



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER DA PIPLARTINA

DANIEL PEREIRA BEZERRA

**FORTALEZA – CE
2008**

DANIEL PEREIRA BEZERRA

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER DA PIPLARTINA

Tese submetida à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Leticia Veras Costa Lotufo

Fortaleza - CE

2008

B469e Bezerra, Daniel Pereira

Estudo das propriedades anticâncer da piplartina/Daniel
Pereira Bezerra; Orientadora: Leticia Veras Costa-Lotufo.
– Fortaleza, 2008.
273 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina, 2008.

1. Ensaios de Seleção de Medicamentos Antitumorais.
 2. Alcalóides. 3. Amidas. 4. Testes de Mutagenicidade.
 5. Antineoplásicos I. Costa-Lotufo, Leticia Veras (Orient.).
- II Título.

CDD 615.323925

DANIEL PEREIRA BEZERRA

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER DA PIPLARTINA

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

Aprovada em: 27/06/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Letícia Veras Costa-Lotufo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a. Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Rommel Mário Rodríguez Burbano
Universidade Federal do Pará-UFGPA

Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP

A Deus

Agradecimentos

À Profª Drª *Letícia Veras Costa-Lotufo*, pela orientação deste trabalho, pela ajuda, incentivo e paciência demonstrada em todos os momentos de trabalho em comum;

À Profª Drª *Claudia do Ó Pessoa*, por todas as dúvidas esclarecidas no desenvolver da pesquisa e pela amizade;

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

À Profª Drª *Raquel Carvalho Montenegro*, pelo auxílio prestado e dicas essenciais;

À Profª Drª *Ana Paula Negreiros Nunes Alves*, pelos esclarecimentos sobre patologia e as análises histopatológicas;

À Profª Drª *Otília Deusdênia Loiola Pessoa*, Profª Drª *Jane Eire Silva Alencar de Menezes*, Profª Drª *Mary Anne Sousa Lima* e ao Prof. Dr. *Edilberto Rocha Silveira*, pela colaboração neste trabalho;

À Profª Drª *Nylane Maria Nunes Alencar*, pela colaboração neste trabalho;

Ao Prof. Dr. *João Antônio Pegas Henriques* e a Profª Drª *Jenifer Saffi* da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela colaboração neste trabalho;

Ao Prof. Dr. *Norberto Peporine Lopes* e a Profª Drª *Pierina Sueli Bonato* pela oportunidade de conviver e aprender em seus laboratórios na Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto;

À Drª *Valquíria Aparecida Polisel Jabor* da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, pelo auxílio imensurável no estudo farmacocinético;

Ao Prof. Dr. *Rommel Mário Rodríguez Burbano* da Universidade Federal do Pará, por ter aceitado participar desta banca de doutorado;

Ao Prof. Dr. *Vietla Satyanarayana Rao*, por ter aceitado participar desta banca de doutorado;

Aos pós-graduandos do *Laboratório de Oncologia Experimental*: Cecília, Márcio, Kristiana, José Roberto, Diego, Michel, Ivana, Danilo, Patrícia Marçal, Patrícia Bonavides, Bruno, Hemerson, Paula, Emília, Washington, Carla e Gardênia pela ajuda de todos os dias e pela amizade;

Aos alunos da graduação que participam das atividades do *Laboratório de Oncologia Experimental*: Fernanda, Eveline, Elthon, Felipe, Arinice, Delano e Jersia;

À Silvana pela imensurável ajuda neste trabalho;

Aos técnicos Adriano Santos, Luciana França e Maria de Fátima Teixeira cuja dedicação é essencial para o laboratório;

À amiga *Marne Carvalho Vasconcellos*, pela imensurável colaboração com os estudos de mutagênese;

Aos amigos que fiz na USP-RP: Estela, Denise, Ana Ligia, Fernando, Cris e Tomaz.

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

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: Áurea, Chiquinho, Aroldo, Sr. Bento, Fernando, Mônica e Íris que tentam resolver ou indicar o melhor caminho para os problemas do dia a dia;

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

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

Aos órgãos financiadores dos projetos de pesquisa do *Laboratório de Oncologia Experimental*, CNPq, FINEP, FUNCAP e BNB;

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a realização desse trabalho.

Índice

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. Introdução	29
1.1. Câncer.....	29
1.2. Produtos naturais com atividade anticâncer.....	33
1.3. Componentes da dieta como agentes anticâncer.....	42
1.4. Piplartina.....	50
2. Objetivos	55
2.1. Geral.....	55
2.2. Específicos	55
3. Materiais e Métodos	57
3.1. Materiais utilizados.....	57
3.1.1. Equipamentos.....	57
3.1.2. Reagentes.....	58
3.1.3. Fármacos.....	60
3.2. Soluções.....	60
3.3. Células.....	61
3.3.1. Manutenção das células em cultura.....	63
3.3.2. Obtenção de células PBMC.....	63
3.3.3. Manutenção do tumor sarcoma 180 em camundongos.....	64
3.4. Microorganismos.....	64
3.4.1. Manutenção dos microorganismos.....	66
3.4.1.1. Preparo das culturas de <i>Salmonella typhimurium</i>	66
3.4.1.2. Preparo das culturas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
3.5. Animais.....	67
3.6. Procedimento experimental	67
3.6.1. Obtenção da piplartina.....	67

3.6.2. Obtenção do <i>N</i> -3,4,5-trimetoxidihidrocinaoíl-dihidropiridin-2-ona.....	68
3.6.3. Obtenção do <i>N</i> -3,4,5-trimetoxicinaoíl-1,2-aminoetano.....	68
3.6.4. Obtenção do <i>O</i> -3,4,5-trimetoxicinaoíl-1,2-etanodiol.....	69
3.6.5. Obtenção do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico.....	69
3.6.6. Obtenção do <i>S</i> -3,4,5-trimetoxicinaoíl-benzeno.....	70
3.6.7. Estudo da atividade citotóxica.....	72
3.6.7.1. Ensaio de citotoxicidade em células tumorais.....	72
3.6.7.1.1. Princípio do teste.....	72
3.6.7.1.2. Procedimento experimental.....	72
3.6.7.1.3. Análise dos dados.....	73
3.6.7.2. Ensaio de citotoxicidade em células normais.....	73
3.6.7.2.1. Princípio do teste.....	73
3.6.7.2.2. Procedimento experimental.....	74
3.6.7.2.3. Análise dos dados.....	74
3.6.8. Estudo do mecanismo de ação citotóxico em células HL-60.....	75
3.6.8.1. Determinação da viabilidade celular.....	75
3.6.8.1.1. Princípio do teste.....	75
3.6.8.1.2. Procedimento experimental.....	75
3.6.8.1.3. Análise dos dados.....	76
3.6.8.2. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria..	76
3.6.8.2.1. Princípio do teste.....	76
3.6.8.2.2. Procedimento experimental.....	77
3.6.8.2.3. Análise dos dados.....	77
3.6.8.3. Determinação da ativação da caspase-3.....	78
3.6.8.3.1. Princípio do teste.....	78
3.6.8.3.2. Procedimento experimental.....	78
3.6.8.3.3. Análise dos dados.....	79
3.6.8.4. Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula.....	79
3.6.8.4.1. Princípio do teste.....	79
3.6.8.4.2. Procedimento experimental.....	80
3.6.8.4.3. Análise dos dados.....	80
3.6.8.5. Determinação do índice mitótico.....	80
3.6.8.5.1. Princípio do teste.....	80
3.6.8.5.2. Procedimento experimental.....	81
3.6.8.5.3. Análise dos dados.....	81

3.6.9. Estudo da atividade genotóxica e mutagênica.....	82
3.6.9.1. Ensaio de genotoxicidade <i>in vitro</i> – Danos ao DNA - Ensaio do cometa.....	82
3.6.9.1.1. Princípio do teste.....	82
3.6.9.1.2. Procedimento experimental.....	83
3.6.9.1.3. Análise dos dados.....	84
3.6.9.2. Estudo do mecanismo de ação genotóxico em células V79.....	86
3.6.9.2.1. Determinação da viabilidade celular.....	86
3.6.9.2.1.1. Princípio do teste.....	86
3.6.9.2.1.2. Procedimento experimental.....	86
3.6.9.2.1.3. Análise dos dados.....	86
3.6.9.2.2. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria.....	87
3.6.9.2.2.1. Princípio do teste.....	87
3.6.9.2.2.2. Procedimento experimental.....	87
3.6.9.2.2.3. Análise dos dados.....	87
3.6.9.2.3. Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula.....	88
3.6.9.2.3.1. Princípio do teste.....	88
3.6.9.2.3.2. Procedimento experimental.....	88
3.6.9.2.3.3. Análise dos dados.....	88
3.6.9.3. Teste de Ames – Ensaio de mutação gênica reversa em <i>Salmonella typhimurium</i>.....	89
3.6.9.3.1. Princípio do teste.....	89
3.6.9.3.2. Procedimento experimental.....	89
3.6.9.3.3. Análise dos dados.....	91
3.6.9.4. Ensaio de mutagênese e recombino gênese em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	91
3.6.9.4.1. Princípio do teste.....	91
3.6.9.4.2. Procedimento experimental.....	92
3.6.9.4.3. Análise dos dados.....	94
3.6.9.5. Avaliação da genotoxicidade/mutagenicidade em medula óssea de camundongos – Teste do micronúcleo <i>in vivo</i>.....	94
3.6.9.5.1. Princípio do teste.....	94
3.6.9.5.2. Procedimento experimental.....	95
3.6.9.5.3. Análise dos dados.....	96
3.6.10. Estudo farmacocinético.....	96

3.6.10.1. Desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica.....	96
3.6.10.1.1. Condições cromatográficas e detecção no espectrômetro de massas no modo MS/MS.....	97
3.6.10.1.2. Preparações das soluções-padrão da curva de calibração e do controle de qualidade.....	101
3.6.10.1.3. Procedimento de extração do analito do plasma de ratos.....	104
3.6.10.1.4. Validação do método.....	106
3.6.10.1.4.1. Especificidade.....	106
3.6.10.1.4.1.1. Princípio do teste.....	106
3.6.10.1.4.1.2. Procedimento experimental.....	106
3.6.10.1.4.1.3. Análise dos dados.....	106
3.6.10.1.4.2. Recuperação.....	107
3.6.10.1.4.2.1. Princípio do teste.....	107
3.6.10.1.4.2.2. Procedimento experimental.....	107
3.6.10.1.4.2.3. Análise dos dados.....	107
3.6.10.1.4.3. Determinação do limite de quantificação.....	107
3.6.10.1.4.3.1. Princípio do teste.....	107
3.6.10.1.4.3.2. Procedimento experimental.....	108
3.6.10.1.4.3.3. Análise dos dados.....	108
3.6.10.1.4.4. Linearidade.....	108
3.6.10.1.4.4.1. Princípio do teste.....	108
3.6.10.1.4.4.2. Procedimento experimental.....	109
3.6.10.1.4.4.3. Análise dos dados.....	109
3.6.10.1.4.5. Precisão.....	110
3.6.10.1.4.5.1. Princípio do teste.....	110
3.6.10.1.4.5.2. Procedimento experimental.....	110
3.6.10.1.4.5.3. Análise dos dados.....	111
3.6.10.1.4.6. Exatidão.....	111
3.6.10.1.4.6.1. Princípio do teste.....	111
3.6.10.1.4.6.2. Procedimento experimental.....	111
3.6.10.1.4.6.3. Análise dos dados.....	112
3.6.10.1.4.7. Estabilidade.....	112
3.6.10.1.4.7.1. Princípio do teste.....	112
3.6.10.1.4.7.2. Procedimento experimental.....	112
3.6.10.1.4.7.3. Análise dos dados.....	113
3.6.10.2. Estudo de disposição cinética da piplartina.....	113

3.6.10.2.1. Princípio do teste.....	113
3.6.10.2.2. Procedimento experimental.....	113
3.6.10.2.3. Análise dos dados.....	115
3.6.11. Avaliação da associação do 5-Fluourouracil com a piplartina.....	117
3.6.11.1. Avaliação da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina sobre a proliferação de células tumorais humanas <i>in vitro</i>.....	117
3.6.11.1.1. Princípio do teste.....	117
3.6.11.1.2. Procedimento experimental.....	117
3.6.11.1.3. Análise dos dados.....	117
3.6.11.2. Avaliação da associação do 5-Fluourouracil com a piplartina em camundongos transplantedos com tumor Sarcoma 180.....	118
3.6.11.2.1. Princípio do teste.....	118
3.6.11.2.2. Procedimento experimental.....	119
3.6.11.2.3. Análise dos dados.....	120
3.6.11.3. Parâmetros toxicológicos avaliados.....	120
3.6.11.3.1. Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	120
3.6.11.3.1.1. Princípio do teste.....	120
3.6.11.3.1.2. Procedimento experimental.....	121
3.6.11.3.1.3. Análise dos dados.....	122
3.6.11.3.2. Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	122
3.6.11.3.2.1. Princípio do teste.....	122
3.6.11.3.2.2. Procedimento experimental.....	122
3.6.11.3.2.3. Análise dos dados.....	122
3.6.11.3.3. Análise histopatológica.....	123
3.6.11.3.3.1. Princípio do teste.....	123
3.6.11.3.3.2. Procedimento experimental.....	123
3.6.11.3.3.3. Análise dos dados.....	123
4. Resultados.....	126
4.1. Estudo da atividade citotóxica.....	126
4.1.1. Avaliação da atividade citotóxica da piplartina e seus análogos em células tumorais humana.....	126
4.1.2. Avaliação da atividade citotóxica da piplartina em células normais humana.....	128
4.2. Estudo do mecanismo de ação citotóxico em células HL-60.....	130
4.2.1. Determinação da viabilidade celular.....	130

4.2.2. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria.....	138
4.2.3. Determinação da ativação da caspase-3.....	138
4.2.4. Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula.....	141
4.2.5. Determinação do índice mitótico.....	143
4.3. Estudo da atividade genotóxica e mutagênica.....	146
4.3.1. Avaliação da genotoxicidade <i>in vitro</i> – Danos ao DNA - Ensaio do cometa.....	146
4.3.2. Estudo do mecanismo de ação genotóxico em células V79.....	148
4.3.2.1. Determinação da viabilidade celular.....	148
4.3.2.2. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria.....	152
4.3.2.3. Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula.....	152
4.3.3. Avaliação da mutagenicidade no ensaio de mutação gênica reversa em <i>Salmonella typhimurium</i> – Teste de Ames.....	155
4.3.4. Avaliação da mutagenicidade e recombinação em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	158
4.3.5. Avaliação da genotoxicidade/mutagenicidade em medula óssea de camundongos – Teste do micronúcleo <i>in vivo</i>	162
4.4. Estudo farmacocinético.....	165
4.4.1. Desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica.....	165
4.4.1.1. Especificidade.....	165
4.4.1.2. Recuperação.....	166
4.4.1.3. Determinação do limite de quantificação.....	166
4.4.1.4. Curva de calibração/linearidade.....	169
4.4.1.5. Precisão e exatidão.....	169
4.4.1.6. Estabilidade.....	172
4.4.2. Estudo de disposição cinética da piplartina.....	174
4.5. Avaliação da associação do 5-Fluorouracil com a piplartina.....	178
4.5.1. Avaliação da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina sobre a proliferação de células tumorais humanas <i>in vitro</i>	178
4.5.2. Avaliação do efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre a massa tumoral de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	180
4.5.3. Avaliação dos aspectos toxicológicos.....	183
4.5.3.1. Efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	183

4.5.3.2. Efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	185
4.5.3.3. Efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma.....	187
4.5.3.4. Análise histopatológica dos órgãos de camundongos, saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180, tratados com o 5-fluorouracil associado com a piplartina.....	189
4.6. Resumo dos resultados obtidos com a piplartina.....	193
5. Discussão.....	196
6. Conclusão.....	224
7. Referencias Bibliográficas.....	226
8. Anexos.....	255

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura química da vimblastina (1), vincristina (2), vindesina (3) e vinorelbina (4).....	36
Figura 2	Estrutura química do paclitaxel (5) e docetaxel (6).....	37
Figura 3	Estrutura química da podofilotoxina (7), etoposídeo (8) e tenoposídeo (9).....	39
Figura 4	Estrutura química da camptotecina (10), topotecano (11) e irinotecano (12).....	40
Figura 5	Alguns componentes da dieta com propriedades anticâncer.....	44
Figura 6	Estrutura química de alguns componentes da dieta com propriedades anticâncer.....	45
Figura 7	Estrutura química de alguns componentes da dieta com propriedades anticâncer (continuação).....	46
Figura 8	Estrutura química da piplartina.....	51
Figura 9	Estrutura química dos análogos da piplartina.....	71
Figura 10	Representação dos tipos de cometas corados com prata e visualizados em microscópio óptico.....	85
Figura 11	Espectrometria de massas da piplartina no modo MS/MS operando em íon positivo.....	99
Figura 12	Espectrometria de massas da carbamazepina no modo MS/MS operando em íon positivo.....	100
Figura 13	Procedimento de preparação das amostras de plasma de ratos empregando a extração líquido-líquido.....	105
Figura 14	Efeito da piplartina sobre a proliferação de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.....	132

Figura 15	Efeito da piplartina sobre a integridade da membrana citoplasmática de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.....	133
Figura 16	Efeito da piplartina sobre a morfologia de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando o FSC e SSC como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 3 horas de incubação.....	134
Figura 17	Efeito da piplartina sobre a morfologia de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando o FSC e SSC como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 6 horas de incubação.....	135
Figura 18	Efeito da piplartina sobre a morfologia de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando o FSC e SSC como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 12 horas de incubação.....	136
Figura 19	Efeito da piplartina sobre a morfologia de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando o FSC e SSC como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 24 horas de incubação.....	137
Figura 20	Efeito da piplartina sobre o potencial transmembrânico de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123 após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.....	139
Figura 21	Efeito da piplartina sobre a ativação da caspase-3 em células leucêmicas HL-60 após 24 horas de incubação.....	140
Figura 22	Avaliação do efeito da piplartina sobre o índice mitótico de células leucêmicas HL-60 determinado por coloração diferencial com hematoxilina/eosina em células leucêmicas HL-60 após 3 horas de incubação.....	144
Figura 23	Análise do índice mitótico demonstrando uma parada do ciclo celular em G ₂ associada com o tratamento com a piplartina.....	145
Figura 24	Efeito da piplartina sobre a proliferação de células V79 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo após 3 horas de incubação.....	149

Figura 25	Efeito da piplartina sobre a integridade da membrana citoplasmática de células V79 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo após 3 horas de incubação.....	150
Figura 26	Efeito da piplartina sobre a morfologia de células V79 determinado por citometria de fluxo usando o FSC e SSC como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 3 horas de incubação.....	151
Figura 27	Efeito da piplartina sobre o potencial transmembrânico de células V79 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123 após 3 horas de incubação.....	153
Figura 28	Perfil cromatográfico mostrando a especificidade referente ao método analítico para quantificação da piplartina em plasma de ratos por HPLC com detecção por espectrometria de massas.....	167
Figura 29	Curva analítica mostrando a linearidade referente ao método analítico para quantificação da piplartina em plasma de ratos por HPLC com detecção por espectrometria de massas.....	170
Figura 30	Curva de decaimento plasmático da piplartina após a administração de uma única dose de 50 mg/kg em ratos.....	176
Figura 31	Efeito da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina sobre a massa tumoral de animais transplantados com o tumor Sarcoma 180.	181
Figura 32	Histopatologia dos tumores de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	182
Figura 33	Histopatologia dos fígados de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	190
Figura 34	Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	191
Figura 35	Histopatologia dos baços de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	192
Figura 36	Mecanismo de ação proposto para a atividade citotóxica/genotóxica da piplartina.....	214

Lista de Tabelas

Tabela 1	Alvo molecular de componentes da dieta com propriedades anticâncer.....	48
Tabela 2	Alvo molecular de componentes da dieta com propriedades anticâncer (continuação).....	49
Tabela 3	Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e antitumoral.....	62
Tabela 4	Linhagens de microorganismos utilizadas nos ensaios de mutagenicidade e recombinação.....	65
Tabela 5	Preparo das amostras para a curva de calibração da piplartina.....	102
Tabela 6	Preparo das amostras para controle de qualidade da piplartina.....	103
Tabela 7	Parâmetros farmacocinéticos avaliados.....	116
Tabela 8	Atividade citotóxica da piplartina e seus análogos em linhagens de células tumorais humanas.....	127
Tabela 9	Atividade citotóxica da piplartina em células humanas normais.....	129
Tabela 10	Efeito da piplartina sobre distribuição do ciclo celular de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.....	142
Tabela 11	Atividade genotóxica da piplartina em células V79 avaliada pelo teste do cometa após 3 horas de incubação.....	147
Tabela 12	Efeito da piplartina sobre distribuição do ciclo celular em células V79 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo após 3 horas de incubação.....	154
Tabela 13	Avaliação da atividade mutagênica por deslocamento do quadro de leitura ou <i>frameshift</i> (<i>his+</i>) nas linhagens TA98 e TA97a de <i>Salmonella typhimurium</i> após tratamento com piplartina sem ou com ativação metabólica.....	156

Tabela 14	Avaliação da atividade mutagênica por substituição de pares de bases (<i>his+</i>) nas linhagens TA100 e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> após tratamento com piplartina sem ou com ativação metabólica.....	157
Tabela 15	Indução de mutação reversa e para frente ou <i>forward</i> (<i>can1</i>) na linhagem haplóide N123 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após tratamento com piplartina em fase exponencial de crescimento.....	159
Tabela 16	Indução de mutação pontual (<i>his-7</i> e <i>lys1-1</i>) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou <i>frameshift</i> (<i>hom3-10</i>) na linhagem haplóide XV185-14c de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após tratamento com piplartina em fase exponencial de crescimento.....	160
Tabela 17	Indução de recombinações mitóticas intergênica ou <i>crossing-over</i> (<i>+/cyh2</i>) e intragênica ou conversão gênica (<i>leu1-1/leu1-12</i>) na linhagem diplóide XS2316 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após tratamento com piplartina em fase exponencial de crescimento.....	161
Tabela 18	Freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados em medula óssea em camundongos após tratamento com piplartina.....	163
Tabela 19	Proporção de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos de medula óssea em camundongos após tratamento com piplartina...	164
Tabela 20	Recuperação média do procedimento de purificação das amostras de plasma de ratos para a piplartina e o padrão interno (carbamazepina), empregando extração líquido-líquido.....	168
Tabela 21	Precisão e exatidão intra-ensaio e inter-ensaio referentes ao método analítico para quantificação da piplartina em plasma de ratos por HPLC com detecção por espectrometria de massas.....	171
Tabela 22	Estabilidade da piplartina em amostra de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas a temperatura de – 20 °C e submetidas a três ciclos de congelamentos e descongelamentos ou após permanência á temperatura ambiente por 4 horas.....	173
Tabela 23	Concentrações plasmáticas da piplartina após a administração de uma única dose de 50 mg/kg em ratos.....	175
Tabela 24	Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da curva de disposição cinética da piplartina, após a administração de uma única dose de 50 mg/kg em ratos.....	177

Tabela 25	Efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre a proliferação de células tumorais humanas.....	179
Tabela 26	Efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	184
Tabela 27	Efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	186
Tabela 28	Efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180.....	188
Tabela 29	Resumo dos resultados encontrados para o estudo da atividade citotóxica da piplartina.....	194
Tabela 30	Estrutura química de compostos relacionados à piplartina.....	199
Tabela 31	Estrutura química de compostos relacionados à piplartina (continuação).....	200

Lista de símbolos e abreviaturas

μL	Microlitro
μM	Micromolar
[]	Concentração
<	Menor que
>	Maior que
5-FU	5-Fluorouracil
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ANOVA	<i>Analisis of Variance</i> (Análise de variância)
$\text{AUC}_{0-24\text{h}}$	Área sob a curva de concentração de 0 a 24(h)
$\text{AUC}_{0-\infty}$	Área sob a curva de concentração de 0 ao infinito
CCD	Cromatografia em camada delgada
Cl	Clearance total
Cl_{50}	Concentração inibitória média
C_{max}	Pico de concentração máxima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
EPC	Eritrócitos policromáticos
EPCM	Eritrócitos policromáticos micronúcleados
ENC	Eritrócitos normocromáticos
G	Força da gravidade
g	Gramma
HIS	Histidina
his-	Auxotrofia para o aminoácido histidina

his+	Prototrofia para o aminoácido histidina
HOM	Homoserina
h	Hora
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HTS	High –throughput screening
IC	Intervalo de confiança
IM	Índice de mutagenicidade
L	Litro
LIS	Lisina
K_{el}	Constante de eliminação
M	Molar
mg	Miligrama
ng	Nanograma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRM	Monitorar múltiplas reações
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
m/z	Relação massa/carga
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
-S9	Sem Ativação Metabólica
+S9	Com Ativação Metabólica
SC	Meio sintético completo
SC-his	Meio sintético sem histidina
SC-lys	Meio sintético sem lisina
SC-hom	Meio sintético sem homoserina

TBS	Tris buffer solution (Tampão tris)
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida de eliminação do fármaco
T_{max}	Tempo do pico de concentração máxima
US-NCI	<i>United States National Cancer Institute</i> (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
UI	Unidades internacionais
Vd	Volume de distribuição
YEPD	Meio completo para leveduras

Resumo

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER DA PIPLARTINA. Daniel Pereira Bezerra. Orientadora: Letícia Veras Costa-Lotufo. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2008.

