELLI, S., ARCIEMIUK, M., PIWKOWSKA, A., ROGACKA, D. & BOROWSKIA, E. 2,7-Dihydro-3H-pyridazino[5,4,3-kl]acridin-3-one derivatives, novel type of cytotoxic agents active on multidrug-resistant cell lines. Synthesis and biological evaluation. **Bioorg. Med. Chem.**, 13, 1969 – 1975, 2005.

STOHR, J.R., XIAO, P.G. & BAUER, R. Constituents of Chinese Piper species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro. **J. Ethnopharmacol.**, 75, 133 – 139, 2001.

SUNILA, E.S. & KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. **J. Ethnopharmacol.**, 90, 339 – 346, 2004.

SURH, Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. **Mutat. Res.**, 428, 305 – 327, 1999.

TISHER, C.C. & BRENNER, B.M. Renal Pathology: with clinical and functional correlations, 2nd edition. Philadelphia: **J. B. Hippincott Company**, 769, 1994.

TOOGOOD, L.P. Progress toward the development of agents to modulate the cell cycle. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 6, 472 – 478, 2002.

TSAI, I.L., LEE, F.P., WU, C.C., DUH, C.Y., ISHIKAWA, T., CHEN, J.J., CHEN, Y.C. & SEKI, New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. **Planta Med**, 71, 535 – 542, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V.F. & PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, 28, 519 - 528, 2005.

VENDITI, J.M. The National Cancer Institute antitumor drug discovery program, current and future perspective: a commentary. **Cancer Treat. Rep.**, 67, 767, 1983.

VENKATASAMY, R., FAAS, L., YOUNG, A.R., RAMAN, A. & HIDER, R.C. Effects of piperine analogues on stimulation of melanocyte proliferation and melanocyte differentiation. **Bioorg. Med. Chem.**, 12, 1905 – 1920, 2004.

VERAS, M.L., BEZERRA, M.Z., BRAZ-FILHO, R., PESSOA, O.D., MONTENEGRO, R.C., PESSOA, C., MORAES, M.O., COSTA-LUTUFO, L.V. Cytotoxic epimeric withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. *Planta Med.*, 70, 551 – 555, 2004.

WANG, H.K. & LEE, K.H. Plant-derived anticancer agents and their analogs currently in clinical use or in clinical trials. **Bot. Bull. Acad. Sinica**, 38, 225, 1997.

WANI, M.C., TAYLOR, H.L., WALL, M.E., COGGON, P. & MCPHAIL, A.T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.**, 93, 2325 – 2327, 1971.

WEIL, M., JACOBSON, M.D., COLES, H.S.R., DAVIES, T.J., GARDNER, R.L., RAFF, K.D. & RAFF, M.C. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. **J. Cell Biol.**, 133, 1053 – 1059, 1996.

WHO, BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review, **Geneva**, 1998.

www.cancer.org. Capturado em 18 de Agosto de 2005.

YANG, Y.C., LEE, S.G., LEE, H.K., KIM, M.K., LEE, S.H. & LEE, H.S. A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. **J. Agric. Food. Chem.**, 50, 3765 – 3767, 2002.

ZHANG, A., ZHU, Q.Y., LUK, Y.S., HO, K.Y., FUNG, K.P. & CHEN, Z.Y. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sci.**, 61, 383 – 394, 1997.