A pipartina é um alcalóide/amida conhecido encontrado em espécies do gênero *Piper* com propriedade citotóxica interessante. Para avaliar o seu potencial antineoplásico, um estudo farmacológico de suas propriedades anticâncer foi realizado em vários modelos biológicos. A pipartina apresentou potente atividade citotóxica em todas as linhagens tumorais testadas. Por comparação da citotoxicidade de moléculas com estruturas relacionadas com a pipartina, foi identificado que a presença da carbonila α,β -insaturada do anel amídico é essencial para a sua atividade citotóxica. Em células mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis expostas a pipartina, foi observada apenas fraca atividade citotóxica. Adicionalmente, a pipartina induziu apoptose em células leucêmicas HL-60, com participação da via intrínseca, de maneira dependente da concentração, como observado pelo padrão de morfologia celular, integridade da membrana citoplasmática, alteração no potencial transmembrânico da mitocôndria e aumento da fragmentação do DNA. Na análise do ciclo celular, foi observado bloqueio na fase G₂. A pipartina foi capaz de induzir dano ao DNA em células V79, como observado pelo ensaio do cometa alcalino e neutro. Seu mecanismo de ação genotóxico parece ser semelhante ao da sua atividade citotóxica. Não foi observada atividade mutagênica, com ou sem ativação metabólica (S9), nas linhagens de *Salmonella* (modelo procariótico) testadas. Por outro lado, a pipartina foi mutagênica e recombinogênica em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (modelo eucariótico). Isto pode ser explicado pela diferença fisiológica entre a enzima topoisomerase II de eucarióticos e procarióticos, refletindo uma possível interferência da pipartina sobre a atividade desta enzima. No ensaio do micronúcleo *in vivo*, a pipartina induziu aumento da frequência de micronúcleo na maior dose testada (100 mg/kg). Entretanto, não alterou a proporção de eritrócitos policromáticos/normocromáticos. Em estudo farmacocinético, um método bioanalítico por LC-MS/MS foi desenvolvido e validado para a quantificação da pipartina em plasma de ratos. O método apresentou-se linear, sensível, preciso e exato. No estudo de disposição cinética, a pipartina apresentou um perfil de absorção típico de um modelo monocompartimentado. Adicionalmente, os níveis plasmáticos são compatíveis com o valor obtido na citotoxicidade *in vitro* o que nos leva a propor que a atividade anticâncer da pipartina deve-se às suas propriedades citotóxicas diretas. No ensaio de atividade antitumoral, a combinação da pipartina com o 5-fluorouracil levou a um aumento da inibição do crescimento *in vitro* e *in vivo*. Além disso, análises hematológicas mostraram leucopenia após tratamento dos animais com o 5-fluorouracil, o qual foi revertido pela combinação com a pipartina. Esses dados sugerem que a pipartina apresenta um potencial anticâncer promissor.

Palavras chave: Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais, Alcalóides, Amidas, Testes de Mutagenicidade, Antineoplásicos.

Abstract

STUDY OF ANTICANCER PROPERTIES OF PIPLARTINE. Daniel Pereira Bezerra. Advisor: Letícia Veras Costa-Lotufo. Doctorate Thesis. Postgraduate Program on Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, UFC, 2008.

Piplartine is a known alkaloid/amide from *Piper species* with interesting cytotoxic properties. In order to understand the antineoplastic potential of piplartine, a pharmacological study was performed in several biological models. Piplartine displayed potent cytotoxicity against all cancer cell lines. By comparing the cytotoxicity of selected molecules that differ in structural elements, it was identified that the presence of the α,β -unsaturated carbonyl moiety of the amide ring is an important structural requirement for cytotoxic activity. In healthy peripheral blood mononuclear cells exposed to piplartine, it was observed only weak cytotoxic activity. Moreover, piplartine treatment induced apoptosis in HL-60 cells, by the intrinsic pathway, in a dose-dependent manner, as observed by morphology and cytoplasmic membrane integrate changes, alteration in mitochondrial membrane potential and an increase in internucleosomal DNA fragmentation. In the cell cycle analysis, piplartine induced G₂ cell cycle arrest. Piplartine treatment induced DNA strand breaks in V79 cells, as detected by neutral and alkaline comet assay. Its genotoxic mechanism of action seems to be similar to its cytotoxic activity. No mutagenic effect, with or without metabolic activation (S9 mix), in *Salmonella* strains (prokaryotic model) was observed under experimental conditions. On the other hand, piplartine was mutagenic and recombinogenic in *Saccharomyces cerevisiae* assays (eukaryotic model). This can be explained due to the differences in physiological between eukaryote and prokaryote DNA topoisomerase II, reflecting a possible interference of piplartine upon this enzyme activity. *In vivo* micronucleus test, piplartine increased in the levels of micronuclei in the highest dose tested (100 mg/kg). Nevertheless, no bone marrow cytotoxicity was found after piplartine-treated animals as observed by the polychromatic/normochromatic erythrocyte ratio. In pharmacokinetic study, a LC-MS/MS bioanalytical method for the determination of piplartine in rat plasma was established. The method developed shows great linearity and low quantification limit; precision and accuracy were within the acceptable ranges for bioanalytical purposes. In the concentration-time profiles, piplartine showed absorption kinetic of a monocompartmental model. Additionally, the plasma levels are compatible with the *in vitro* cytotoxicity which leads us to propose that the anticancer activity of piplartine is due to its direct cytotoxic properties. In antitumor assay, the combination of piplartine with 5-fluourouracil led to an *in vitro* and *in vivo* increasing of the tumor growth inhibition. In addition, hematological analysis showed leukopenia after 5-fluourouracil treatment, which was reversed by the combined use of piplartine. These data suggest that piplartine has promising anticancer potential.

Key words: Antitumor Drug Screening Assays, Alkaloids, Amides, Mutagenicity tests, Antineoplasics.

Introdução

1. Introdução

1.1. Câncer

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Na verdade, a palavra câncer é o termo comum para todos os tumores malignos. Apesar da origem desta palavra ser relativamente incerta, provavelmente deriva do termo câncer, que em latim, significa caranguejo. Presumivelmente, a origem da palavra câncer para a doença deve a ramificação, que se assemelha a morfologia do carangueijo (KUMMAR *et al.*, 2004).

As células do câncer possuem defeitos nos mecanismos que governam a proliferação normal. Entre as características do tumor maligno estão a auto suficiência da sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade a inibidores do crescimento, inibição da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese, poder de invasão e capacidade de metastatizar-se (HANAHAN & WEINGER, 2000). O câncer é caracterizado por um desvio nos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e a diferenciação das células. Essas células proliferam excessivamente e formam tumores locais que podem comprimir ou invadir estruturas adjacentes normais (KATZUNG, 2003). As células que sofrem transformação neoplásicas geralmente expressam antígenos de superfície celular que parecem ser do tipo fetal normal (WERNERT *et al.*, 1991; APTSIAURI *et al.*, 2007). Além disso, apresentam outros sinais de indiferenciação aparente e podem exibir anormalidades cromossômicas estruturais e numéricas, incluindo diversas translocações e o aparecimento de seqüências gênicas amplificadas (RABBITTS *et al.*, 2001; RABBITTS, 2001).

Existe uma pequena subpopulação de células no interior do tumor, que podem ser descritas como células-tronco tumorais. Essas células retêm a capacidade de sofrer ciclos repetidos de proliferação, podendo migrar para locais distantes no corpo, a fim de colonizar vários órgãos através do processo denominado metástase. Essa progressão neoplásica é acompanhada de anormalidades quantitativas em diversas vias metabólicas e componentes celulares (CROKER & ALLAN, 2008).

O processo de carcinogênese, ou seja, de formação do câncer, em geral dá-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor: estágio de iniciação, estágio de promoção e estágio de progressão (SPANDIDOS, 1985; CHABNER & LONGO, 1996; SPENCE & JONHSTON, 2001; KUMMAR *et al.*, 2004; SPANDIDOS, 2007).

O estágio de iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese. Nele as células sofrem o efeito de um agente carcinogênico (agente oncoiniciador) que provoca modificações em alguns de seus genes. Nesta fase as células encontram-se geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente. Exemplos de substâncias químicas carcinógenas: sulfato de dimetila, metilnitrossuréia, cloreto de vinila, aflatoxinas, dimetilnitrosamina e benzopireno (CHABNER & LONGO, 1996; SPENCE & JONHSTON, 2001; KUMMAR *et al.*, 2004; JUNG *et al.*, 2006).

No estágio de promoção, as células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo nesse estágio (SPENCE & JONHSTON, 2001; KUMMAR *et al.*, 2004).

O estágio de progressão é o terceiro e último estágio e caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados de carcinógenos. O fumo, por exemplo, é um agente carcinógeno completo, pois possui componentes que atuam nos três estágios da carcinogênese (SPENCE & JONHSTON, 2001; KUMMAR *et al.*, 2004; JUNG *et al.*, 2006; SPANDIDOS, 2007).

O câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que o originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Isso é o que pode se chamar de classificação primária (KATZUNG, 2003; KUMMAR *et al.*, 2004).

Os processos invasivos e metastáticos, bem como a série de anormalidades metabólicas decorrentes do câncer, provocam doença e morte eventual do paciente, a não ser que a neoplasia possa ser erradicada com o tratamento (KATZUNG, 2003; INCA, 2007).

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (KATZUNG, 2003). Mais recentemente tem-se usado a terapia de fotorradiação (KUSUZAKI *et al.*, 2007) e a imunoterapia (HERR & MORALES, 2008), sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais que um tipo de tratamento.

A técnica cirúrgica leva à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase; no caso da leucemia, por exemplo, costuma ser necessário o uso de outros tipos de terapia, como o transplante de medula. A radioterapia é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo uma abordagem antineoplásica muito usada; entretanto, mesmo que sejam usados os sensitizadores (que diminuem os efeitos colaterais) o tratamento por radiação é sujeito a severas limitações (KATZUNG, 2003; KUMMAR *et al.*, 2004; RUSTHOVEN *et al.*, 2008; SOREIDE *et al.*, 2008).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. Porém, o corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável. Um fator importante para o êxito da quimioterapia é a precocidade no diagnóstico do tumor (KATZUNG, 2003; KUMMAR *et al.*, 2004).

Há mais de três décadas, estão sendo envidados esforços no sentido de desenvolver fármacos para tratamento do câncer por triagem empírica e planejamento racional de novos compostos. Recentemente, foram desenvolvidas várias classes de fármacos que incluem agentes indutores da diferenciação (DRUMEA *et al.*, 2008). Estes agentes destinam-se a forçar as células neoplásicas, depois de um bloqueio de maturação, a formar células de estágios finais, com pouca ou nenhuma potencialidade proliferativa. Agentes antimetastáticos (PÉREZ & DANISHEFSKY, 2007), destinados a comprometer as propriedades de superfície das células malignas alterando, assim, seu potencial invasivo e metastático. Agentes antiangiogênicos (KHOSRAVI-SHAHI & FERNÁNDEZ-PINEDA, 2008) destinados a inibir a formação da vasculatura do tumor, agentes hipóxidos específicos (KATZUNG, 2003) para células-troco tumorais, destinados a explorar a maior capacidade das reações redutoras nessas células terapeuticamente resistentes, devido à deficiência de oxigênio no interior dos tumores sólidos, fármacos radiosensibilizantes tumorais e radioprotetores (BRIZEL, 2007) dos tecidos normais, cujo objetivo é aumentar a eficácia terapêutica da radioterapia e modificadores da resposta biológica (FRAZER *et al.*, 2007), que alteram as reações metabólicas e imunológicas entre o tumor e o hospedeiro.

Apesar de todo o avanço no tratamento do câncer, a resistência a fármacos constitui um dos maiores problemas na quimioterapia do câncer. Verifica-se o desenvolvimento de resistência adquirida em vários tipos de tumores sensíveis a fármacos. Experimentalmente, a resistência a fármacos pode ser altamente específica para um único fármaco e, em geral, baseia-se numa alteração do aparelho genético das células tumorais, com amplificação ou aumento da expressão de um ou mais genes específicos (DEVITA *et al.*, 1996; KATZUNG, 2003; KUMMAR *et al.*, 2004).

Em pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade são: de pulmão (1,3 milhão); de estômago (cerca de 1 milhão); de fígado (662 mil); de cólon (655 mil); e de mama (502 mil). Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2006).

Estima-se que, em 2020, o número de casos anuais novos seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão nos países em desenvolvimento. É também conhecido que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderiam ser prevenidos (INCA, 2007).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Deste total, são esperados 231.860 casos novos, para o sexo masculino, e 234.870 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma será o maior incidência na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, de mama feminina, de pulmão, de cólon e reto, de estômago e de colo do útero. Os tumores mais incidentes para o sexo masculino serão devidos ao câncer de pele não melanoma (56 mil casos novos), de próstata (49 mil), de pulmão (18 mil), de estômago (14 mil) e de cólon e reto (12 mil). Para o sexo feminino, destacam-se os tumores de pele não melanoma (59 mil casos novos), de mama (49 mil), de colo do útero (19 mil), de cólon e reto (14 mil) e de pulmão (9 mil). A distribuição dos casos novos de câncer segundo sua localização primária é bem heterogênea entre Estados e Capitais do País. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2007).

Diante de tal cenário, fica claro a necessidade de pesquisar novos grupos de fármacos para o controle e o tratamento do câncer. A prevenção de novos casos, o aumento da sobrevida e melhora na qualidade de vida das pessoas com câncer são uns dos novos desafios da pesquisa atualmente.

1.2. Produtos naturais com atividade anticâncer

Há centenas de anos a medicina e os produtos naturais já estavam intimamente ligados pelo uso de medicamentos tradicionais e venenos naturais. Os primeiros registros, escritos em cuneiforme sob placas de argila, eram da Mesopotâmia e datavam cerca de 2.600 a.C.. Dentre as substâncias listadas encontravam-se óleos de plantas de cedro (*Cedrus sp.*, Pináceas), cipreste

(*Cupressus sempervirens* L., Cupressaceae), alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L., Fabaceae) e papoula (*Papaver somniferum* L., Papaveraceae), todos eles ainda utilizados hoje para o tratamento de indisposições como tosses e resfriados e doenças como infecções parasitárias e inflamações (SCHWARTSMANN *et al.*, 2002; NEWMAN *et al.*, 2003; NEWMAN & CRAGG, 2007).

Os estudos químicos, farmacológicos e clínicos desses medicamentos tradicionais, os quais derivam predominantemente de plantas, foram à base de alguns medicamentos de uso atual, tais como a aspirina e a morfina (NEWMAN *et al.*, 2000; SCHWARTSMANN *et al.*, 2002; NEWMAN *et al.*, 2003; BUTLER, 2004; CRAGG *et al.*, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2007).

Dentre os produtos naturais encontramos os chamados metabólitos secundários. Estes são produtos de vias condicionais que são ativadas em contextos ou situações particulares. Eles podem ser divididos em diversas classes estruturais: terpenos, lignanas, taninos, esteróides, chalconas, flavonas, flavanonas, alcalóides e quinonas, dentre outros (CLARDY & WALSH, 2004).

Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, tais como os fármacos anticâncer utilizados atualmente: a vimblastina (Velban[®]) e a vincristina (Oncovin[®]) e os análogos vindesina (Eldisine[®]) e vinorelbina (Navelbine[®]); o paclitaxel (Taxol[®]) e o análogo docetaxel (Taxotere[®]); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos[®]) e tenoposídeo (Vumon[®]); e a camptotecina e os análogos, topotecano (Hycamtin[®]) e irinotecano (Camptosar[®]). Esses medicamentos movimentam cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (CRAGG & NEWMAN, 2000; CRAGG & NEWMAN, 2005; PINTO *et al.*, 2002).

A vimblastina (1) e a vincristina (2) são alcalóides naturais encontrados nas partes aéreas da planta *Catharanthus roseus* var. *albus* G. Don. ou *Vinca rósea* L., (Apocynaceae) daí serem chamados de alcalóides da vinca (figura 1). Já a vindesina (3) e vinorelbina (4) são derivados semi-sintético (GUERITTE-FAHY, 2005; CRAGG & NEWMAN, 2005; NEWMAN & CRAGG, 2007).

O alvo dos alcalóides da vinca é o aparelho mitótico, em particular, os microtúbulos. O mecanismo de ação envolve o bloqueio da polimerização dos microtúbulos, que constituem uma parte importante do citoesqueleto e do fuso

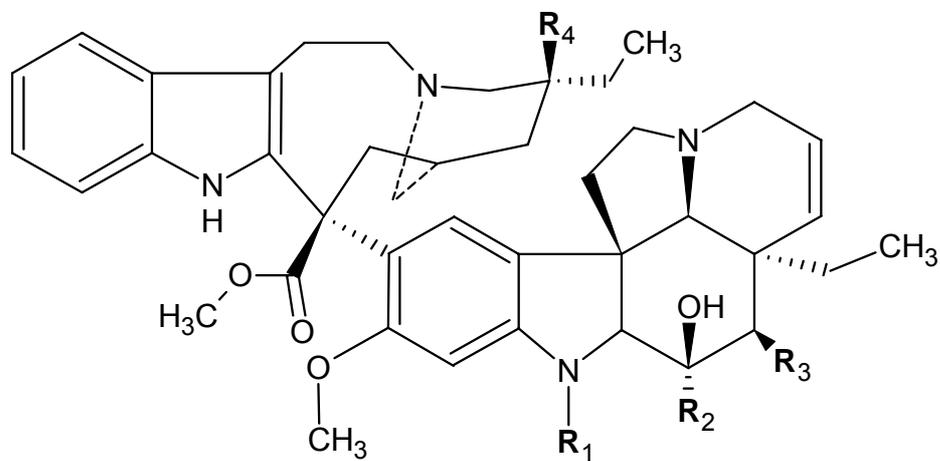
mitótico. O fármaco liga-se especificamente à proteína microtubular, a tubulina, na forma dimérica. O complexo fármaco-tubulina liga-se a extremidade em formação dos microtubulos, interrompendo a sua organização, com consequente despolimerização destes microtubulos. O processo determina a parada da mitose na fase da metáfase, com dissolução do fuso mitótico e interferência na segregação dos cromossomos (KATZUNG, 2003).

Esses fármacos são usados geralmente em associação com outros agentes quimioterápicos para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo leucemias, linfomas, câncer testicular, carcinoma de mama, câncer de pulmão e sarcoma de Kaposi. Entre os efeitos tóxicos estão náuseas, vômito, depressão da medula óssea, bem como alopecia (PLASSCHAERT *et al.*, 2004; CONNORS, 2005; CRAGG & NEWMAN, 2005).

O paclitaxel (**5**) (figura 2) é um diterpeno encontrado nas cascas da planta *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae). O seu análogo, docetaxel (**6**) (figura 2), foi obtido através do estudo da relação estrutura-atividade (KINGSTON, 2005; CRAGG & NEWMAN, 2005).

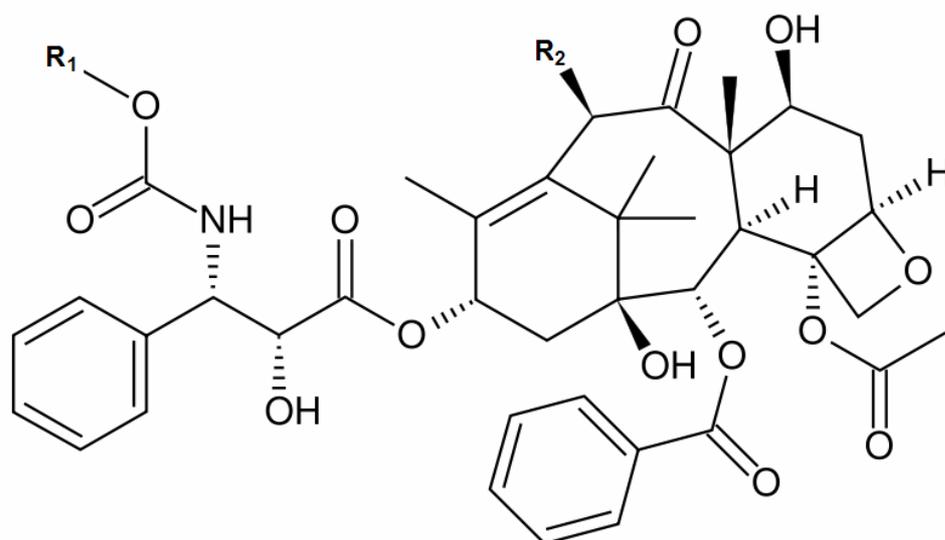
Um dos fatores que desde cedo despertou a atenção no estudo dos taxanos foi o seu mecanismo de ação ser diferente do que, até então, era conhecido. As estruturas intracelulares afetadas pelos taxanos também são os microtúbulos. Entretanto, contrariamente a outros fármacos antimitóticos conhecidos, como, os alcalóides da vinca ou a colchicina que induzem a disjunção dos microtúbulos, os taxanos promove a polimerização da tubulina em microtúbulos das células (KINGSTON, 1991; KATZUNG, 2003). Os microtúbulos formados por indução dos taxanos são extremamente estáveis e disfuncionais. Havendo assim um deslocamento no equilíbrio dinâmico entre a formação dos microtúbulos e a sua dissociação em tubulina, o que compromete a mitose, bloqueando a divisão celular e comprometendo funções celulares vitais, o que provoca a morte da célula.

Os taxanos possuem atividade significativa no câncer ovariano e no câncer de mama avançado. Os efeitos colaterais que limitam a dose do paclitaxel (**5**) incluem neutropenia, trombocitopenia e neuropatia periférica. O principal efeito tóxico do docetaxel (**6**) é a depressão da medula óssea (HAJEK *et al.*, 1996; KATZUNG, 2003).



	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 – Estrutura química da vimblastina (1), vincristina (2), vindesina (3) e vinorelbina (4).



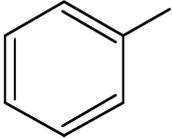
	R ₁	R ₂
Paclitaxel (5)		OCOCH ₃
Docetaxel (6)	OC(CH ₃) ₂	OH

Figura 2 – Estrutura química do paclitaxel (5) e docetaxel (6).

A podofilotoxina (7) é conhecida há muitos anos como o agente citotóxico encontrado na raiz da planta *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae). Os análogos semi-sintéticos da podofilotoxina (7) (figura 3), etoposídeo (8) e tenoposídeo (9), também foram obtidos através do estudo da relação estrutura-atividade (LEE & XIAO, 2005; CRAGG & NEWMAN, 2005). O etoposídeo (8) e tenoposídeo (9) são muito semelhantes na sua estrutura química, na sua ação clínica e no bloqueio das células nas fases finais do ciclo celular, S e G₂. O mecanismo de ação envolve a inibição da enzima nuclear topoisomerase II, que resulta em lesão do DNA através da quebra dos filamentos induzidas pela formação de um complexo terciário do fármaco, do DNA e da enzima (KATZUNG, 2003; LEE & XIAO, 2005).

O etoposídeo (8) tem sido usado clinicamente para o tratamento de leucemias monocíticas, câncer testicular e no carcinoma de células pequenas do pulmão, enquanto o tenoposídeo (9) possui atividade contra vários linfomas. Além de causar náusea, vômito e alopecia, ocorre toxicidade significativa do sistema hematopoético e do sistema linfóide (KATZUNG, 2003; CRAGG & NEWMAN, 2005).

A camptotecina (10) é um alcalóide natural encontrado na planta chinesa *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae). Este serviu como protótipo para a síntese do topotecano (11) e irinotecano (12) (figura 4). Estes atuam interferindo na atividade da enzima topoisomerase I, sendo responsável pela quebra e ligação de filamentos simples de DNA, resultando em lesão do DNA e morte celular por apoptose (KATZUNG, 2003; RAHIER *et al.*, 2005).

O topotecano (11) é usado para o tratamento de câncer de ovário e de câncer de pequenas células de pulmão. Já o irinotecano (12), um pró-fármaco, é usado para o tratamento de câncer colorretal. A ocorrência de mielossupressão constitui frequentemente o efeito adverso que limita a dose desses fármacos (RAHIER *et al.*, 2005; KATZUNG, 2003; CRAGG & NEWMAN, 2005).

Um problema desta quimioterapia é, de um modo geral, de todas até hoje conhecidas, é a possibilidade das células cancerosas se tornarem resistentes, via um mecanismo conhecido como resistência a múltiplas substâncias (*multi-drug resistance* ou MDR), aspecto bioquímico complexo e ainda em estudo (SILVA *et al.*, 2003b).

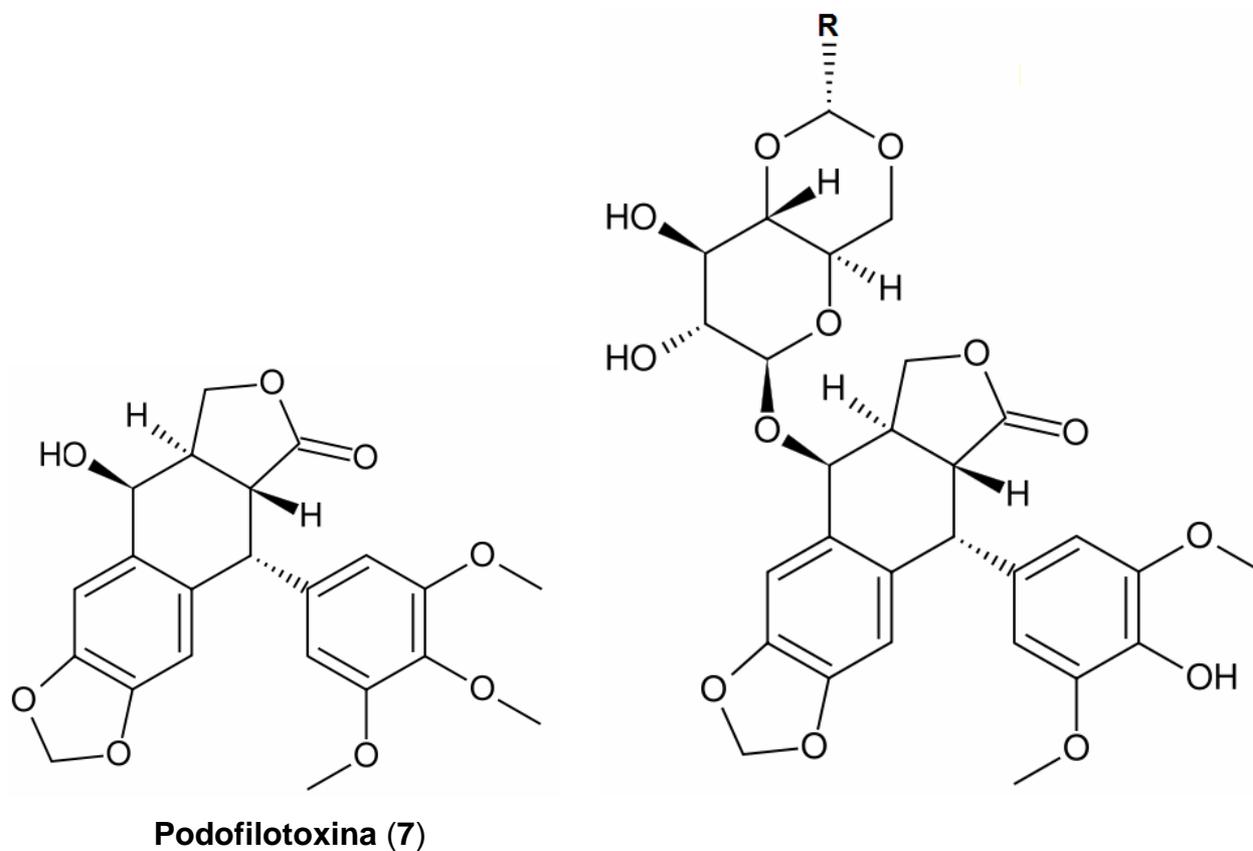
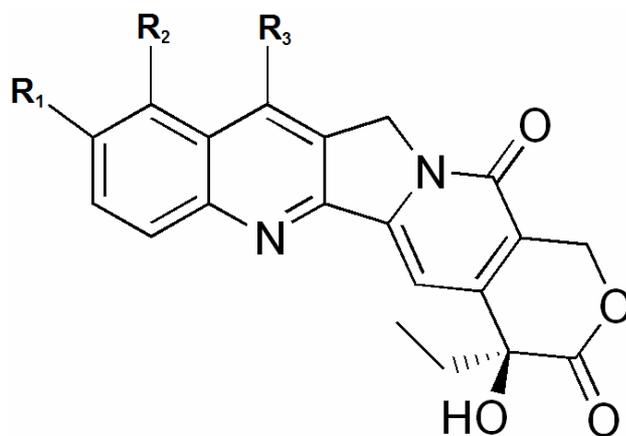


Figura 3 – Estrutura química da podofilotoxina (7), etoposídeo (8) e tenoposídeo (9).



	R ₁	R ₂	R ₃
Camptotecina (10)	H	H	H
Topotecano (11)	OH		H
Irinotecano (12)		H	CH ₂ CH ₃

Figura 4 - Estrutura química da camptotecina (10), topotecano (11) e irinotecano (12).

Diante do sucesso destes medicamentos de origem vegetal, é possível entender a corrida entre algumas indústrias multinacionais pela busca de novas substâncias bioativas. Esta busca foi intensificada nos anos 90, especialmente nas florestas tropicais onde se concentra grande parte da biodiversidade. Além disso, inúmeros análogos foram sintetizados em laboratórios por diferentes grupos de pesquisa, com o objetivo de se identificar os grupos farmacofóricos, estabelecendo, assim, a relação estrutura-atividade na tentativa de se obter fármacos mais potentes (KINGSTON, 2000). A partir deste momento, grandes mudanças ocorreram nos centros de pesquisas, incluindo a identificação de novos alvos moleculares exploráveis, estabelecimento de programas de triagem de produtos naturais em larga escala (HTS – *High Throughput Screening*), avanços no projeto racional de fármacos e química combinatória (YUNES *et al.*, 2001; MANN, 2002; ROTHENBERG *et al.*, 2003; BUTLER, 2004; GANESAN, 2004; WESTWELL & STEVENS, 2004; CRAGG & NEWMAN, 2005; CRAGG *et al.*, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2007).

Não foram somente as plantas que serviram de fontes para o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer. Os microrganismos, que sempre foram a principal fonte de agentes antibacterianos, também proporcionam alguns fármacos-chaves para a quimioterapia do câncer. Alguns exemplos notáveis são a bleomicina (Blenoxane[®]), dactinomicina (Cosmegen[®]), plicamicina (Mithracin[®]), mitomicina C (Mutamycin[®]) e as antraciclínicas, daunorrubicina (Daunoblastina[®]) e doxorrubicina (Adriamycin[®]). Em geral, o mecanismo de ação desses antibióticos dá-se pela ligação destes ao DNA através de sua intercalação entre bases específicas, bloqueando a síntese de RNA ou DNA (ou ambos), provocando ruptura dos filamentos de DNA e interferindo na replicação celular (KATZUNG, 2003).

A medicina moderna também tem encontrado no oceano uma vasta fonte de compostos com importante potencial terapêutico. Alguns exemplos de produtos naturais marinhos são: discodermolida, eleuterobina, sarcodictina e laulimalida, que também apresentam potente atividade anticâncer e mecanismo de ação similar ao do paclitaxel (5) (COLWELL, 2002; MANN, 2002; SOUSA, 2004; GANESAN, 2004).

Contudo, apesar de a natureza abrigar uma encantada e fascinante biodiversidade de vida microbiana, vegetal e animal, o reino vegetal é o que tem

contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PHILLIPSON & ANDERSON, 1998; CRAGG & NEWMAN, 2005; CRAGG *et al.*, 2006; AGGARWAL & SHISHODIA, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2007). Entretanto, o conhecimento fitoquímico e farmacológico de grande parte das plantas do planeta permanecem desconhecidos. A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como de seus mecanismos de ação, são um dos maiores desafios para a química e a farmacologia atualmente (GEBHARDT, 2000; CRAGG & NEWMAN, 2005; CRAGG *et al.*, 2006; SUBRAMANIAN *et al.*, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2007).

1.3. Componentes da dieta como agentes anticâncer

O princípio "Deixe o alimento ser teu remédio e o remédio ser teu alimento", exposto por Hipócrates aproximadamente 2.500 anos atrás, está recebendo um interesse renovado. Nos últimos anos, o interesse de pesquisadores por alimentos específicos ou componentes alimentares biologicamente ativos, os supostos alimentos funcionais ou os nutracêuticos, do inglês "Foods for Specified Health Use" (FOSHU) (HASLER, 1998).

Nos estudos epidemiológicos, *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos que envolvem câncer e dieta em diversas populações, um dos temas mais discutidos é a existência de uma diferença na incidência das várias formas de câncer, que pode estar relacionada às variações na ingestão de determinados componentes da dieta (RIVLIN, 2001; MEYSKENS & SZABO, 2005; TRIPATHI *et al.*, 2005).

As frutas, vegetais e temperos são excelentes fontes de fibra, vitaminas e sais minerais, mas também contêm componentes como polifenóis, terpenos, alcalóides e flavonóides, dentre outros (AGGARWAL & SHISHODIA, 2006). Estes podem trazer muitos benefícios para a saúde além da nutrição básica. Dentre esses podemos citar o açafrão, pimenta do reino, pimenta vermelha, romã, soja, manjerição cravo-da-índia, gengibre, uva, chá verde, frutas cítricas, tomate, alho, alcachofra, cenoura e vegetais crucíferos, dentre outros (figuras 5, 6 e 7).

Diversas classes de anticarcinogênicos têm sido identificadas nos grãos de soja, por exemplo, incluindo inibidores de protease, fitoesteróis, saponinas, ácidos fenólicos, ácidos fílicos e isoflavonas (MESSINA & BARNES, 1991; RAFFOUL *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2008). Destes, as isoflavonas (genisteína (**16**) e daidzeína) são particularmente notáveis porque a soja é a única fonte dietética significativa destes componentes. Devido ao fato delas serem estrogênios fracos, as isoflavonas podem agir como antiestrogênios por competir com os estrogênios endógenos de ocorrência natural e que são mais potentes ao ligarem-se ao receptor de estrogênio. Isso pode explicar porque populações que consomem quantidades significativas de soja têm um risco reduzido de câncer dependente de estrogênio (MESSINA *et al.*, 1997; CHEUNG *et al.*, 2008).

Num estudo de coorte prospectivo com mais de 47.000 homens, aqueles que consumiram produtos a base de tomate 10 vezes ou mais por semana tiveram menos da metade do risco de desenvolver câncer de próstata avançado (GIOVANNUCCI *et al.*, 1995; CLINTON *et al.*, 1996; SYED *et al.*, 2007; SERENE *et al.*, 2008; SCHWARZ *et al.*, 2008). Outros cânceres cujo risco tem sido inversamente associado com os níveis sanguíneos ou teciduais de licopeno (**21**) incluem o de mama, trato digestivo, colo uterino, bexiga e pele e pulmão (LI *et al.*, 1997; CLINTON, 1998).

O chá perde apenas para água como a bebida mais consumida no mundo. Uma grande atenção tem sido dirigida aos constituintes polifenólicos do chá, particularmente do chá verde (HARBOWY & BALENTINE, 1997; WESTERTERP-PLANTENGA *et al.*, 2006). Os polifenóis abrangem mais de 30% do peso bruto total das folhas do chá fresco. As catequinas (**27**) são os polifenóis predominantes e mais importantes do chá verde (GRAHAM, 1992; WESTERTERP-PLANTENGA *et al.*, 2006).



Figura 5 – Alguns componentes da dieta com propriedades anticâncer. Fonte: AGGARWAL & SHISHODIA, 2006.

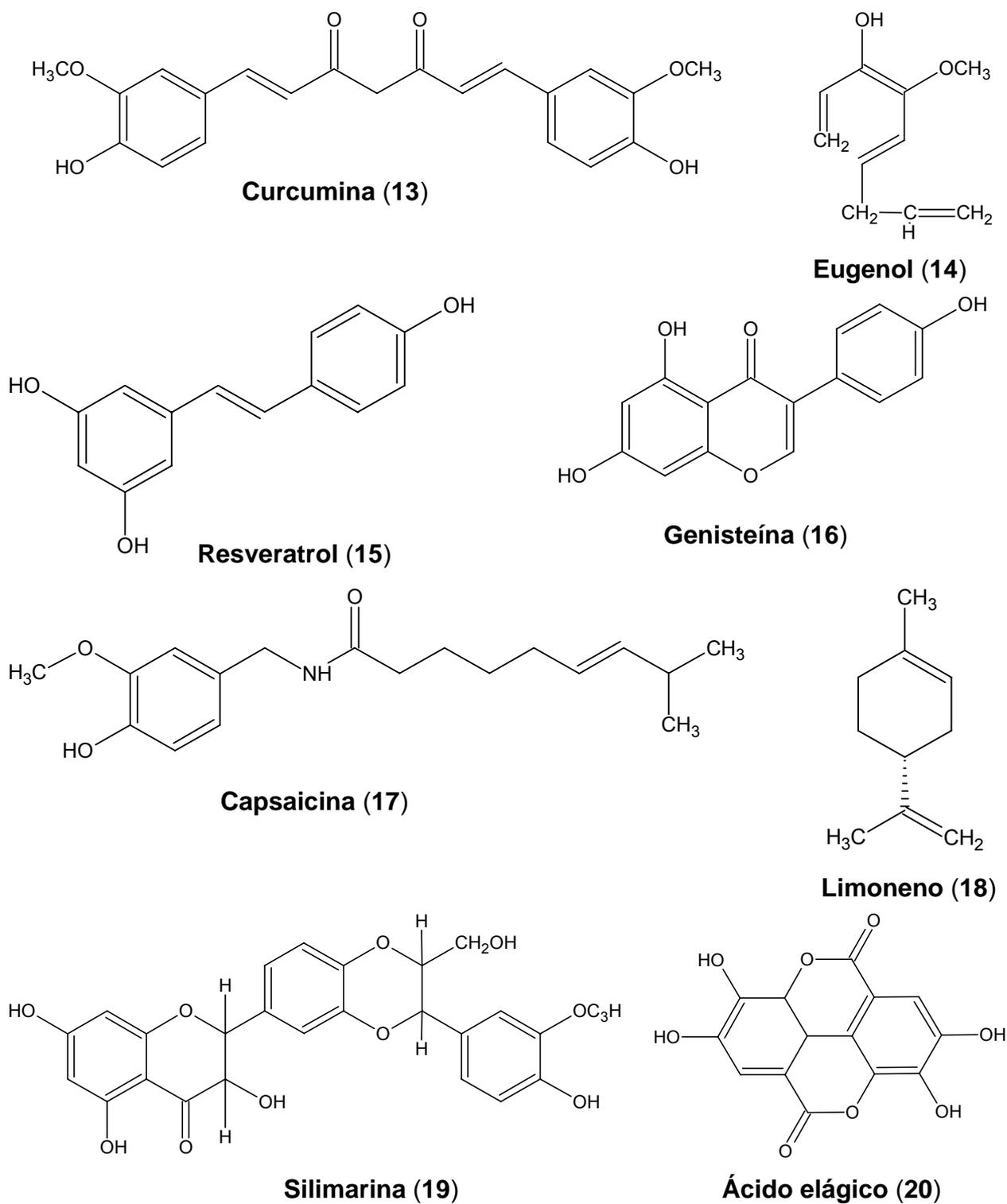
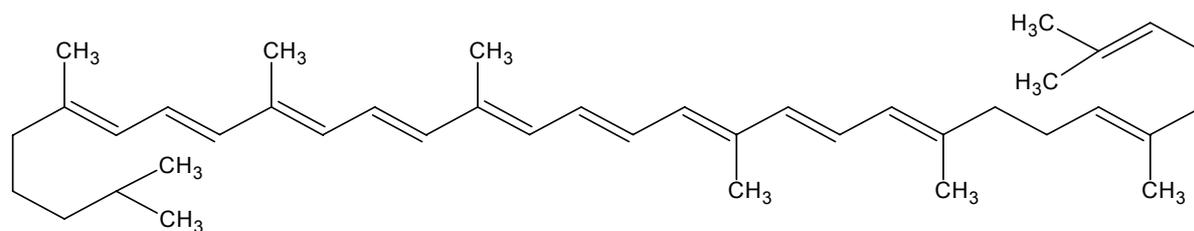
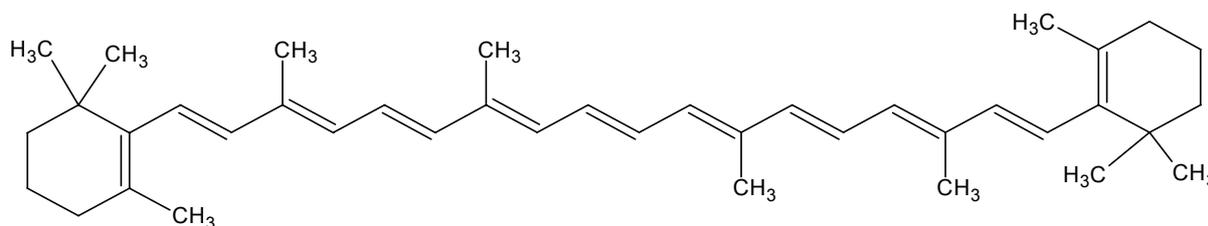


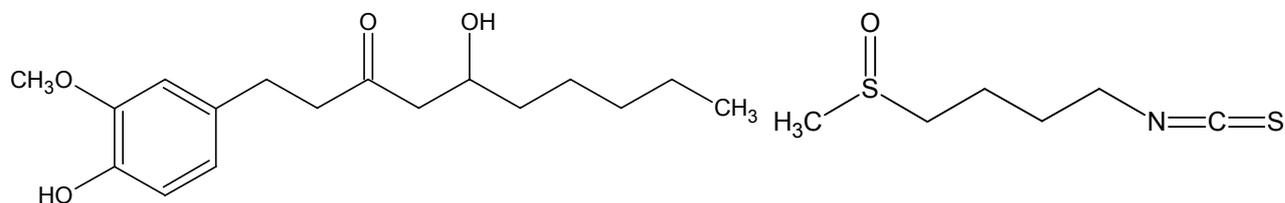
Figura 6 – Estrutura química de alguns componentes da dieta com propriedades anticâncer.



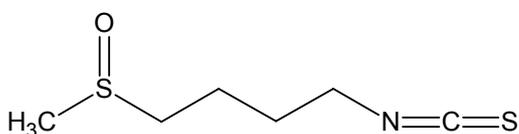
Lycopeno (21)



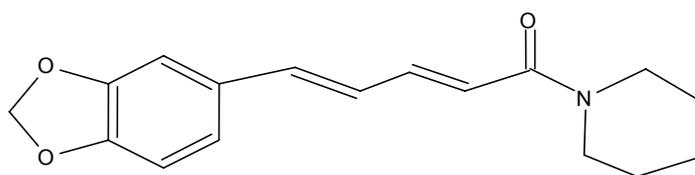
β-Caroteno (22)



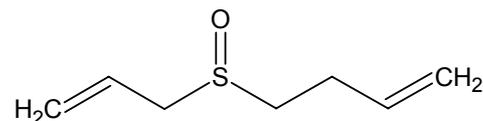
Gingerol (23)



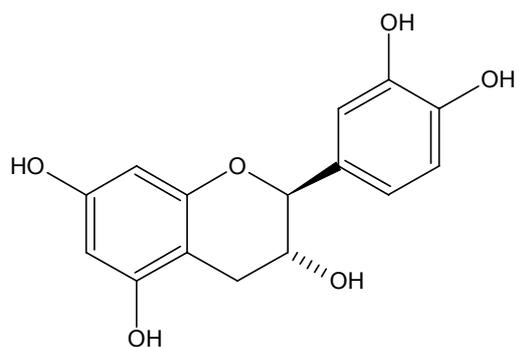
Sulforafano (24)



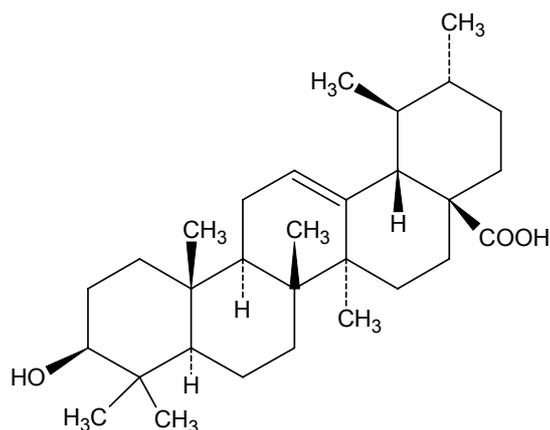
Piperina (25)



Alicina (26)



Catequina (27)



Ácido ursólico (28)

Figura 7 – Estrutura química de alguns componentes da dieta com propriedades anticâncer (continuação).

Diversos estudos mostram que o alho pode ser eficaz em reduzir o risco de câncer em humanos (ERNST, 1997; PITTLER & ERNST, 2007; SHUKLA & KALRA, 2007; GAPTER *et al.*, 2008). Em um estudo com mais de 40.000 mulheres pós-menopausa, o consumo de alho foi associado com uma redução de aproximadamente 50% no risco de câncer de cólon (STEINMETZ *et al.*, 1994).

As frutas cítricas também possuem um efeito protetor contra uma variedade de cânceres humanos. Ainda que laranjas, limões e limas sejam uma das principais fontes de importantes nutrientes como vitamina C, outros componentes podem ser os responsáveis pela atividade anticâncer (ELEGBEDE *et al.*, 1993; WOLFE & LIU, 2003). As frutas cítricas são particularmente ricas em uma classe de fitoquímicos conhecida como limonóides (**18**) (HASEGAWA & MIYAKE, 1996).

O alcalóide/amida piperina (**25**) é o principal constituinte da pimenta do reino (*Piper nigrum* L., Piperaceae). Vários estudos mostram seu potencial tanto para a prevenção quanto para o tratamento do câncer. A piperina previne citotoxicidade, genotoxicidade e carcinogênese induzida por carcinógenos químicos e protege da induzida por aflatoxina B₁ (SELVENDIRAN *et al.*, 2004; SELVENDIRAN *et al.*, 2006). Pradeep & Kuttan (2002) demonstraram que a piperina inibe metástase de pulmão induzida por células de melanoma B16F-10 em camundongos. A piperina também apresenta atividades imunomodulatória e antitumoral em vários modelos *in vivo* (SUNILA & KUTTAN, 2004, BEZERRA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2006). Além disso, o gênero *Piper*, de um modo geral, tem mostrado ser uma importante fonte de compostos bioativos, incluindo a piperlonguminina e a piplartina (PARMAR *et al.*, 1997; BEZERRA *et al.*, 2008).

Os resultados das pesquisas que envolvem esses microelementos representam um grande avanço na elucidação do papel preventivo e/ou curativo do alimento, no combate ao câncer. Os inúmeros microelementos isolados apresentam atividade na expressão de vários alvos farmacológicos tais como fator nuclear kappa B (NFkB), ativador da proteína-1 (AP-1), ciclo celular, apoptose, proteína quinase B (PKB), gene P53, sinalizadores de fator de crescimento, citocinas e metástase, fator de necrose tumoral, sinalizador e ativador da transcrição (STAT), ciclooxigenase 2 (COX-2), lipooxigenase (LOX), óxido nítrico sintase indutiva (NOSi), proteína mitogênica ativada (MAP), metilação do DNA e angiogênese (tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Alvo molecular de componentes da dieta com propriedades anticâncer.

Nome da planta	Composto ativo	Alvo molecular
Açafrão (<i>Curcuma longa</i> L.)	Curcumina (13), curcuminóides	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓STAT1, ↓STAT3, ↓STAT5, ↓β-catenina, ↑Nrf2, ↓VEGF, ↓HER2, ↓PKA, ↓PKC, ↓VCAM-1, ↓Bcl-2, ↓Bcl-XL, ↓ICAM-1, ↓TF, ↓AR, ↓p53, ↑MDR, ↓FTPase, ↑GST, ↑GSH-px, ↑HO, ↓XOD, ↓ciclina D1, ↓5-LOX, ↓COX-2, ↓INOS, ↓MMP-9, ↓TNF, ↓IL-6, ↓L-8, ↓IL-12
Pimenta do reino (<i>Piper nigrum</i> L.)	Piperina (25)	↓NF-κB, ↓ATF-2, ↓c-Fos, ↓cAMP, ↓IL-1β, ↓IL-6, ↓TNF, ↓GM-CSF
Pimenta vermelha (<i>Capsicum annum</i> L.)	Capsaicina (17)	↓NF-κB, ↓ciclina D1, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL, ↓Cdk1, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL
Romã (<i>Punica granatum</i> L.)	Ácido elágico (20)	↓NF-κB, ↓COX-2, ↓cíclica D1, ↓MMP-9, ↓PDGF, ↓VEGF, ↑p21/WAF1, ↑p53
Soja (<i>Glycine max</i> L. Merr.)	Genisteína (16)	↓NF-κB, ↑caspase-12, ↑p21/WAF1, ↑ GST- px
Manjeriço (<i>Ocimum sanctum</i> L.)	Ácido ursólico (28)	↓NF-κB, ↓COX-2, ↓ciclina D1, ↓MMP-9
Cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel)	Eugenol (14)	↓NF-κB
Gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	Gingerol (23)	↓TNF, ↓NF-κB, ↓AP-1, ↓COX-2, ↓NOS, ↓VEGF, ↑caspase-3, ↓Bcl2

Abreviações: NF-κB, fator nuclear kappa B; AP-1, ativador da proteína-1; iNOS, óxido nítrico sintase induzida; COX-2, ciclooxigenase-2; IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; HO, heme-oxigenase; Nrf, fator relacionado ao NF-E2; PKA, proteína quinase A; PKC, proteína quinase C; LOX, lipoxigenase; VEGF, fator endotelial de crescimento vascular; AR, receptor androgênio; VCAM, moléculas de adesão vascular; ICAM, moléculas de adesão intercelular; TF, fator tecidual; MDR, resistência a muitifármacos; Ftase, proteína farnesil transferase; GST, glutational S-transferase; GST-px, glutational peroxidase; XOD, xantina oxidase; MMP, metaloprotease de matriz; STAT, sinalizador e ativador da transcrição; Cdk, ciclina dependente de quinase; PDGF, fator de crescimento derivado de plaqueta; caspase, P53, P21 são proteínas pró-apoptóticas; Bcl2 e BclxL são proteínas antiapoptóticas; β-catenina, proteína estrutural; HER, proto-oncogene; ciclicas, reguladoras do ciclo celular. Fonte: AGGARWAL & SHISHODIA, 2006; PRADEEP & KUTTAN, 2004.

Tabela 2 – Alvo molecular de componentes da dieta com propriedades anticâncer (continuação).

Nome da planta	Composto ativo	Alvo molecular
Uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	Resveratrol (15)	↓COX-2, ↓iNOS, ↓AP-1, ↓NF-κB, ↑P21, ↑Cip1/WAF1, ↑p53, ↑Bax, ↑caspases, ↓ciclina D1, ↓ciclina E, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL, ↓PKC, ↓PKD, ↓5-LOX, ↓VEGF, ↓IL-1, ↓IL-6, ↓IL-8, ↓AR, ↓PSA, ↓CYP1A1, ↑HO-1, ↑Nrf2, ↓STAT
Chá verde (<i>Camellia sinensis</i> L.)	Catequinas (27)	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓COX-2, ↓ciclina D1, ↓MMP-9, ↑HO-1, ↓IL-6, ↓VEGF, ↑p53, ↓Bcl-2, ↑p21/WAF1
Frutas cítricas (<i>Citrus sp.</i>)	Limoneno (18)	↓COX-2, ↓iNOS
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Licopeno (21)	↓NF-κB
Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	Alicina (26)	↓NF-κB
Alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.)	Silimarina (19)	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓COX-2, ↓ciclina D1, ↓MMP-9
cenoura (<i>Daucus carota sativus</i> L.)	β-caroteno (22)	↓NF-κB
Vegetais crucíferos (<i>Brassica sp.</i>)	Sulforafano (24)	↓NF-κB, ↓ciclina D1, ↓Cdk1, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL

Abreviações: NF-κB, fator nuclear kappa B; AP-1, ativador da proteína-1; iNOS, óxido nítrico sintase induzida; COX-2, ciclooxigenase-2; IL, interleucina; HO, heme-oxigenase; Nrf, fator relacionado ao NF-E2; PKD, proteína quinase D; PKC, proteína quinase C; LOX, lipoxigenase; PSA, antígeno prostático específico; CYP, citocromo p450; CYP7A1, colesterol 7α-hidroxilase; VEGF, fator endotelial de crescimento vascular; AR, receptor androgênio; MMP, metaloprotease de matriz; STAT, sinalizador e ativador da transcrição; Cdk, ciclica dependente de quinase; caspase, P53, P21, Bax são proteínas pró-apoptótica; Bcl2 e BclxL são proteínas antiapoptóticas; ciclicas, reguladoras do ciclo celular. Fonte: AGGARWAL & SHISHODIA, 2006.

A partir destes exemplos, fica evidente que várias substâncias presentes em frutas, legumes e temperos podem apresentar potente atividade farmacológica. Portanto, é necessário mais investigações envolvendo os componentes alimentares para elucidar o papel desses fitoquímicos na prevenção e no tratamento do câncer.

1.4. Piplartina

A piplartina (**29**) (figura 8), também chamada de piperlongumina, é um alcalóide/amida encontrado nas plantas do gênero *Piper*, tais como *Piper longum* L. (pimenta longa), *Piper tuberculatum* L. (pimenta-d'arda), *Piper arborescens* Roxb. (Pimenta do fruto ganchoso), *Piper callosum* Ruiz & Pav. (João Brandim), *Piper retrofractum* Vahl. e *Piper sylvaticum* Roxb (PARMAR *et al.*, 1997).

A piplartina apresenta diferentes atividades biológicas. Essa amida apresentou potente atividade repelente e inseticida para formiga *Atta cephalotes* (CAPRON & WIEMER, 1996). A atividade antifúngica da piplartina também foi estudada com resultados positivos para as linhagens *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* (NAVICKIENE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002).

A piplartina também apresentou um efeito leishmanicida potente quando testada no modelo *in vitro* contra promastigotos de *Leishmania donovani* na concentração de 100 µM. Esta atividade foi confirmada *in vivo* usando o modelo, em *hamster*, de leishmaniose visceral na dose de 30 mg/kg (BODIWALA *et al.*, 2007).

Em relação às ações da piplartina sobre o sistema nervoso central, foram observadas atividades ansiolítica e antidepressiva (FELIPE *et al.*, 2007). A piplartina apresentou um perfil similar ao observado com a buspirona e venlafaxina, não apresentando nenhuma sedação. O efeito ansiolítico é completamente revertido pelo flumazenil, sugerindo a participação de receptores do tipo benzodiazepínicos. A piplartina mostrou efeito antidepressivo no teste do nado fossado, possivelmente agindo no sistema de neurotransmissão monoaminérgica, similarmente a imipramina.

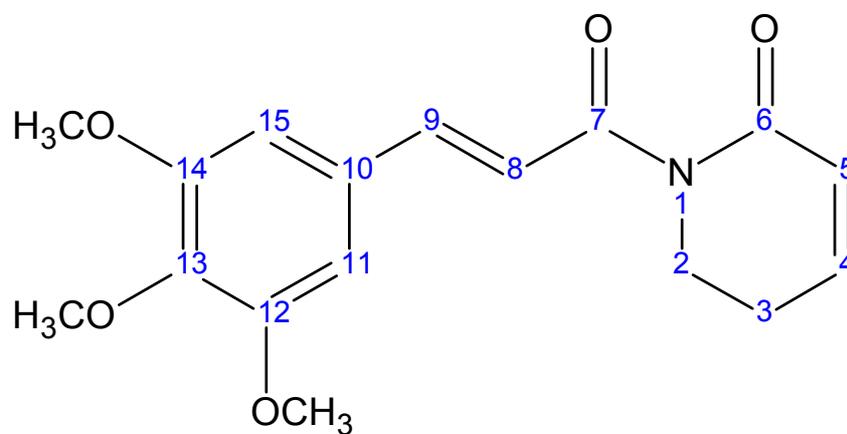


Figura 8 – Estrutura química da piplartina (29) {5,6-dihidro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-2(1H)piridinona}.

Em ensaio de atividade antiagregante plaquetária, a piplartina mostrou ser um potente inibidor da agregação plaquetária induzida por colágeno, ácido aracdônico, fator ativador de plaquetas e por agonista de receptor de tromboxano A2, mas não por trombina, sugerindo uma ação antagonista nos receptores de tromboxano A2 (TSAI *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2007; IWASHITA *et al.*, 2007).

A piplartina também apresenta uma ação espasmolítica em aorta de rato. A piplartina relaxou de maneira concentração-dependente a aorta pré-contraída com fenilefrina. Este efeito foi independente do endotélio funcional e da participação das prostaciclinas. Piplartina administrada cumulativamente sobre a fase tônica da contração, inibe de maneira concentração-dependente as contrações induzidas por KCl, sugerindo um efeito sobre os canais de cálcio dependentes de voltagem. Piplartina também inibe as contrações fásicas induzidas por fenilefrina em meio livre de cálcio, porém não apresenta nenhum efeito sobre as contrações fásicas induzidas por cafeína nas mesmas condições experimentais. O autor sugere que a piplartina induz relaxamento em aorta de rato por bloquear o influxo de Ca^{2+} através dos canais de cálcio dependentes de voltagem e por interferir na mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis ao 1,4,5-trifosfato de inositol (mobilização de Ca^{2+} mediada por receptor) (OLIVEIRA, 2000).

A atividade citotóxica da piplartina foi descrita inicialmente em 1990, por pesquisadores taiwanêses, em células tumorais KB (carcinoma nasofaríngeo humano), P-388 (leucemia linfocítica murina), A-549 (carcinoma de pulmão humano) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) (DUH *et al.*, 1990a; DUH *et al.*, 1990b; TSAI *et al.*, 2005). O potencial citotóxico da piplartina foi avaliado em estudos posteriores, agora pelo nosso grupo de pesquisadores, em células HL-60 (leucemia promielocítica humana), B16 (melanoma murina), HCT-8 (carcinoma de cólon humano) e CEM (leucemia linfocítica humana), K-562 (leucemia mielocítica crônica humana), JUKART (leucemia de células T humana) e MOLT-4 (leucemia de células T humana) (BEZERRA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2007).

Além disso, o efeito da piplartina sobre o desenvolvimento de ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus* foi também avaliado (BEZERRA *et al.*, 2005). A piplartina causou inibição do desenvolvimento dos ovos de ouriço do mar de maneira dependente da concentração durante todas as fases examinadas, primeira e

terceira divisões e blástula. A atividade antimitótica da piplartina foi relacionada com a inibição da síntese de proteína e/ou DNA.

O efeito citotóxico da piplartina parece está relacionada com a inibição da síntese de DNA e indução de morte celular por ambas as vias, apoptose e necrose, dependendo da concentração usada (BEZERRA *et al.*, 2007). Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não é conhecido.

Adicionalmente, o potencial anticâncer da piplartina foi confirmado em modelo pré-clínico *in vivo* (BEZERRA *et al.*, 2006). A administração de piplartina ou piperina (50 ou 100 mg/kg/dia) inibiu o desenvolvimento de tumor sólido em camundongos transplantados com Sarcoma 180. A atividade antitumoral da piplartina parece estar relacionada diretamente a sua ação citotóxica, 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 a piplartina, entretanto, de maneira mais intensa nos rins.

Assim, a piplartina, um produto natural encontrado em pimentas, pode ser um agente anticâncer promissor. Por isso, estudos farmacológicos que avaliem seu potencial citotóxico, em níveis celular e molecular, são requeridos. Para tanto, esta tese focou estudar a farmacologia das propriedades anticâncer da piplartina.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Geral

Estudar as propriedades anticâncer da piplartina em vários modelos biológicos.

2.2. Específicos

- Avaliar a relação estrutura-atividade citotóxica da piplartina;
- Avaliar a seletividade deste composto em relação a células normais;
- Avaliar o mecanismo de ação citotóxico da piplartina em células HL-60:
 - Avaliar o efeito da piplartina sobre a indução de morte celular;
 - Avaliar o efeito da piplartina sobre o ciclo celular;
- Avaliar o potencial genotóxico da piplartina em células V79;
- Avaliar o potencial mutagênico e recombinogênico da piplartina;
- Avaliar o efeito da piplartina sobre as células da medula óssea de animais;
- Avaliar a cinética de absorção da piplartina;
- Avaliar o efeito da associação do 5-FU com a piplartina.

Materiais e Métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais utilizados

3.1.1. Equipamentos

- Agitador de placa, MLW modelo Thys 2
- Agitador vortex, AD8850
- Balança analítica, GEHAKA AG200
- Balança para pesar animais, Filizola
- Banho-Maria, MOD. 105 DI DELLTA
- Centrífuga centimicro, FANEM Modelo 212
- Centrífuga de lâminas, Shandon Shouthern Cytospin
- Centrífuga de placas Eppendorf, Modelo Centrifuge 5403
- Centrífuga excelsa Baby I, FANEM Modelo 206
- Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte Mini
- Coluna cromatográfica C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm), Nanoseparation Technologies
- Contador manual, Division of Bexton, Dickinson and Company
- Deatilador de água
- Deonizador de água Mili-Q, Millipore
- Espectrofotômetro de placas, DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter
- Espectrômetro de massas, Micromass, Quattro MicroTM
- Fluxo laminar, VECO
- Gerador de nitrogênio, Dominick Hunter, UHPLCMS 18
- HTS (*High throuput screeing* biomek 3000), Beckman Coulter

- Incubadora de células (CO₂ Water-Jacket Incubator), NUAIRES TS Autoflow
- Microscópio de fluorescência, Olympus BX41
- Microscópio óptico, Metripex Hungray PZO-Labimex Modelo Studar lab
- Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot
- Micrótomo – SLEE - MANZ BR1
- Pipetas automáticas, Gilson
- Potenciostato/galvanostato mod. AutoLab PGSTAT20
- Pré-coluna (4 mm x 4 mm), Merck
- Sistema HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência ou CLAE), Shimadzu

3.1.2. Reagentes

- Acetato de sódio, VETEC
- Acetonitrila grau analítico, Tedia
- Ácido Acético, Vetec
- Ácido clorídrico (HCl), Vetec
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Proquímios
- Aflotoxina B₁, Sigma
- Agarose baixo ponto de fusão, Gibco
- Agarose ponto de fusão normal, Gibco
- Alamar blue, Sigma
- Azida sódica, Sigma
- Bicarbonato de Sódio, Dinâmica
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), Sigma
- Brometo de Etídio, Sigma
- Cloreto de sódio (NaCl), Vetec

- Dimetilsulfóxido (DMSO), Vetec
- Eosina, Vetec
- Etanol, Vetec
- Ficoll, Sigma
- Fitohemaglutinina, Sigma
- Formaldeído, Dinâmica
- Fosfato de sódio, Labsynth
- Hematoxilina, Doles
- Hidróxido de sódio (NaOH), VETEC
- Iodeto de propídeo, Sigma
- Meio de cultura para bactérias *Nutrient Broth nº 2* líquido, Oxoid
- Meio de cultura para células RPMI ou DMEM, Cultilab
- Meio de cultura para leveduras YEPD e YEL, Difco
- Metanol, Vetec
- Metanol grau analítico, Burdick & Jackson
- Metano sulfonato de etila, Sigma
- Metano sulfonato de metila, Sigma
- Rodamina 123, Sigma
- Soro fetal bovino (SFB), Cultilab
- Tolueno grau analítico, Mallinckrodt Baker
- Tripsina, Cultilab
- Tris – Base, Proquímios
- Triton X – 100, Isofar
- Xileno, Vetec

3.1.3. Fármacos

- 5 – Fluorouracil, Sigma
- Carbamazepina, Sigma
- Doxorubicina, Sigma
- Estreptomicina, Cultilab
- Gentamicina, Novafarma
- Penicilina, Cultilab
- Piplartina (**29**) (ver item 3.6.1)
- *N*-3,4,5-trimetoxidihidrocinaoíl-dihidropiridin-2-ona (**30**) (ver item 3.6.2)
- *N*-3,4,5-trimetoxicinaoíl-1,2-aminoetano (**31**) (ver item 3.6.3)
- *O*-3,4,5-trimetoxicinaoíl-1,2-etanodiol (**32**) (ver item 3.6.4)
- Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (**33**) (ver item 3.6.5)
- *S*-3,4,5-trimetoxicinaoíl-benzeno (**34**) (ver item 3.6.6)

3.2. Soluções

- *Tampão fosfato* pH = 7,4 (PBS)

8,77 g de NaCl, 3,18 g de NaH₂PO₄ (monobásico), 10,94 g de Na₂HPO₄ (dibásico) e água destilada em quantidade suficiente para 1 L de solução.

- *Tampão tris* pH = 7,6 (TBS)

8,77 g de NaCl, 6,08 g de tris-base e água destilada em quantidade suficiente para 1 L de solução. Ajustar o pH para 7,6 com HCl.

- *Tampão para corrida eletroforética* pH ~ 13 – *para ensaio do cometa alcalino*

0,292 g de EDTA, 12 g de NaOH e água destilada em quantidade suficiente para 1 L de solução.

- *Tampão para corrida eletroforética pH ~ 8,0 – para ensaio do cometa neutro*

12,11 g de tris-base, 25,2 g de acetato de sódio e água destilada em quantidade suficiente para 1 L de solução.

- *Tampão de lise pH = 10 – para ensaio do cometa*

145 g de NaCl, 29,23 g de EDTA, 1,21 g de tris-base, 10 mL de triton X-100, 100 mL de DMSO e água destilada em quantidade suficiente para 1 L de solução.

- *Solução de neutralização pH = 7,5 – para ensaio do cometa*

78,46 g de tris-base e água destilada em quantidade suficiente para 1 L de solução. Ajustar o pH para 7,5 com HCl.

3.3. Células

As células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e antitumoral estão listadas quanto ao tipo histológico, origem e fonte na tabela 3.

Tabela 3 - Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e antitumoral.

Linhagem*	Tipo Histológico	Origem	Fonte
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	Children's Mercy Hospital – EUA
HCT-8	Carcinoma de cólon	Humana	Children's Mercy Hospital – EUA
SF-295	Glioblastoma	Humana	Instituto Nacional do Câncer - EUA
MDA-MB-435	Melanoma	Humana	Instituto Nacional do Câncer - EUA
PBMC	Linfócitos e monócitos	Humana	Cultura primária
V79	Fibroblastos (pulmão)	Murina - <i>hamster</i>	Centro de Biotecnologia - UFRGS
Sarcoma 180	Sarcoma	Murina – camundongos	Laboratório de Oncologia experimental - UFC

*Linhagens pertencentes ao Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

3.3.1. Manutenção das células em cultura

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 ou DMEM, suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células despregassem-se das paredes das garrafas (PESSOA, 2000).

3.3.2. Obtenção de células PBMC

As células de PBMC (*peripheral blood mononuclear cells* – linfócitos e monócitos) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis. A coleta do sangue foi realizada em frasco heparinizados por profissionais capacitados, nas dependências da UNIFAC-UFC (Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 5 mL. O material assim obtido foi imediatamente transportado para o Laboratório de Oncologia experimental (LOE) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, também da Universidade Federal do Ceará.

As células PBMC foram isoladas a partir de uma amostra de cerca de 3 mL de sangue, acrescida de 5 mL de PBS. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 1.000 G, e feita a aspiração dos PBMC, presentes na região intermediária entre as hemácias e o plasma. A suspensão de células PBMC foi transferida para um outro tubo o qual foi acrescido com PBS até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 20 minutos a 1.000 G. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células PBMC foi ressuspensionado em meio completo (RPMI 1640 acrescido de 20% de soro fetal

bovino, 1 % de antibiótico (penicilina-estreptomicina) e 4% de fitohemaglutinina) e contado em câmara de Neubauer para posterior diluição e plaqueamento.

3.3.3. Manutenção do tumor sarcoma 180 em camundongos

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. O procedimento é realizado a cada 10 dias, conforme aprovado pelo comitê de ética de pesquisas em animais da UFC (CEPA).

3.4. Microorganismos

As linhagens de microorganismos utilizadas nos ensaios de mutagenicidade e recombinogênese estão listadas quanto ao genótipo e fonte na tabela 4.

Tabela 4 - Linhagens de microorganismos utilizadas nos ensaios de mutagenicidade e recombinação.

Linhagem*	Genótipo	Fonte
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
XV185-14c	<i>Matα ade2-2 arg 4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10</i>	R.C. Von Borstel
N123	<i>MATa his1-7</i>	J.A.P. Henriques
XS2316	<i>MATa/α ADE6/ade6 leu1-1/leu1-12 trp5-48/TRP5 CYH2/cyh2 MET13/met13 LYS5/lys5-1 his1- 1/his1-1</i>	I. Machida e S. Nakaia
<i>Salmonella typhimurium</i>		
TA97a	Deslocamento do quadro de leitura do DNA para -C-C-C-C-C-C-; + 1 Cyt	B. M. Ames
TA98	Deslocamento do quadro de leitura do DNA para -C-G-C-G-C-G-C-G	B. M. Ames
TA100	Substituição de leucina (GAG) por prolina (GGG)	B. M. Ames
TA102	Mutação ochre TAA no gene <i>hisG</i>	B. M. Ames

*Linhagens pertencentes ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.4.1. Manutenção dos microorganismos

3.4.1.1. Preparo das culturas de *Salmonella typhimurium*

Para a preparação das culturas bacterianas utilizadas nos ensaios de mutagenicidade, cada cepa mantida em nitrogênio líquido foi descongelada em banho de gelo. A cultura descongelada (200 µL) foi então transferida para um erlenmeyer contendo 20 mL de meio *Oxoid Nutrient Broth n° 2* líquido. A cultura foi colocada para crescer em banho-maria a 37 °C, com agitação (90 rpm) e protegida da luz, durante 14-15 horas, tempo de crescimento necessário para a obtenção de uma concentração bacteriana de $1-2 \times 10^9$ células/mL (MARON & AMES 1983).

3.4.1.2. Preparo das culturas de *Saccharomyces cerevisiae*

O crescimento das células foi feito em meio líquido completo (YEL) contendo 1% de extrato de levedura, 2% de bactopectona e 2% de glicose. Para determinação do número de células viáveis, ou seja, unidades formadoras de colônias foram feitas semeaduras em meio YEPD solidificado com 2% de bacto-ágar (AUSUBEL *et al.*, 1989; BURKE *et al.*, 2000). Para todos os tratamentos, as células foram ressuspensas e diluídas em solução salina (NaCl 0,9%). Nos testes de mutagênese foi empregado o Meio Sintético (SC) suplementado (SC-histidina, SC-lisina e SC-homoserina), nos quais os aminoácidos foram omitidos, conforme descrito por Ausubel *et al.* (1989).

Células em fase estacionária de crescimento foram obtidas a partir de uma colônia isolada, retirada da placa e colocada para crescer em meio líquido YEL, por 48 horas, a 30 °C, até atingir a concentração de $2-4 \times 10^8$ células/mL. Culturas em fase exponencial foram obtidas por incubação de 2×10^6 células/mL de uma pré-cultura em fase estacionária, também em meio YEL. Após cerca de 4 horas de incubação, nas mesmas condições acima descritas, a cultura alcançava a fase exponencial de crescimento ($1-2 \times 10^7$ células/mL), com uma percentagem de 50-70% brotos.

3.5. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* albino (*Rattus norvegicus*) ou camundongos *Swiss* albino (*Mus musculus*) oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Estes foram alojados dentro de gaiolas de polipropileno e grades metálicas apropriadas em pequenos grupos do mesmo sexo (não excedendo 5 animais por gaiola para ratos ou 10 animais por gaiola para camundongos). A temperatura do local foi de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A iluminação foi artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os animais tiveram livre acesso a alimentação (ração específica) e água.

Foram utilizados animais (fêmeas ou machos) adultos, jovens, saudáveis e que não tenham sido anteriormente submetidos a processos experimentais. O número de animais utilizados foi reduzido ao mínimo cientificamente aceitável. No início do estudo, a variação de massa dos animais foi à mínima possível, não excedendo $\pm 20\%$ da massa média de cada grupo.

Os animais foram identificados de forma inequívoca, e foram aclimatados às condições do biotério durante pelo menos cinco dias. A dor e o sofrimento dos animais no decurso dos ensaios foram minimizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará.

3.6. Procedimento experimental

3.6.1. Obtenção da piplartina (29)

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, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Raízes de *P. tuberculatum* (420,0 g) 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 e 122,6 °C). Rendimento 32,46 %. A estrutura da piplartina foi determinada por análise espectroscópica e comparação dos dados da literatura (ATAL *et al.*, 1975; BRAZ-FILHO *et al.*, 1981).

3.6.2. Obtenção do *N*-3,4,5-trimetoxidihidrocinamoil-dihidropiridin-2-ona (30)

Para a obtenção do (30) a partir da piplartina, uma reação de hidrogenação foi realizada utilizando um sistema de hidrogenação sob pressão. A esse sistema foram adicionados 100 mg de piplartina solubilizados em 20 mL de diclorometano e ródio como catalisador da reação. O sistema foi mantido sob agitação magnética por aproximadamente 24 horas, atmosfera de hidrogênio e uma pressão de 3,5 atm. Após este período, o catalisador foi removido por filtração. Análise por CCD revelou, que o produto não estava puro, sendo submetido a fracionamento cromatográfico em coluna flash de gel de sílica pré-empacotada com diclorometano. Após eluição com o mesmo solvente, obteve-se 27 mg de líquido viscoso amarelado. Rendimento 27 %. Sua estrutura foi determinada por análise espectroscópica (figura 9).

3.6.3. Obtenção do *N*-3,4,5-trimetoxicinamoil-1,2-aminoetano (31)

Para a obtenção do (31) 100 mg da piplartina foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio e acondicionados em balão de 50 mL. À solução foram adicionados 1 mL de 1,2-diaminoetano. O sistema foi mantido sob agitação magnética à temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. Análise comparativa por CCD sugeriu o final da reação, através do desaparecimento da mancha relativa ao material de partida. A elaboração da reação foi realizada adicionando-se 30 mL de água destilada à mistura reacional, seguida de extração com clorofórmio (3 x 10 mL). As

fases orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro e evaporadas sob pressão reduzida. O produto da reação foi 97 mg, de um material gelatinoso amarelado, que se mostrou homogêneo em CCD, o qual foi identificado com sendo o **(31)**. Rendimento 97%. Sua estrutura foi determinada por análise espectroscópica (figura 9).

3.6.4. Obtenção do O-3,4,5-trimetoxicinamoil-1,2-etanodiol (32)

Para a obtenção do **(32)** 1,5 mL de etilenoglicol foram adicionados a 100 mg da piplartina, dissolvidos em 15 mL de diclorometano e acondicionados em balão de 50 mL. À mistura reacional foram adicionados 1 mL da solução aquosa de hidróxido de sódio 10% (p/v). A reação se processou sob agitação magnética e refluxo por um período de 24 horas. Análise comparativa por CCD sugeriu o final da reação, através do desaparecimento da mancha relativa ao material de partida. A elaboração da reação foi realizada adicionando-se 20 mL de água destilada à mistura reacional, seguida de extração com diclorometano (3 x 10 mL) como fase orgânica. Ao término da extração, a fase aquosa foi desprezada e as fases orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro e evaporadas sob pressão reduzida. O produto reacional apresentou-se como um sólido amarelo pesando 55 mg, que se mostrou homogêneo em CCD, o qual foi identificado como sendo o **(32)**. Rendimento 55%. Sua estrutura foi determinada por análise espectroscópica (figura 9).

3.6.5. Obtenção do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (33)

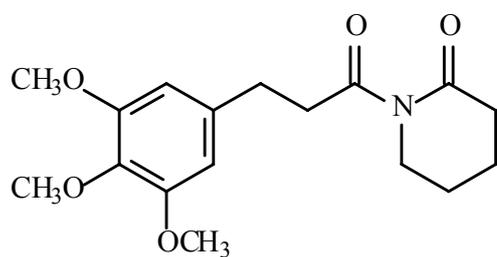
Para a obtenção do **(33)** 100 mg da piplartina foram dissolvidos em 30 mL de acetona e acondicionados em balão de 50 mL. À solução foram adicionados 10 mL de ácido clorídrico 2N. O sistema foi mantido sob refluxo por um período de 2 horas. O desenvolvimento da reação foi acompanhada por CCD até o desaparecimento da mancha relativa ao material de partida. A elaboração da reação foi realizada adicionando-se 30 mL de água destilada à mistura reacional, seguida de extração com clorofórmio (3 x 15 mL). Ao término da extração, a fase aquosa foi desprezada e as fases orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio

anidro e evaporadas sob pressão reduzida. O produto reacional apresentou-se como um sólido incolor pesando 44 mg, o qual foi identificado como sendo o **(33)**. Rendimento 44 %. Sua estrutura foi determinada por análise espectroscópica (figura 9).

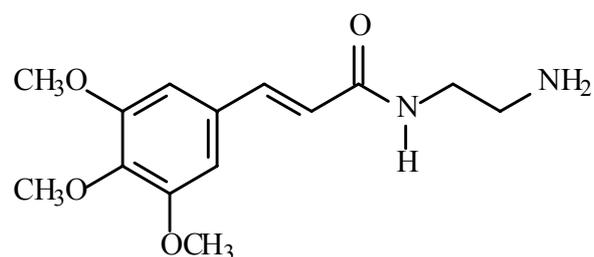
3.6.6. Obtenção do S-3,4,5-trimetoxicinamoil-benzeno (34)

Para a obtenção do **(34)** 100 mg da piplartina foram dissolvidos em 15 mL clorofórmio e acondicionados em balão de 50 mL. À solução foram adicionados 1 mL de tiofenol e uma quantidade equimolecular de KOH, para tornar o tiofenol mais nucleofílico. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 2 horas. O término da reação foi acompanhado por CCD, quando foi observado o desaparecimento da mancha relativa ao material de partida. A elaboração da reação foi realizada adicionando-se 30 mL de água destilada à mistura reacional, seguida de extração com clorofórmio (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro e evaporadas sob pressão reduzida. O produto reacional apresentou-se como um sólido branco pesando 80 mg, o qual foi identificado como sendo o **(34)**. Rendimento 80 %. Sua estrutura foi determinada por análise espectroscópica (figura 9).

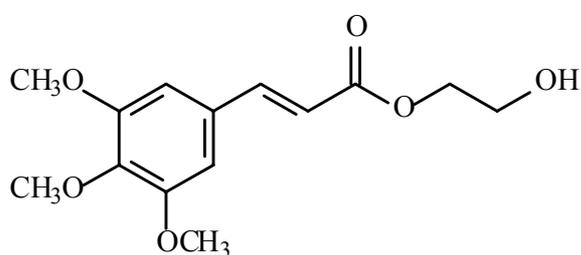
O estudo químico foi realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação do professor Dr. Edilberto Rocha Silveira, da professora Dr^a Mary Anne Sousa Lima, da professora Dr^a Otilia Deusdênia Loiola Pessoa e da professora Dr^a Jane Eire Silva Alencar de Menezes.



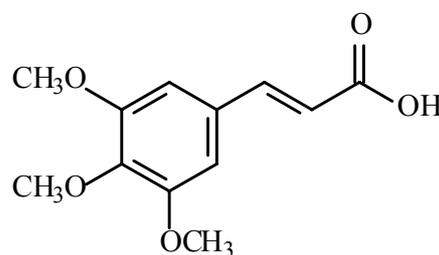
(30)



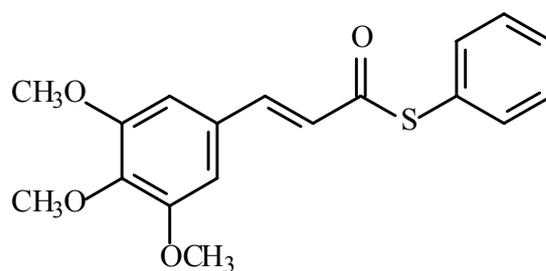
(31)



(32)



(33)



(34)

Figura 9 – Estrutura química dos análogos da piplartina.

3.6.7. Estudo da atividade citotóxica

O estudo da atividade citotóxica da piplartina e seus análogos foi realizado em células humana tumorais. Adicionalmente, a atividade citotóxica da piplartina foi avaliada em células humana normais.

3.6.7.1. Ensaio de citotoxicidade em células tumorais

3.6.7.1.1. Princípio do teste

A avaliação do potencial citotóxico das substâncias testes foram realizada em células tumorais humanas (HL-60 - leucemia promielocítica, HCT-8 – carcinoma de cólon, SF-295 – glioblastoma e MDA-MB-435 – melanoma) através do método do MTT após 72 horas de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mossman em 1983 para estimação de proliferação e sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimativa de citotoxicidade (PESSOA *et al.*, 2000; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2008) e baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor azul escura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

3.6.7.1.2. Procedimento experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL, para células em suspensão (HL-60) e $0,7 \times 10^5$ células/mL para as células aderidas (MDA-MB-435, SF-295 e HCT-8). Após 24 horas de incubação, as substâncias testes (0,09 a 25

µg/mL) dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço, utilizando o HTS (*high-throughput screening*), e encubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 0,25 µg/mL. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. 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 (0,5 mg/mL 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 150 µL 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 595 nm (MOSSMAN *et al.*, 1983).

3.6.7.1.3. Análise dos dados

As substâncias foram testadas em diluições seriadas, 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 Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.6.7.2. Ensaio de citotoxicidade em células normais

3.6.7.2.1. Princípio do teste

Para avaliar a citotoxicidade do composto teste sobre a proliferação de células normais, o ensaio do alamar blue foi realizado utilizando células PBMC (*Peripheral blood mononuclear cells* - células mononucleadas de sangue periférico humano, que inclui linfócitos e monócitos) após 72 horas de exposição com o composto teste. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina

(O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como com os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al.*, 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

3.6.7.2.2. Procedimento experimental

Inicialmente, as células PBMC foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (3×10^4 células/poço em 100 μ L de meio). Após 24 horas de incubação, as substâncias testes (0,09 a 25 μ g/mL) dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço, utilizando o HTS, e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina (0,09 a 25 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Vinte e quatro horas antes do final do período de incubação, 10 μ L da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED *et al.*, 1994).

3.6.7.2.3. Análise dos dados

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação = $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$. Onde, A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = AO_{LW} / AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. A substância foi testada em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} e seus respectivos intervalos de

confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.6.8. Estudo do mecanismo de ação citotóxico em células HL-60

O estudo do mecanismo de ação citotóxico da piplartina foi realizado utilizando a linhagem leucêmica HL-60 como modelo. Foram avaliados a viabilidade celular, o potencial transmembrânico da mitocôndria e o conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, por citometria de fluxo. O efeito da piplartina sobre a ativação da caspase-3 também foi avaliado. Adicionalmente, o índice mitótico foi determinado por coloração diferencial por hematoxilina/eosina.

3.6.8.1. Determinação da viabilidade celular

3.6.8.1.1. Princípio do teste

A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular, visto que apenas na necrose ela apresenta-se precocemente alterada. O teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo (PI), hidrofílico, penetrar na célula cuja membrana esteja rompida e após a ligação ao DNA emitir alta fluorescência quando é excitado pelo laser de argônio (488 nm). A célula com membrana íntegra emite baixa fluorescência. Deste modo, este método permite avaliar a viabilidade celular através da avaliação da integridade da membrana plasmática (MACKLIS & MADISON, 1990).

3.6.8.1.2. Procedimento experimental

A determinação da integridade da membrana celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI como agente fluorogênico. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle

negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância. As concentrações utilizadas da piplartina neste estudo foram previamente determinadas (BEZERRA *et al.*, 2007).

As células HL-60 foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/mL com diferentes concentrações da piplartina (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL). Uma alíquota de 50 µL foi recolhida 3 h, 6 h, 12 h e 24 h após a incubação com a substância. As células foram diluídas com a solução de PI (2 µg/mL em PBS), na ausência de luz e a 37 °C, e, após 5 minutos, analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.6.8.1.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.6.8.2. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

3.6.8.2.1. Princípio do teste

A mitocôndria é responsável pela iniciação da via intrínseca da apoptose. Quando bcl-2/xl é liberado da membrana externa da mitocôndria, forma-se um poro permitindo a saída de H⁺, causando despolarização mitocondrial, e também seguida de fatores como citocromo c, Smac/Diablo, dentre outros. A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é seqüestrado pra dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão

menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência. Deste modo, este ensaio foi utilizado para a investigação da ativação da via apoptótica intrínseca por parte da substância em estudo através da observação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial (MARCHETTI *et al.*, 1996).

3.6.8.2.2. Procedimento experimental

A determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria da célula foi avaliada por citometria de fluxo utilizando a rodamina 123 como agente fluorogênico. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância. As concentrações utilizadas da piplartina neste estudo foram previamente determinadas (BEZERRA *et al.*, 2007).

As células HL-60 foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/mL com diferentes concentrações da piplartina (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL). Uma alíquota de 50 µL foi recolhida 3 h, 6 h, 12 h e 24 h após a incubação com a substância. As células foram diluídas com a solução de rodamina 123 (1 µg/mL em PBS), na ausência de luz e a 37 °C, e, após 15 minutos. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspendido em PBS e reincubado por 30 minutos e, então, analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.6.8.2.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.6.8.3. Determinação da ativação da caspase-3

3.6.8.3.1. Princípio do teste

As caspases pertencem a família de proteases cisteínas, podendo ser divididas em caspases inflamatórias e caspases apoptóticas, os quais podem ser incluídas nos grupos de caspases iniciadoras (como no caso da apoptose as caspases-8 e -9) e efetoras (como no caso da apoptose as caspases-3 e -7). A ativação da caspase-3 possui papel central no mecanismo de apoptose. A caspase-3 é responsável pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e controle do DNA. Assim, a dosagem da caspase-3 permite o estudo de mecanismos apoptóticos (MEHMET, 2002).

3.6.8.3.2. Procedimento Experimental

A atividade de caspase-3 foi avaliada utilizando-se kit colorimétrico de protease, de acordo com as recomendações do fabricante. O método é baseado na detecção espectrofotométrica do cromóforo *p*-nitroanilida (pNA) após clivagem dos substratos X-pNA, onde X representa a seqüência de aminoácidos reconhecidos por caspases específicas: Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-pNA para a caspase-3. Inicialmente, células HL-60 (2×10^6 células/mL) foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de piplartina (2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10, µg/mL) em estufa úmida a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e lisadas em gelo. A quantidade de proteína no lisado foi determinada utilizando-se o ensaio para dosagem de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, 100-200 µg de proteínas foram incubadas com o substrato em placa de 96 cavidades. A densidade óptica das amostras foi medida em comprimento de onda de 405 nm (MILITÃO *et al.*, 2006). A atividade de caspase nas amostras foi determinada em relação ao controle não tratado e expresso como atividade de caspase-3 específica (UI/mg de proteína).

3.6.8.3.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prism versão 5.0.

3.6.8.4. Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula

3.6.8.4.1. Princípio do teste

O ciclo celular é constituído pelas seguintes fases: G_1 , S, G_2 e M. Durante o período de crescimento celular (fase G_1) uma célula diplóide apresenta um conteúdo $2n$ (n – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos) de DNA nuclear, possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear ($2-4n$) e na fase seguinte (fase G_2) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível $4n$. Em seguida ocorre a mitose (fase M, $4n$) durante a qual a célula se divide, formando duas células filhas, cada uma com um conteúdo $2n$ em DNA. As células que não se encontram em divisão celular (G_0) apresentam um conteúdo $2n$ de DNA. Assim, as diferentes fases do ciclo celular podem ser determinadas a partir do conteúdo de DNA que elas apresentam. Deste modo, o resultado da distribuição do conteúdo de DNA nuclear de uma população de células pode dar-se em G_0/G_1 , S e G_2/M (SHAPIRO, 1985; CIBAS, 1995).

Para determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula foi utilizado o PI como agente fluorogênico. Esse teste baseia-se na capacidade do PI se ligar ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o PI possa se ligar ao núcleo. Assim, as fases do ciclo celular foram determinadas através do conteúdo do DNA que elas apresentavam (MELAMED *et al.*, 1979; SHAPIRO, 1985; CIBAS, 1995).

3.6.8.4.2. Procedimento experimental

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI como agente fluorogênico. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância. As concentrações utilizadas da piplartina neste estudo foram previamente determinadas (BEZERRA *et al.*, 2007).

As células HL-60 foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/mL com diferentes concentrações da piplartina (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL). Uma alíquota de 50 µL foi recolhida 3 h, 6 h, 12 h e 24 h após a incubação com a substância. As células foram diluídas com a solução de lise contendo o PI (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 2 µg/mL iodeto de propídeo em PBS), na ausência de luz e a 37 °C, e, após 30 minutos, analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.6.8.4.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.6.8.5. Determinação do índice mitótico

3.6.8.5.1. Princípio do teste

O índice mitótico representa a razão entre o número de células em mitose e o número total de células. Este representa a proliferação celular de uma dada população de células. O índice mitótico é uma importante ferramenta em estudos células e genéticos (HUANG *et al.*, 2003). Neste estudo, o cálculo do índice mitótico foi utilizado para determinar a porcentagem de células em mitose e compará-la com a porcentagem de células em G₂/M determinada por citometria de fluxo.

3.6.8.5.2. Procedimento experimental

O índice mitótico foi determinado por coloração diferencial por hematoxilina/eosina. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância. As concentrações utilizadas da piplartina neste estudo foram previamente determinadas (BEZERRA *et al.*, 2007).

As células HL-60 foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/mL com diferentes concentrações da piplartina (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL). Uma alíquota foi recolhida 3 horas após a incubação com a substância. Para observar a morfologia, 50µL da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lâmina. Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol 100% por 1 minuto e a coloração, primeiramente, realizada foi a hematoxilina, seguida pela eosina. O material foi observado em microscópio ótico, com aumento de 400X, contando-se o número de células em fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e em interfase. Um total de 1000 células foi contado em cada lâmina (HUANG *et al.*, 2003). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas.

3.6.8.5.3. Análise dos dados

O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (prófase + metáfase + anáfase + telófase) pelo número total de células (intérfase + mitose) multiplicando-se por 100. Os dados foram analisados a partir da média \pm

E.P.M. de n experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.6.9. Estudo da atividade genotóxica e mutagênica

No estudo da atividade genotóxica *in vitro*, o ensaio do cometa, em células V79 (fibroblastos de pulmão de *Hamster* Chinês), foi realizado para avaliar danos à fita simples e à fita dupla do DNA induzidos pela piplartina. Adicionalmente, o estudo do mecanismo de ação genotóxica foi avaliado por citometria de fluxo. A atividade mutagênica da piplartina foi investigada em dois modelos clássicos: ensaio de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* (modelo procariótico) e ensaio de mutagenicidade e recombinação em *Saccharomyces cerevisiae* (modelo eucariótico). Para avaliar o potencial genotóxico/mutagênico *in vivo* da piplartina, o ensaio do micronúcleo em medula óssea foi realizado em camundongos.

3.6.9.1. Ensaio de genotoxicidade *in vitro* - Dano ao DNA - Ensaio do cometa

3.6.9.1.1. Princípio do teste

O ensaio cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) foi desenvolvido por Singh e colaboradores (1988) para detectar quebra de fitas simples e duplas na molécula de DNA induzidas por substâncias com potencial genotóxico, tais como agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Sendo muito utilizado em estudo de genética toxicológica, a fim de um biomonitoramento ambiental ou no monitoramento populacional em humanos. Entretanto, este teste é utilizado como um indicativo e não como um teste mutagênico. Este pode ser utilizado tanto em células de animais quanto vegetais *in vitro* e *in vivo* (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2003a).

3.6.9.1.2. Procedimento experimental

A avaliação do potencial genotóxico da piplartina, avaliado através do ensaio do cometa, foi realizado na linhagem celular V79. O ensaio do cometa foi realizado em condições alcalinas e em condições neutras (HARTMANN & SPEIT, 1997; SINGH & SINGH, 2002; WOJEWODZKA *et al.* 2002). O metano sulfonato de metila foi usado como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância.

Inicialmente foi avaliada a atividade citotóxica da piplartina na linhagem V79 para a determinação das concentrações a serem usadas no teste. Foram semeadas 500 células em placas de 60 mm para determinar a capacidade de formação de colônia. A piplartina foi adicionada ao meio após a adesão das células. Após 5 dias de incubação, as células foram fixadas em etanol e as colônias com 50 ou mais células foram coradas com Giemsa, contadas e a porcentagem de sobrevivência, relativa ao controle, foi calculada. A piplartina foi citotóxica em concentrações acima de 10 µg/mL. As concentrações 1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL foram escolhidas para os estudos de genotoxicidade.

Para o estudo da atividade genotóxica, células V79 (3×10^6 células em 5 mL) foram incubadas por 3 horas com diferentes concentrações da piplartina. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS gelado, removidas com 100 µL de tripsina 0,15% e ressuspensas em meio completo. Em seguida, 20 µL da suspensão de células ($\sim 10^6$ células/mL) foi dissolvido em 0,5% em agarose com baixo ponto de fusão e imediatamente espalhada sobre uma lâmina pré-tratada com 1% de agarose com baixo ponto de fusão. As células foram, então, colocadas em solução de lise por pelo menos 1 hora a 4 °C. Em seguida foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com tampão de corrida, em pH ~ 13, para o ensaio do cometa em condições alcalinas (HARTMANN & SPEIT, 1997; SINGH & SINGH, 2002) ou em pH ~ 8,0 para o ensaio do cometa em condições neutras (WOJEWODZKA *et al.*, 2002), por 60 min para permitir o equilíbrio com o tampão de corrida. A eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade por 20 min, usando 14 V e uma corrente de 12 mA (0,5 V/cm). Após a

corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização durante 5 minutos. A análise foi realizada por coloração com nitrato de prata (NADIN *et al.* 2001) e as células foram contadas em microscópio óptico. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas.

Este estudo de genotoxicidade em V79 foi realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação do professor Dr. João Antonio Pegas Henriques e da professora Dr^a Jenifer Saffi.

3.6.9.1.3. Análise dos dados

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON *et al.*, 2007; HARTMANN & SPEIT, 1997; TICE *et al.*, 2000). Foram contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a figura 10. Onde 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%). Foram calculados o índice (ID) e a frequência (FD) de danos. O ID foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = 400 - \sum \text{Escore}$. A FD representa a porcentagem de células que sofrem danos no DNA. Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

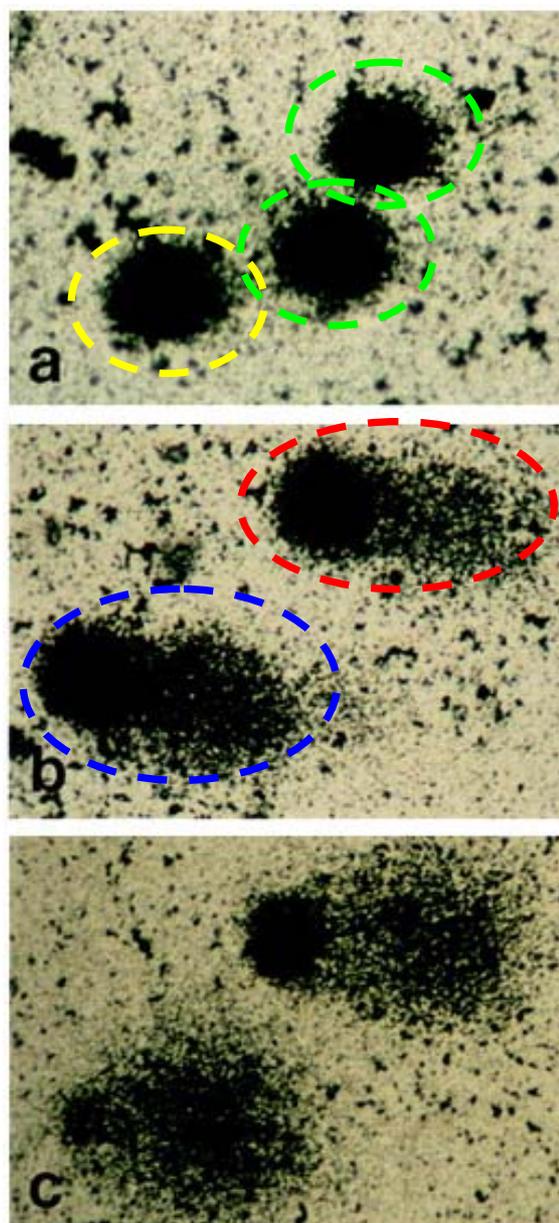


Figura 10 - Representação dos tipos de cometas corados com prata e visualizados em microscópio óptico, sendo indicado o escore atribuído para cada cometa de acordo com o dano. a) tipos 0 (verde) e 1 (amarelo); b) tipos 2 (vermelho) e 3 (azul); c) tipo 4. Fonte: NADIN *et al.* 2001.

3.6.9.2. Estudo do mecanismo de ação genotóxico em células V79

O estudo do mecanismo de ação genotóxico da piplartina foi realizado na linhagem celular V79 (fibroblastos de pulmão de *Hamster* Chinês). Foram avaliados a viabilidade celular, o potencial transmembrânico da mitocôndria e o conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, por citometria de fluxo.

3.6.9.2.1. Determinação da viabilidade celular

3.6.9.2.1.1. Princípio do teste

Ver item **3.6.8.1.1.**

3.6.9.2.1.2. Procedimento experimental

A determinação da integridade da membrana celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI como agente fluorogênico. A doxorubicina (1 µg/mL) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância. As concentrações utilizadas da piplartina neste estudo foram previamente determinadas.

As células V79 foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 células/mL com diferentes concentrações da piplartina (5 µg/mL e 10 µg/mL). Uma alíquota de 50 µL foi recolhida 3 horas após a incubação com a substância. A análise foi realizada de acordo com o item **3.6.8.1.2.**

3.6.9.2.1.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.6.9.2.2. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

3.6.9.2.2.1. Princípio do teste

Ver item 3.6.8.2.1.

3.6.9.2.2.2. Procedimento experimental

A determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria da célula foi avaliada por citometria de fluxo utilizando a rodamina 123 como agente fluorogênico. A doxorubicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância. As concentrações utilizadas da piplartina neste estudo foram previamente determinadas.

As células V79 foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 células/mL com diferentes concentrações da piplartina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Uma alíquota de 50 μL foi recolhida 3 horas após a incubação com a substância. A análise foi realizada de acordo com o item 3.6.8.2.2.

3.6.9.2.2.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos,

os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.6.9.2.3. Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula

3.6.9.2.3.1. Princípio do teste

Ver item **3.6.8.4.1.**

3.6.9.2.3.2. Procedimento experimental

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI como agente fluorogênico. A doxorubicina (1 µg/mL) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância. As concentrações utilizadas da piplartina neste estudo foram previamente determinadas.

As células V79 foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 células/mL com diferentes concentrações da piplartina (5 µg/mL e 10 µg/mL). Uma alíquota de 50 µL foi recolhida 3 horas após a incubação com a substância. A análise foi realizada de acordo com o item **3.6.8.4.2.**

3.6.9.2.2.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.6.9.3. Teste de Ames – ensaio de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* – teste *Salmonella* – microssoma

3.6.9.3.1. Princípio do teste

O teste de Ames foi desenvolvido por Bruce Ames e colaboradores na década de 70. Tem sido utilizado, mundialmente, nas últimas décadas para avaliar a mutagenicidade de substâncias químicas puras e misturas complexas (HENRIQUES *et al.*, 1987; ROLLA, 1995; MORTELMANS & ZEIGER, 2000). O teste emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* (células procarióticas) derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido. A maioria das linhagens bacterianas utilizadas no teste apresenta características que as tornam mais sensíveis para detecção de mutações, incluindo seqüências sítio específicas no DNA que respondem positivamente para reversão, aumento da permeabilidade celular a grandes moléculas, ausência do sistema de reparo de DNA livre de erro e plasmídeos contendo genes que causam aumento do processo de reparo sujeito a erro (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Essas linhagens não são capazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Suspensões de células bacterianas são expostas à amostra-teste, na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica exógeno, e plaqueadas em meio de cultura mínimo. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de colônias que crescem nesse meio de cultura após a exposição de uma população de bactérias à amostra a ser testada (HENRIQUES *et al.*, 1987). Os testes são acrescidos de uma fonte exógena de metabolização visando mimetizar parcialmente as condições de metabolização de mamíferos (RABELO-GAY *et al.*, 1991).

3.6.9.3.2. Procedimento experimental

Na avaliação do potencial mutagênico da piplartina, realizado através do teste de Ames (modelo procariótico), foram usadas linhagens de *S. typhimurium* que detectam mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (TA98 e TA97a) e mutações por substituição de pares de bases (TA100 e TA102). Foram usados controles positivos específicos para cada linhagem. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância.

Inicialmente foi avaliada a atividade citotóxica da piplartina na linhagem TA 100 de *S. typhimurium* para a determinação das concentrações a serem usadas no teste. As culturas foram colocadas em agitador (100 rpm) a 37 °C, ao abrigo de luz, por 11-14 horas. A piplartina foi citotóxica em concentrações acima de 40 µg/mL. As concentrações 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL e 40 µg/mL foram escolhidas para os estudos de mutagenicidade.

Para cada experimento, as culturas das linhagens-teste cresceram por 12 horas em caldo nutriente Oxoid N°2, até a densidade de $1-2 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Foi utilizada a fração microsomal - S9 que é composta por um homogenato de fígado de células de rato. A fração S9 é acrescida de co-fatores adequados e necessita de condições de pH específicas para que as reações de metabolização possam ocorrer. Para avaliar a atividade mutagênica foi utilizado o teste de incorporação em placas, que consiste na exposição das linhagens testadas e a amostra a testar em placa de Agar glicose mínimo na presença e ausência de sistema de avaliação metabólica S9 (0,5 mL). Os diferentes componentes foram, primeiramente, adicionados aos tubos de teste esterilizados contendo 2 mL de Agar de superfície líquido suplementado com histidina e biotina, mantendo-os a temperatura de 45 °C. Os conteúdos dos tubos foram misturados, homogeneizados e vertidos sobre a superfície de uma placa contendo Agar mínimo. Após solidificação do Agar de superfície, as placas foram incubadas invertidas e ao abrigo da luz, por 48 horas, a 37 °C. O ensaio foi realizado em triplicata. Procedeu-se, então, a contagem do número de revertentes em todas as placas (MARON & AMES, 1983; GATEHOUSE *et al.*, 1994; MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas.

Este estudo de metagênese *S. typhimurium* foi realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação do professor Dr. João Antonio Pegas Henriques e da professora Dr^a Jenifer Saffi.

3.6.9.3.3. Análise dos dados

Na análise do teste *Salmonella*/microsoma, foi utilizado o programa *Salmonel* (MYERS *et al.*, 1991; PICADA *et al.*, 2003). Para o estudo da diferença entre doses e entre repetições, foi utilizada a análise da variância (ANOVA), seguida de análise de regressão linear da curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em revertentes/placas ou pela razão de mutagenicidade (RM), também denominada de índice de mutagenicidade (IM). As amostras foram consideradas com resultado positivo quando IM foi ≥ 2 em pelo menos uma das doses testadas e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. A substância foi considerada citotóxica quando o IM foi $\leq 0,6$.

3.6.9.4. Ensaio de mutagênese e recombino gênese em *Saccharomyces cerevisiae*

3.6.9.4.1. Princípio do teste

Esse teste tem por objetivo avaliar agentes químicos e sua atividade mutagênica, utilizando como modelo *Saccharomyces cerevisiae*, que é um fungo unicelular, que apresenta um ciclo eucariótico típico e completo. Os efeitos mutagênicos podem ser avaliados em culturas haplóides e diplóides e em todos os estágios do ciclo celular como G₁, síntese de DNA, mitose e meiose, assim como os elementos genéticos extranucleares, como as mitocôndrias. A recombinação mitótica em células diplóides pode ser reflexo da expressão das atividades de reparação celular em resposta aos danos introduzidos no genoma pelos agentes químicos. Substâncias que produzem mutações freqüentemente podem introduzir

efeitos recombinantes (SILVA *et al.*, 2003a). A levedura possui também um sistema endógeno de ativação metabólica, constituído pelo complexo enzimático citocromo p-450, o qual a torna capaz de ativar vários pré-mutagênicos sem necessidade de ativação de um sistema exógeno (SILVA *et al.*, 2003a).

Este teste se baseia na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional (ZIMMERMANN, 1975). A restauração se deve a uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devida a uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos sem sentido (*nonsense* – mutação que resulta na alteração de um códon que determina um aminoácido para um códon de terminação da síntese protéica) (HAWTHORNE & LEOPOLD, 1974; ATKIN *et al.*, 1993). As células revertentes (mutantes ou recombinogênicas) podem ser detectadas pela semeadura em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo um *background* de crescimento.

3.6.9.4.2. Procedimento experimental

A avaliação do potencial mutagênico foi realizada nas linhagens haplóides N123 e XV185-14c de *S. cerevisiae* e o potencial recombinogênico foi realizado na linhagem diplóide XS2316 de *S. cerevisiae*. O 4-nitroquinolina-N-óxido foi usado como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância.

Inicialmente foi avaliada a atividade citotóxica da piplartina em fase estacionária ou exponencial de crescimento na linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae*. A piplartina apresentou atividade citotóxica apenas nas células na fase exponencial de crescimento em concentrações acima de 100 µg/mL. As concentrações 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL foram escolhidas para os estudos de mutagenicidade e recombinogênese em fase exponencial de crescimento.

Em frasco de Erlenmeyer contendo 30 mL de YEL foi inoculada uma colônia isolada da linhagem e colocada para crescer em incubadora com agitação orbital, a

180 rpm e 30 °C, durante 48 horas, para atingir a fase estacionária. As culturas assim mantidas atingiam uma concentração de 2 a 4 x 10⁸ céls/mL. Posteriormente, esta suspensão foi passada para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm. Após esta primeira centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 20 mL de solução salina, seguido de centrifugação para lavagem das células. Este procedimento foi repetido duas vezes. As células foram então contadas em câmara de Neubauer no microscópio óptico e foram feitas as diluições necessárias para se obter a concentração celular desejada para o tratamento. Uma suspensão celular de 2 x 10⁸ células/mL em fase estacionária foi incubada durante 20 horas a 30 °C, sob agitação a 180 rpm, com doses crescentes (10-100 µg/mL de suspensão celular) da piplartina. Determinou-se a sobrevivência através de semeadura em meio rico YEPD, após 3-5 dias de crescimento em estufa a 30 °C. Para a detecção de mutação induzida (revertentes das marcas LIS, HIS ou HOM) as células foram incubadas em meio mínimo seletivo, durante 3-5 dias a 30 °C. As placas foram incubadas no escuro a 30 °C, em estufa, durante 3-5 dias e após fez-se a contagem do número de colônias revertentes (AUSUBEL *et al.*, 1989; BURKE *et al.*, 2000). Todos estes experimentos foram feitos em triplicata para cada dose testada.

Na avaliação do potencial recombinogênico na linhagem diplóide XS2316 de *S. cerevisiae*, uma suspensão de levedura (2 x 10⁸ microorganismos/mL) em fase exponencial em 1 mL de PBS (sem condições de crescimento) ou meio YPD (com condições de crescimento) foram incubadas por 3 horas a 30 °C contendo diferentes concentrações da piplartina. Após o tratamento, as células foram diluídas em PBS, plaqueadas, em três diferentes meios de cultura (SC, SC - leu e SC + cyh) e incubadas durante 3-10 dias a 30 °C. As colônias cultivadas em meio SC indicam a sobrevivência e as colônias de células cultivadas em SC - leu e SC + cyh indicam recombinação mitótica intragênica ou conversão gênica e recombinações mitóticas intergênica ou *crossing-over*, respectivamente. A fim de medir a exata frequência de *crossing-over* para eliminar a possibilidade de que alguma colônia resistente a cicloheximida resultar em reversão no locus *CYH2* legitimidade, bem como de monossomia do cromossomo VII, as colônias resistentes a cicloheximida foram plaqueadas sobre uma série placas com meio SC - lys, SC - se reuniu e SC -, com posterior triagem desses marcadores para *cyh2* (AUSUBEL *et al.*, 1989; BURKE *et*

al., 2000). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas.

Este estudo de metagênese e recombino gênese em *S. cerevisiae* foram realizados no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação do professor Dr. João Antonio Pegas Henriques e da professora Dr^a Jenifer Saffi.

3.6.9.4.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de *n* experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.6.9.5. Avaliação da genotoxicidade/mutagenicidade em medula óssea de camundongos – Teste do micronúcleo *in vivo*

3.6.9.5.1. Princípio do teste

Micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos compostos de material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo mitótico, dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos cromossômicos. Mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não ser unido ao fuso), este também pode ser considerado um micronúcleo. Os micronúcleos, então, são, estruturalmente, pequenos núcleos representados por material genético que foi perdido pelo núcleo principal como consequência de um dano genético. Este dano pode ser causado por agentes químicos, físicos ou biológicos, capazes de interferir

no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam introduzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos). O teste de micronúcleo, portanto, detecta genotoxicidade cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese e danos ao fuso mitótico (SILVA *et al.*, 2003a).

O teste de MN em organismo sob exposição aguda, menos de quatro semanas, é realizado em eritrócitos jovens, denominados policromatófitos (EPC) que por conterem RNA ribossomal se cora de forma diferenciada. A análise por ser muito simples apresenta vantagem em relação à análise dos cromossomos. Os micronúcleos podem ser identificados em qualquer tipo de célula. Pode-se avaliar micronúcleos para diagnóstico de doenças hematológicas em células epiteliais da mucosa bucal, do trato urinário, e também monitorar ambientes através de teste em roedores, plantas e peixes (SILVA *et al.*, 2003a).

3.6.9.5.2. Procedimento experimental

O efeito genotóxico *in vivo* da piplartina foi avaliado em medula óssea de camundongos. Os animais foram expostos à substância teste por via intraperitoneal, em uma única administração, e sacrificados nos tempos de 24 e 48 horas após o tratamento para a retirada da medula óssea dos camundongos. O etileno metano sulfonato (EMS) foi utilizado com controle positivo na dose de 200 mg/kg. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 10%) utilizado para diluir a substância. O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará.

Os animais foram tratados com piplartina nas doses (50 mg/kg e 100 mg/kg) previamente determinadas (BEZERRA *et al.*, 2006). Após 24 ou 48 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento servicial. Uma amostra do material de medula óssea foi coletada dos fêmures, em uma pequena quantidade (3 mL) de soro bovino fetal. As preparações celulares foram coradas (duas lâminas de cada animal), adequadamente com Leishman, e analisadas para a presença de micronúcleos. Foi utilizado um grupo controle para cada tempo de amostragem (SCHMID, 1975; OECD, 1997).

3.6.9.5.3. Análise dos dados

Todas as lâminas, incluindo aqueles do controle positivo e negativo, foram codificadas antes da análise. A proporção de eritrócitos policromáticos (PCE) dentre o total de eritrócitos normocromáticos (PCE + NCE) foi determinada pela contagem de 1000 eritrócitos (PCE + NCE) por animal. Para avaliação de células micronucleadas, foram analisados de 2000 PCE por animal.

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n animais. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0. A substância foi considerada genotóxica neste ensaio quando apresentou um aumento, estatisticamente significativo, de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCM) de maneira dose resposta em pelo menos um dos tempos analisados, quando comparado ao grupo controle negativo (LI *et al.*, 2007).

3.6.10. Estudo farmacocinético

Dentre o estudo farmacocinético, foi estudada a cinética de absorção da piplartina após uma única dose de 50 mg/kg em ratos. Inicialmente a metodologia bioanalítica de detecção da piplartina em plasma de ratos foi desenvolvida e validada.

3.6.10.1. Desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica

A metodologia bioanalítica de detecção da piplartina em plasma de ratos foi desenvolvida e validada para demonstrar que o método analítico descrito é adequado e confiável para as análises propostas. Na validação da metodologia

foram analisados os seguintes critérios: especificidade, recuperação, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade.

3.6.10.1.1. Condições cromatográficas e detecção no espectrômetro de massas no modo MS/MS

As análises por HPLC foram conduzidas em um cromatógrafo (Shimadzu) composto de duas bombas modelo LC10AD, um controle de sistema SLC 10A, uma coluna CTO-10AS, um injetor *Rheodyne* modelo 7125 com um *loop* de 20 μ L, uma coluna analítica (coluna NST 18, 5 μ m, 250 mm x 4,6 mm) e uma pré-coluna (coluna CN Lichrospher 100, 5 μ m, 4 mm x 4 mm). A fase móvel foi constituída por acetonitrila: água (70:30, v/v) adicionada de 0,2% de ácido acético (preparada diariamente e degaseificada com gás hélio) a temperatura ambiente (22° C). A corrida cromatográfica foi programada para operar com fluxo de 1 mL/min com um tempo total de corrida de 5 min.

A espectrometria de massas (*mass spectrometry* - MS) foi executada utilizando-se um aparelho do tipo triplo quadrupolo modelo Quattro LC equipado com uma interface de ionização de pressão atmosférica com *Z-electrospray* operando em íon positivo e calibrado com iodeto de sódio/iodeto de cézio. A temperatura da fonte foi de 100 °C e dessolvatação de 250 °C. O nitrogênio foi usado para secagem e nebulização e o argônio foi utilizado como gás de colisão.

As condições para a otimização do MS/MS foi determinada pela injeção direta da solução padrão (10 μ g/mL) do analito (piplartina) e do padrão interno (carbamazepina - A escolha do padrão interno deu-se através da análise de sua estrutura química, bem como da estabilidade deste em fluidos biológicos) dissolvidos na fase móvel e introduzidos com uma bomba de infusão com um fluxo de 20 μ L/min. Os valores de voltagem do cone e energia de colisão foram, respectivamente: 15 V e 10 eV para a piplartina e 20 V e 20 eV para a carbamazepina. A detecção ocorreu com interface de *electrospray* operado no modo positivo (ES+) e programado para monitorar múltiplas reações (MRM). Íons protonados e seus respectivos produtos foram monitorados pelas seguintes massas:

317,42 > 220,90 *m/z* para monitoramento da piplartina e 236,40 > 193,83 *m/z* para o monitoramento da carbamazepina (figuras 11 e 12).

A quantificação foi realizada por MRM dos íons protonados e seus respectivos produtos, utilizado uma metodologia com padronização interna, onde se utilizam as razões entre as áreas dos picos referentes ao analito (piplartina) e as áreas do padrão interno (carbamazepina).

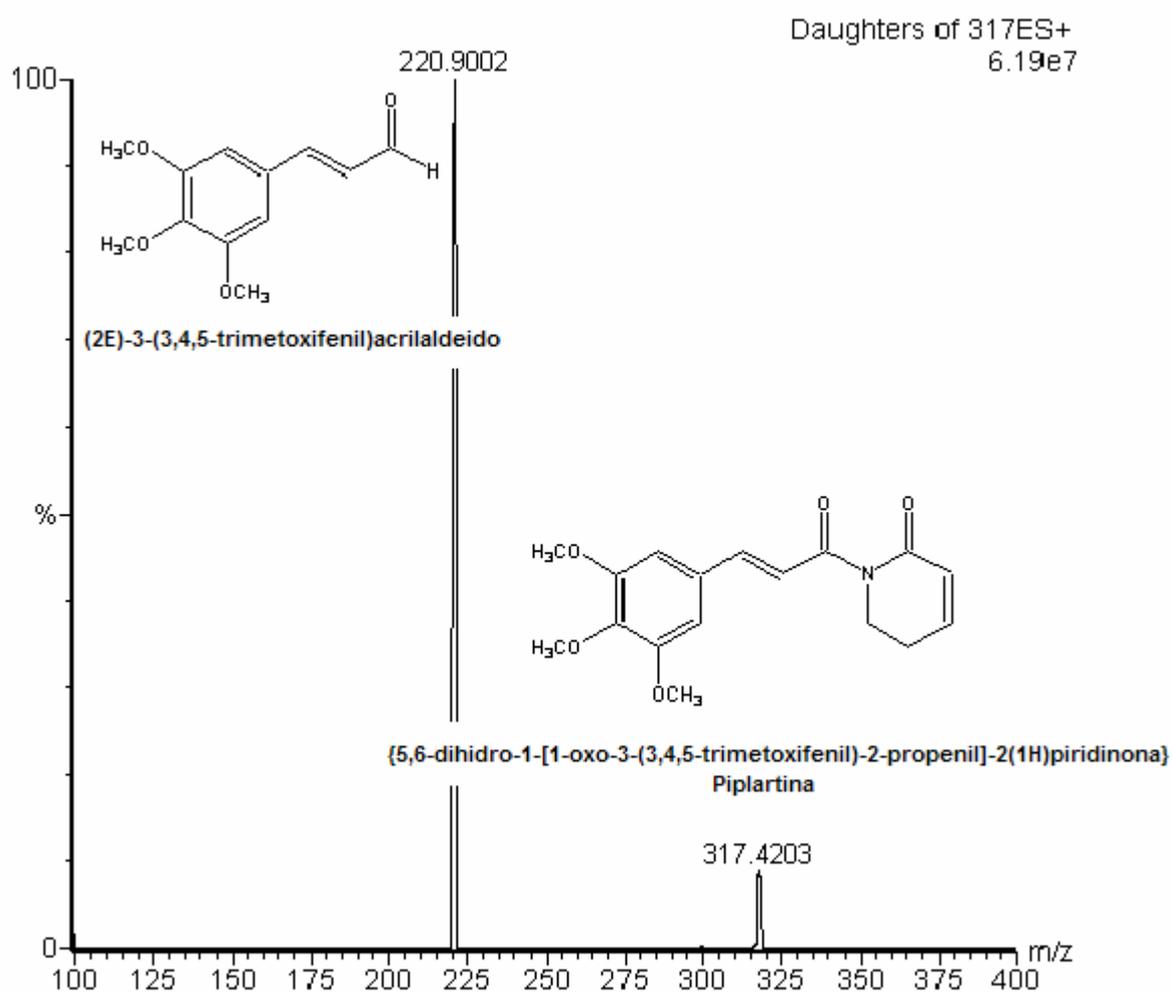


Figura 11 - Espectrometria de massas da piplartina no modo MS/MS operando em íon positivo.

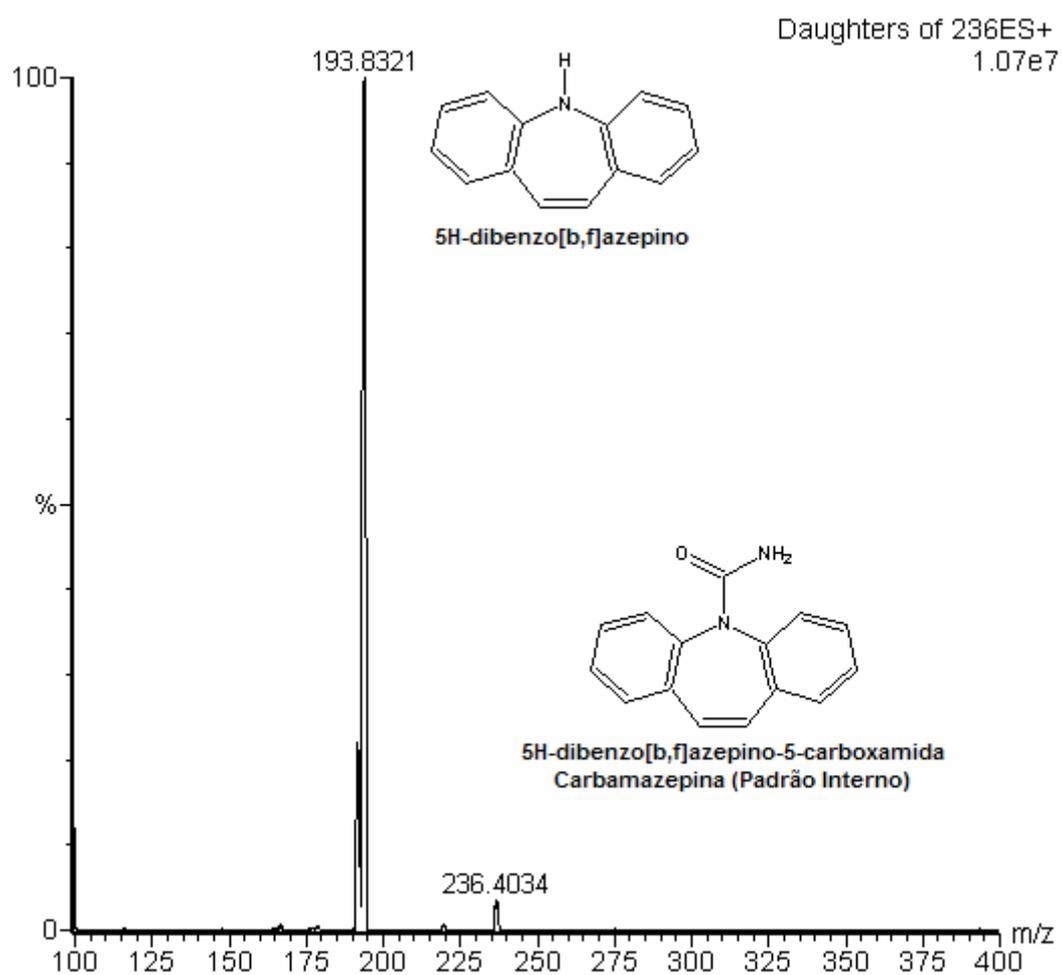


Figura 12 - Espectrometria de massas da carbamazepina no modo MS/MS operando em íon positivo.

3.6.10.1.2. Preparações das soluções-padrão da curva de calibração e do controle de qualidade

Todas as soluções-padrão foram preparadas em metanol, utilizando balões e pipetas volumétricas calibradas, e armazenadas em frascos de vidro âmbar, rotulados, hermeticamente fechados e acondicionados em refrigerador a -20 °C.

As soluções-padrão de piplartina utilizadas na curva de calibração e no controle de qualidade, nas concentrações de 16 ng/mL, 80 ng/mL, 160 ng/mL, 400 ng/mL, 800 ng/mL, 2.000 ng/mL, 5.000 ng/mL, 10.000 ng/mL e 20.000 ng/mL, foram preparadas a partir de diluições seriadas da solução-padrão estoque preparada na concentração de 1 mg/mL. A partir desta solução, foram feitas diluições com *pool* de plasma branco, previamente centrifugado, para o preparo dos padrões da curva de calibração nas seguintes concentrações: 2 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 250 ng/mL, 625 ng/mL, 1.250 ng/mL e 2.500 ng/mL (tabela 5). A partir desta solução, também foram feitas diluições com *pool* de plasma branco, previamente centrifugado, para o preparo dos padrões do controle de qualidade nas seguintes concentrações: 20 ng/mL (**controle de qualidade baixo**), 625 ng/mL (**controle de qualidade médio**) e 1.250 ng/mL (**controle de qualidade alto**) (tabela 6).

A solução-padrão de carbamazepina (padrão interno), na concentração de 5000 ng/mL, também foi preparada a partir de diluições seriadas da solução-padrão estoque preparada na concentração de 1 mg/mL. Em todas as amostras, exceto no plasma branco, foram adicionadas 25 µL da solução-padrão do padrão interno, na concentração de 5000 ng/mL, em 0,2 mL de plasma de rato para obter um concentração plasmática de 125 ng/mL.

Tabela 5 – Preparo das amostras para a curva de calibração da piplartina.

Amostra	Concentração da solução-padrão (ng/mL)	Volume pipetado da solução-padrão (µL)	Volume de plasma (mL)	Concentração no plasma (ng/mL)
Branco	-	-	-	-
Piplartina	16	25	0,2	2
Piplartina	80	25	0,2	10
Piplartina	160	25	0,2	20
Piplartina	400	25	0,2	50
Piplartina	800	25	0,2	100
Piplartina	2.000	25	0,2	250
Piplartina	5.000	25	0,2	625
Piplartina	10.000	25	0,2	1.250
Piplartina	20.000	25	0,2	2.500

Tabela 6 – Preparo das amostras para controle de qualidade (baixo, médio e alto) da piplartina.

Amostra	Concentração da solução-padrão (ng/mL)	Volume pipetado da solução-padrão (µL)	Volume de plasma (mL)	Concentração no plasma (ng/mL)
Controle de Qualidade (Baixo)	160	25	0,2	20
Controle de Qualidade (Médio)	5.000	25	0,2	625
Controle de Qualidade (Alto)	10.000	25	0,2	1250

3.6.10.1.3. Procedimento de extração do analito do plasma de ratos

As amostras foram analisadas após extração líquido-líquido do analito do plasma de ratos (figura 13). Alíquotas de 0,2 mL de plasma de rato, 25 µL da solução-padrão (5 µg/mL, resultando em uma concentração plasmática de 125 ng/mL) e 1 mL de tolueno foram adicionados para extração em tubos âmbar e submetidos à agitação mecânica horizontal (200 rpm) por 30 minutos a temperatura ambiente (22 ± 2 ° C). As amostras foram centrifugadas a 2000 G por 10 minutos a temperatura ambiente. A fase orgânica foi coletada e evaporada sob fluxo de ar comprimido. O resíduo foi dissolvido em 50 µL de fase móvel e agitado em vórtex por 20 segundos. Uma alíquota de 20 µL foi injetada na coluna para ser analisado.

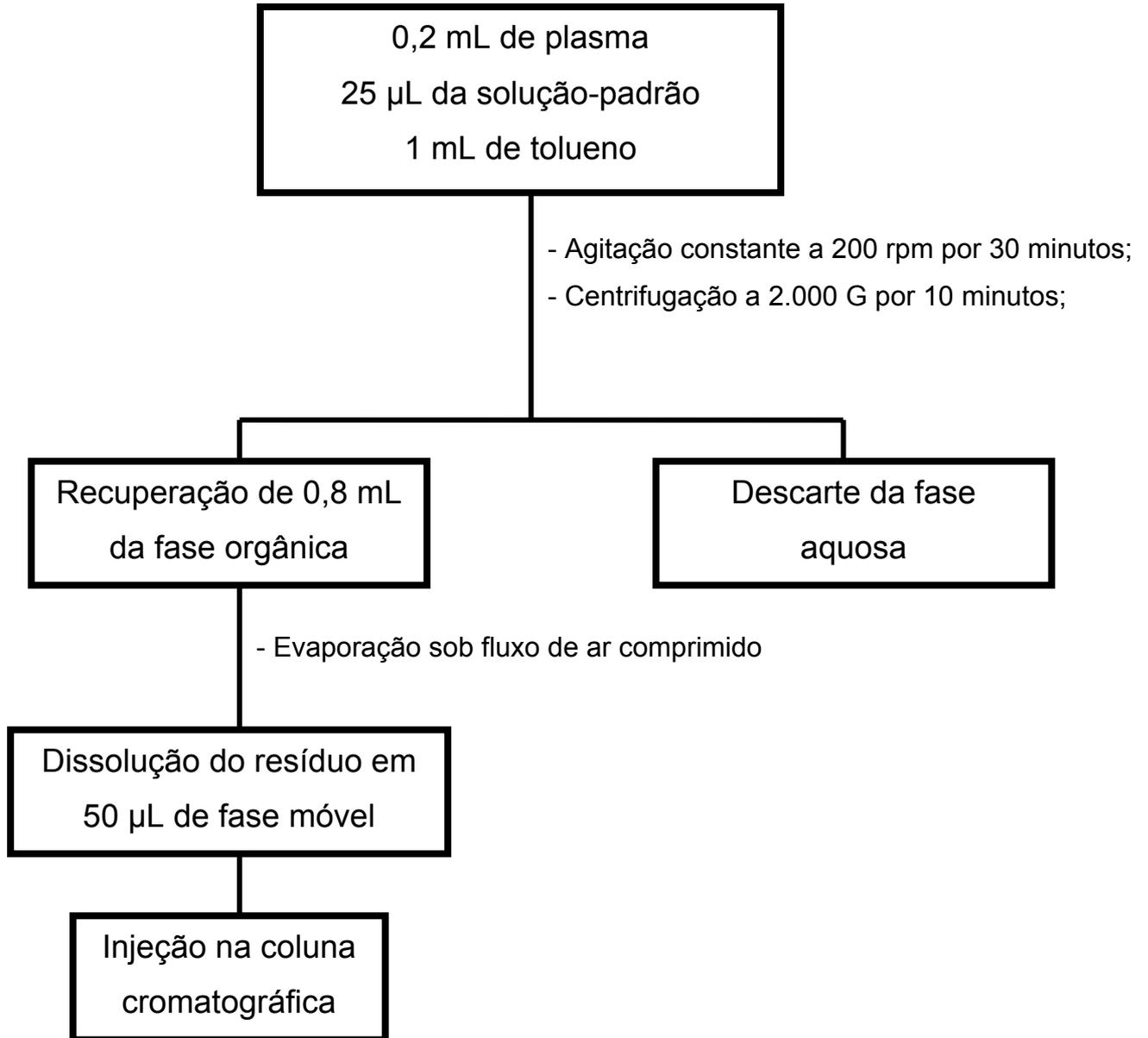


Figura 13 – Procedimento de preparação das amostras de plasma de ratos empregando a extração líquido-líquido.

3.6.10.1.4. Validação do método

3.6.10.1.4.1. Especificidade

3.6.10.1.4.1.1. Princípio do teste

Especificidade é a capacidade de um método analítico em diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes na amostra denominados interferentes. Os interferentes podem ser originários de fontes endógenas (metabólitos e/ou precursores; produtos de degradação do fármaco; co-administração de fármacos, vitaminas e/ou seus metabólitos, produtos de interação de fármaco, componente biológico e outras substâncias que ocorrem naturalmente em fluidos biológicos, isto é, hormônios, proteínas, lipídios, substâncias dietéticas, etc) e/ou exógenas (impurezas dos reagentes usados, substâncias liberadas pelos recipientes em uso ou resultantes de lavagem inadequadas de vidrarias, equipamentos e instrumentos) (BRESSOLE *et al.*, 1996; CAUSON, 1997; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; BRASIL, 2003).

3.6.10.1.4.1.2. Procedimento experimental

Para testar a especificidade, diferentes brancos (amostras sem o fármaco ou padrão interno) de plasma de ratos foram testados nas condições descritas para o método analítico.

3.6.10.1.4.1.3. Análise dos dados

A análise dos dados deu-se pela comparação das amostras de plasma de ratos branco com as soluções-padrão do fármaco com concentrações próximas ao limite de quantificação.

3.6.10.1.4.2. Recuperação

3.6.10.1.4.2.1. Princípio do teste

A recuperação é a medida da eficiência de um método em extrair todos os analíticos de interesse presentes na amostra original. Porcentagens próximas a 100% são desejáveis, porém admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (BRESSOLE *et al.*, 1996; CAUSON, 1997; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; BRASIL, 2003).

3.6.10.1.4.2.2. Procedimento experimental

Tal parâmetro foi determinado analisando amostras (controles de qualidade baixo, médio e alto) de plasma adicionadas de padrão de piplartina e padrão interno, submetidos a processo de extração e as mesmas amostras preparadas em solução e não submetidas a esse processo de extração.

3.6.10.1.4.2.3. Análise dos dados

O cálculo da recuperação do fármaco foi feito comparando-se as áreas dos picos da piplartina (controles de qualidade baixo, médio e alto) das amostras extraídas do plasma com as áreas dos picos da piplartina preparados em solução (solução não extraída). O cálculo da recuperação do padrão interno foi feito de maneira semelhante.

3.6.10.1.4.3. Determinação do limite de quantificação

3.6.10.1.4.3.1. Princípio do teste

O limite de quantificação representa a menor concentração que pode ser determinada, distinguindo-se do ruído, com exatidão e precisão aceitáveis (BRESSOLE *et al.*, 1996; CAUSON, 1997; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; BRASIL, 2003).

3.6.10.1.4.3.2. Procedimento experimental

Para a determinação do limite de quantificação, foram feitas análises da matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis, em cinco repetições. Com isto, tentou-se assegurar que os menores valores possíveis fossem analisados, por meio de repetições de análises, com valores sucessivamente menores, quando os inicialmente escolhidos fossem quantificados com precisão e exatidão aceitáveis.

3.6.10.1.4.3.3. Análise dos dados

Foi considerado o valor para o limite de quantificação a concentração com mínima com exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão, com coeficiente de variação de, no máximo, 20 %.

3.6.10.1.4.4. Linearidade

3.6.10.1.4.4.1. Princípio do teste

A linearidade, representada pela curva de calibração, indica a relação entre a concentração do analito e a resposta do método. O método de regressão linear dos mínimos quadrados normalmente é utilizado para definir matematicamente a curva de calibração. Em geral, um fator de peso ($1/X$ ou $1/x^2$) é usado para evitar a

inclinação da curva de calibração em favor das concentrações mais elevadas (BRESSOLE *et al.*, 1996; CAUSON, 1997; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; BRASIL, 2003).

3.6.10.1.4.4.2. Procedimento experimental

Para a determinação da curva de calibração analisaram-se amostras extraídas da matriz biológica em seis concentrações variadas. A curva de calibração incluiu a análise da amostra branca (matriz biológica isenta de padrão interno e do padrão do fármaco) e mais seis amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno contemplando o limite de variação esperado. As amostras contendo padrão do fármaco e o padrão interno foram analisados em duplicata. As concentrações dos padrões foram definidas em testes preliminares, incluindo a primeira quantificação de amostras, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas. A linearidade da curva de calibração foi avaliada dentro dos seguintes critérios: Desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal do limite de quantificação, em pelo menos duas das triplicatas; Desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração, em pelo menos duas das triplicatas; No mínimo 4 de 6 concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios descritos, incluindo o limite de quantificação e a maior concentração da curva de calibração; O coeficiente de correlação é aceito quando foi igual ou maior do que 0,98.

3.6.10.1.4.4.3. Análise dos dados

Estabeleceu-se correlação linear entre o inverso da concentração, considerada variável independente ($1/X$) e a área sob o pico do sinal cromatográfico, considerando variáveis dependentes. A análise foi realizada automaticamente utilizando o programa MassLynx software 3.5 (Waters®).

3.6.10.1.4.5. Precisão

3.6.10.1.4.5.1. Princípio do teste

A precisão (repetibilidade) de um método bioanalítico consiste na medida do erro aleatório. É definida como a concordância entre várias medidas da mesma amostra, sendo expressa como coeficiente de variação (C.V.%) dessas medidas. A precisão intra-ensaio refere-se ao coeficiente de variação obtido por repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, em um curto intervalo de tempo (no mesmo dia, por exemplo). A precisão inter-ensaio é obtida por meio de alterações de condições, como mudança de analista, reagentes ou equipamentos, ou pela utilização do método durante várias semanas ou meses. O coeficiente de variação não deve exceder valores superiores a 15 %, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20% (BRESSOLE *et al.*, 1996; CAUSON, 1997; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; BRASIL, 2003).

3.6.10.1.4.5.2. Procedimento experimental

Este parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações e cinco réplicas no mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em cinco réplicas por dia durante três dias consecutivos (precisão inter-ensaio).

3.6.10.1.4.5.3. Análise dos dados

O cálculo da precisão foi realizado segundo a equação abaixo:

$$\text{C.V. (\%)} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100,$$

Onde: C.V. = coeficiente de variação; DP = desvio padrão; e CMD = concentração média determinada.

3.6.10.1.4.6. Exatidão

3.6.10.1.4.6.1. Princípio do teste

A exatidão (reprodutibilidade) de um método bioanalítico é uma medida do erro sistemático definida como a concordância entre o valor medido e o valor real. O valor da exatidão para as amostras não deve exceder $\pm 15\%$ do valor nominal e para o limite de quantificação admitiu-se desvios menores ou iguais a 20% (BRESSOLE *et al.*, 1996; CAUSON, 1997; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; BRASIL, 2003).

3.6.10.1.4.6.2. Procedimento experimental

Este parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações e cinco réplicas no mesmo dia (exatidão intra-ensaio) e em cinco réplicas por dia durante três dias consecutivos (exatidão inter-ensaio).

3.6.10.1.4.6.3. Análise dos dados

O cálculo da exatidão foi realizado segundo a equação abaixo:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{CMD}}{\text{CT}} \times 100,$$

Onde: CMD = concentração média determinada; e CT = concentração teórica.

3.6.10.1.4.7. Estabilidade

3.6.10.1.4.7.1. Princípio do teste

Os dados de estabilidade são necessários para mostrar que a concentração do analito no momento da análise corresponde á sua concentração no momento da coleta. Foram avaliadas a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento e a estabilidade de curta duração (BRESSOLE *et al.*, 1996; CAUSON, 1997; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; BRASIL, 2003).

3.6.10.1.4.7.2. Procedimento experimental

Na determinação da estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, foram utilizadas triplicatas de amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações diferentes, submetidas as seguintes condições: congelamento a -20 °C por 24 horas, descongelamento e recongelamento por mais 12 horas e assim sucessivamente até completar três ciclos.

Na determinação da estabilidade de curta duração, foram utilizadas triplicatas de amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações diferentes, mantidas a temperatura ambiente (± 22 °C) durante 4 horas.

3.6.10.1.4.7.3. Análise dos dados

A concentração do fármaco nas amostras de plasma de controle de qualidade foi determinada após os ciclos de congelamento e descongelamento e após as 4 horas a temperatura ambiente (± 22 °C) e os resultados obtidos foram comparados com os resultados de amostras recém-preparadas e analisadas imediatamente após o preparo. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por Student's t-test com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

Este estudo de desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica para a quantificação da piplartina em plasma de ratos foi realizado na Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, sob a orientação do professor Dr. Norberto Peporine Lopes, da professora Dr^a Pierina Sueli Bonato e da Dr^a Valquíria Aparecida Polisel Jabor.

3.6.10.2. Estudo de disposição cinética da piplartina

3.6.10.2.1. Princípio do teste

Em um estudo de disposição cinética é avaliada a absorção de um fármaco após sua administração. O conhecimento da farmacocinética de um fármaco, neste caso, o comportamento deste em relação à absorção, fornece subsídios para melhores condições de aplicações deste.

3.6.10.2.2. Procedimento experimental

Foram coletadas amostras de aproximadamente 4 mL de sangue de ratos conscientes, através do plexo orbital, em tubo heparinizados a 0; 0,083; 0,166; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 6; 12 e 24 horas ($n = 3$ para cada tempo de coleta) após uma única administração da piplartina (50 mg/kg) por via intraperitoneal, dissolvido em DMSO 10%. As amostras foram centrifugadas (2.000 G por 10 minutos) e o plasma, acondicionado em duplicatas, foi congelado a - 20 °C, em freezer, e sob proteção da luz até a realização do ensaio para quantificação do fármaco. A dose utilizada da piplartina neste estudo foi previamente determinada (BEZERRA *et al.*, 2006). O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará.

A quantificação das amostras de plasma foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.6.11.1. As amostras de plasma dos ratos que receberam piplartina foram analisadas paralelamente à curva de calibração com sete pontos e amostras em triplicatas de controle de qualidade em três diferentes concentrações (alta, média e baixa). A análise das amostras de controle de qualidade concomitante a amostra de plasma dos ratos é uma garantia da qualidade e da estabilidade das mesmas durante o procedimento analítico empregado.

Os parâmetros farmacocinéticos (tabela 7) tais como área sob a curva do tempo zero a 24 horas (ASC_{0-24}), área sob a curva do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$), concentração máxima atingida (C_{max}), clearance total (Cl), constante de eliminação (K_{el}), meia vida plasmática ($t_{1/2}$), o tempo correspondente à concentração máxima do fármaco atingida no plasma (T_{max}) e o volume de distribuição (Vd) foram calculados.

Este estudo de disposição cinética da piplartina foi realizado na Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, sob a orientação do professor Dr^o Norberto Peporine Lopes, da professora Dr^a Pierina Sueli Bonato e da Dr^a Valquíria Aparecida Polisel Jabor.

3.6.10.2.3. Análise dos dados

A determinação das concentrações plasmáticas da piplartina foi obtida através da análise da curva de calibração e das amostras de plasmas coletadas, realizado automaticamente utilizando o programa MassLynx software 3.5 (Waters®). Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos através do método dos trapezóides.

Tabela 7 - Parâmetros farmacocinéticos avaliados.

Símbolo	Descrição
AUC_{0-24h}	Área sob a curva de concentração do fármaco <i>versus</i> tempo, do tempo 0 (zero) ao tempo 24h. Relaciona-se com a quantidade ou extensão de absorção do fármaco. A quantidade da absorção sistêmica do fármaco é diretamente relacionada com AUC que é calculada pelo método trapezoidal e expresso em unidades de concentração vezes tempo.
AUC_{0-∞}	Área sob a curva de concentração do fármaco <i>versus</i> tempo, do tempo 0 (zero) ao infinito.
C_{max}	Concentração máxima atingida no plasma. Concentração mais elevada do fármaco atingida na circulação sanguínea após administração de um fármaco. Relaciona-se a intensidade da resposta farmacológica. Este é obtido diretamente dos dados.
Cl	Estimativa do clearance total.
K_{el}	Constante de eliminação K, representa a soma de todas as taxas constantes para remoção do fármaco do corpo, incluindo a taxa constante da excreção renal e metabolismo (biotransformação) como descrito através da equação: $K_{el} = K_e + K_m$, onde K_e = constante de excreção renal e K_m = constante de metabolismo. Determina a taxa de eliminação do fármaco dos vasos sanguíneos. Serve para determinar a concentração do fármaco em um tempo t. É inversamente relacionada á meia vida do fármaco: $K_{el} = 0,693/t_{1/2}$.
t_{1/2}	Meia vida de eliminação do fármaco. Representa o tempo em que a concentração do fármaco no plasma é reduzida à metade. Este é obtido diretamente dos dados.
T_{max}	Tempo correspondente à concentração máxima do fármaco atingida no plasma.
Vd	Estimativa do volume de distribuição.

3.6.11. Avaliação da associação do 5-Fluourouracil com a piplartina

Na avaliação da associação do 5-Fluourouracil com a piplartina, foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo*. O efeito da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina foi avaliado *in vitro* sobre a proliferação de células tumorais humana. Os efeitos dos tratamentos com a piplartina (50 mg/kg/dia), o 5-FU (10 mg/kg/dia) ou a associação do 5-FU (10 mg/kg/dia) com a piplartina (50 mg/kg/dia) foram avaliados em camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180. Adicionalmente, análises histopatológicas, bioquímicas e hematológicas foram realizadas com o intuito de avaliar efeitos tóxicos causados pelo tratamento dos animais com os compostos.

3.6.11.1. Avaliação da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina sobre a proliferação de células tumorais humanas *in vitro*

3.6.11.1.1. Princípio do teste

A avaliação da associação do 5-FU com a piplartina sobre a proliferação celular foi realizada em células tumorais humanas (HL-60 - leucemia promielocítica, HCT-8 – carcinoma de cólon, SF-295 – glioblastoma e MDA-MB-435 – melanoma) através do método do MTT após 72 horas de incubação. Ver item **3.6.7.1.1.**

3.6.11.1.2. Procedimento experimental

A citotoxicidade do 5-FU foi avaliada na presença e na ausência da piplartina (5 µM). A análise foi realizada de acordo com o item **3.6.7.1.2.**

3.6.11.1.3. Análise dos dados

As substâncias foram testadas em diluições seriadas, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos erros padrão da média obtidos a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.6.11.2. Avaliação da associação do 5-Fluourouracil com a piplartina em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180

3.6.11.2.1. Princípio do teste

Na quimioterapia do câncer, fármacos antineoplásicas são freqüentemente usadas em combinação. Este tipo de tratamento (poliquimioterapia) 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. Com esse intuito foi avaliado o efeito da associação do 5-FU com piplartina em camundongos transplantados com Sarcoma 180.

O sarcoma 180, ou tumor de Crocker, é um tumor indiferenciado que foi descrito pela primeira vez em camundongos em 1914. Este tumor foi encontrado na região axilar direita e diagnosticado na época como carcinoma, mas o tecido de origem não foi especificado, de forma que não se sabe se era uma neoplasia cutânea ou mamária. Estudos posteriores demonstraram que suas células não produzem laminina, o que não permite sua caracterização como de origem epitelial. O tumor invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos (STEWART *et al.*, 1959). O Sarcoma 180 pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90 a 100% dos animais inoculados, havendo uma taxa de regressão natural de 8 a 10% (ZUCKERBERG, 1973). Apesar de seu comportamento agressivo local, esse tumor não desenvolve metástases (KURASHIGE & MITSUHASHI, 1982).

O Sarcoma 180 tem sido utilizado no estudo da ação de componentes químicos, físicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia,

citogenética e terapêutica de células tumorais. A vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais, recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo (STEWART *et al.*, 1959).

3.6.11.2.2. 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 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células (BEZERRA *et al.*, 2006).

Nos animais receptores, foram injetadas 2×10^6 céls/0,5 mL na região axilar esquerda dos camundongos (*Mus musculus* Swiss). Nesse experimento, foram utilizados 20 animais por grupos, sendo todas fêmeas, apresentando massa corpórea variando entre 25-30 g, os quais foram 10 animais de cada grupo foram inoculados com tumor Sarcoma 180 os outros 10 animais de cada grupo foram utilizados para o estudo toxicológico. Em seguida, 24 h após a inoculação do tumor foi iniciado o tratamento durante 7 dias consecutivos de acordo com os grupos abaixo:

Grupo I — Tratados com o veículo (DMSO 10%) utilizado para diluir as substâncias (grupo controle negativo);

Grupo II – Tratados com 5-fluourouracil 10 mg/kg/dia;

Grupo III – Tratados com piplartina 50 mg/kg/dia;

Grupo IV – Tratados com 5-Fluourouracil 10 mg/kg/dia associado com piplartina 50 mg/kg/dia.

Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal. As doses utilizadas neste estudo foram previamente determinadas (BEZERRA *et al.*, 2006). Vinte quatro

horas após o término do tratamento, os animais foram anestesiados e seu sangue periférico foi coletado através do plexo orbital, em tubos heparinizados, para análises bioquímicas e hematológicas. Em seguida, os animais foram sacrificados, sendo retirados os tumores, rins, fígados e baços para pesagem, análise histopatológica. Todos os animais foram pesados no início e no final do tratamento. O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará.

3.6.11.2.3. Análise dos dados

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 e **B** = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de *n* experimentos. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.6.11.3. Parâmetros toxicológicos avaliados

3.6.11.3.1. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

3.6.11.3.1.1. Princípio do teste

Dentre os parâmetros bioquímicos, foram avaliados testes de dano hepático e testes de função renal.

A alanina transaminase (ALT), também chamada transaminase glutâmica pirúvica sérica (SGPT ou TGP) ou alanina aminotransferase (ALAT), é uma enzima presente nos hepatócitos (células do fígado). Quando uma célula é danificada, ela libera esta enzima no sangue, onde é medida. A ALT aumenta drasticamente em lesões hepáticas agudas. A aspartato transaminase (AST), também chamada de transaminase glutâmica oxalacética sérica (SGOT ou TGO) ou aspartato aminotransferase (ASAT), é similar à ALT de modo que é outra enzima associada às células parenquimais do fígado. Está aumentada na lesão hepática aguda, mas também está presente nas hemácias e músculos esqueléticos e cardíacos, não sendo então uma enzima específica do fígado (GAW *et al.*, 2004).

Como parâmetro da função renal, foi avaliado a concentração de uréia plasmática. A uréia é uma substância que provém dos alimentos que contém proteínas como, por exemplo, os alimentos de origem animal (carne, ovos), e que devem ser quase totalmente eliminada do organismo através da urina. Quando os rins estão com a sua função de filtração prejudicada, a uréia fica acumulada no sangue, provocando alterações em vários órgãos, estabelecendo a uremia. Entretanto, a concentração sérica de uréia não é tão precisa como medida da função glomerular. A ingestão de proteínas na dieta afeta a concentração de uréia plasmática. O sangramento gastrointestinal fará com que a uréia do plasma esteja elevada. E ainda, a uréia é reabsorvida pelos túbulos (GAW *et al.*, 2004).

3.6.11.3.1.2. Procedimento experimental

Para avaliar os parâmetros bioquímicos, sangue periférico foi coletado através do plexo orbital, em tubos heparinizados, onde o plasma foi utilizado para avaliar a função renal e danos hepáticos. Para investigação de dano hepático foram determinados os níveis séricos das transaminases: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Para tanto, utilizaram-se kits da LABTEST[®] sistemas para diagnóstico, seguindo-se metodologia descrita pelo fabricante. A função renal foi avaliada pelo parâmetro sérico clássico da integridade renal: a uréia. Para tanto, também se utilizou o kit da LABTEST[®] sistemas para diagnóstico, seguindo-se metodologia descrita pelo fabricante.

3.6.11.3.1.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n animais. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.6.11.3.2. Avaliação dos parâmetros hematológicos

3.6.11.3.2.1. Princípio do teste

A análise dos parâmetros hematológicos consta de uma série de provas que possibilitam detectar anormalidades que se apresentam em certos fenômenos fisiopatológicos importantes nos animais e nos homens e que se refletem no sangue (LORENZI, 2006).

3.6.11.3.2.2. Procedimento experimental

Foram realizadas as seguintes provas hematológicas: dosagem de hemoglobina, contagem de plaquetas e leucócitos realizada em hematocítmetro. A contagem diferencial leucocitária foi realizada por meio de esfregaços sanguíneos e foram determinados valores relativos e absolutos de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos.

3.6.11.3.2.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n animais. Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os

dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

Estes estudos dos parâmetros bioquímicos e hematológicos da piplartina foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Bioquímica, sob a orientação da professora Dr^a Nylane Maria Nunes Alencar.

3.6.11.3.3. Análise histopatológica

3.6.11.3.3.1. Princípio do teste

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 tóxicos causados pelo fármaco.

3.6.11.3.3.2. 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 e eosina.

3.6.11.3.3.3. 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).

Este estudo histopatológico da piplartina foi realizado no Laboratório de Patológica Bucal, sob a orientação da professora Dr^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

Resultados

4. Resultados

4.1. Estudo da atividade citotóxica

O estudo da atividade citotóxica da piplartina e seus análogos foi realizado em células humana tumorais. Adicionalmente, a atividade citotóxica da piplartina foi avaliada em células humana normais.

4.1.1. Avaliação da atividade citotóxica da piplartina e seus análogos em células tumorais humana

A tabela 8 apresenta os resultados encontrados no ensaio de citotóxico da piplartina e seus análogos, em células tumorais humana. A piplartina apresentou citotoxicidade em todas as linhagens tumorais testadas, com valores de CI_{50} que variaram de 0,33 $\mu\text{g/mL}$ (1,04 μM) a 0,96 $\mu\text{g/mL}$ (3,03 μM) para as linhagens de HL-60 e MDA-MB-435, respectivamente. A doxorubicina, usada como controle positivo, também apresentou citotoxicidade em todas as linhagens tumorais testadas, com valores de CI_{50} que variaram de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ (0,02 μM) a 0,48 $\mu\text{g/mL}$ (0,88 μM) para as linhagens de HCT-8 e MDA-MB-435, respectivamente. Entretanto, nenhuns dos análogos (**30-34**) da piplartina apresentaram atividade citotóxica nas linhagens de células tumorais testadas (valores de $CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$). Para este ensaio, foram consideradas citotóxicas aquelas substâncias que apresentaram $CI_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ ou 1 μM (PESSOA *et al.*, 2000; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2008).

Tabela 8 – Atividade citotóxica da piplartina e seus análogos em linhagens de células tumorais humana. A doxorrubicina foi usada como controle positivo.

Substâncias	Linhagem celular			
	HL-60	HCT-8	SF-295	MDA-MB-435
	CI ₅₀ [µg/mL]	CI ₅₀ [µg/mL]	CI ₅₀ [µg/mL]	CI ₅₀ [µg/mL]
	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)
Piplartina	0,33 (1,04)	0,38 (1,20)	0,83 (2,62)	0,96 (3,03)
	0,19 – 0,58	0,29 - 0,49	0,65 – 1,06	0,81 – 1,15
(30)	>25 (77,88)	>25 (77,88)	>25 (77,88)	>25 (77,88)
(31)	>25 (93,63)	>25 (93,63)	>25 (93,63)	>25 (93,63)
(32)	>25 (88,64)	>25 (88,64)	>25 (88,64)	>25 (88,64)
(33)	>25 (105,04)	>25 (105,04)	>25 (105,04)	>25 (105,04)
(34)	>25 (75,75)	>25 (75,75)	>25 (75,75)	>25 (75,75)
Doxorrubicina	0,02 (0,04)	0,01 (0,02)	0,24 (0,44)	0,48 (0,88)
	0,01 – 0,03	0,01 – 0,02	0,17 – 0,36	0,34 – 0,66

A tabela apresenta os valores de CI₅₀ e o intervalo de confiança de 95% de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do MTT após 72 horas de exposição com as células HL-60 (leucemia promielocítica), HCT-8 (côlon), SF-295 (glioblastoma) e MDA-MB-435 (melanoma) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

4.1.2. Avaliação da atividade citotóxica da piplartina em células normais humana

A tabela 9 apresenta os resultados encontrados no ensaio de citotoxicidade da piplartina, em células normais humana. Quando a atividade citotóxica da piplartina foi avaliada em células humana normais (PBMC), o valor de CI_{50} encontrado foi de 14,34 $\mu\text{g/mL}$ (45,24 μM). Assim, a piplartina apresenta um índice de seletividade de aproximadamente 45 vezes em relação à linhagem leucêmica HL-60. A doxorubicina, usada como controle positivo, apresentou um valor de IC_{50} de 0,97 $\mu\text{g/mL}$ (1,78 μM), para PBMC. O índice de seletividade da doxorubicina foi de aproximadamente 50 vezes em relação à linhagem leucêmica HL-60.

Tabela 9 – Atividade citotóxica da piplartina em células humanas normais. A doxorubicina foi usada como controle positivo.

Substância	PBMC	HL-60	Índice de seletividade
	CI ₅₀ [µg/mL] (µM)	CI ₅₀ [µg/mL] (µM)	
Piplartina	14,34 (45,24)	0,33 (1,04)	45
	11,05 - 18,60	0,19 – 0,58	
Doxorrubicina	0,97 (1,78)	0,02 (0,04)	50
	0,52 - 1,80	0,01 – 0,03	

A tabela apresenta os valores de CI₅₀ o intervalo de confiança de 95% de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do alamar blue após 72 horas de exposição com as células PBMC (*peripheral blood mononuclear cell* – linfócitos e monócitos) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0. O cálculo do índice de seletividade foi calculado em relação a linhagem leucêmica HL-60.

4.2. Estudo do mecanismo de ação citotóxico em células HL-60

O estudo do mecanismo de ação citotóxico da piplartina foi realizado utilizando a linhagem leucêmica HL-60 como modelo. Foram avaliados a viabilidade celular, o potencial transmembrânico da mitocôndria e o conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, por citometria de fluxo. O efeito da piplartina sobre a ativação da caspase-3 também foi avaliado. Adicionalmente, o índice mitótico foi determinado por coloração diferencial por hematoxilina/eosina.

4.2.1. Determinação da viabilidade celular

A piplartina causou uma redução significativa na proliferação celular, de maneira dependente da concentração, apenas 24 horas após a incubação (figura 14). Na avaliação da viabilidade celular, foi observado perda da integridade da membrana citoplasmática, a partir de 12 horas de incubação com a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Apenas após 24 horas de incubação foi observado perda da integridade da membrana citoplasmática na concentração 5 $\mu\text{g/mL}$ (figura 15). A doxorubicina, por sua vez, reduziu a proliferação celular sem alterar a integridade da membrana citoplasmática.

As figuras 16, 17, 18 e 19 mostram os gráficos de dispersão do volume celular e granulosidade representativos, obtidos por citometria de fluxo após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação com a piplartina, respectivamente. A redução no volume celular resulta numa diminuição da luz desviada para frente (FSC) e a condensação da cromatina causa um aumento transitório do desvio da luz para o lado (SSC), seguido por uma redução da SSC nos estágios finais da apoptose. Na análise do desvio da luz incidida sobre as células, foi observado um aumento do número de células apoptóticas, a partir de 3 horas de incubação em todas as concentrações testadas. Com 6 e 12 horas de incubação com a piplartina, as células apresentaram padrões morfológicos de células em apoptose, entretanto, após 24 horas de incubação a morfologia apresentou-se típica de células em necrose, provavelmente tratar-se de uma apoptose tardia, já que nas primeiras horas a morfologia era de padrão celular

de apoptose. A doxorubicina, usada como controle positivo, também apresentou padrão celular típico de apoptose também a partir de 3 horas de incubação.

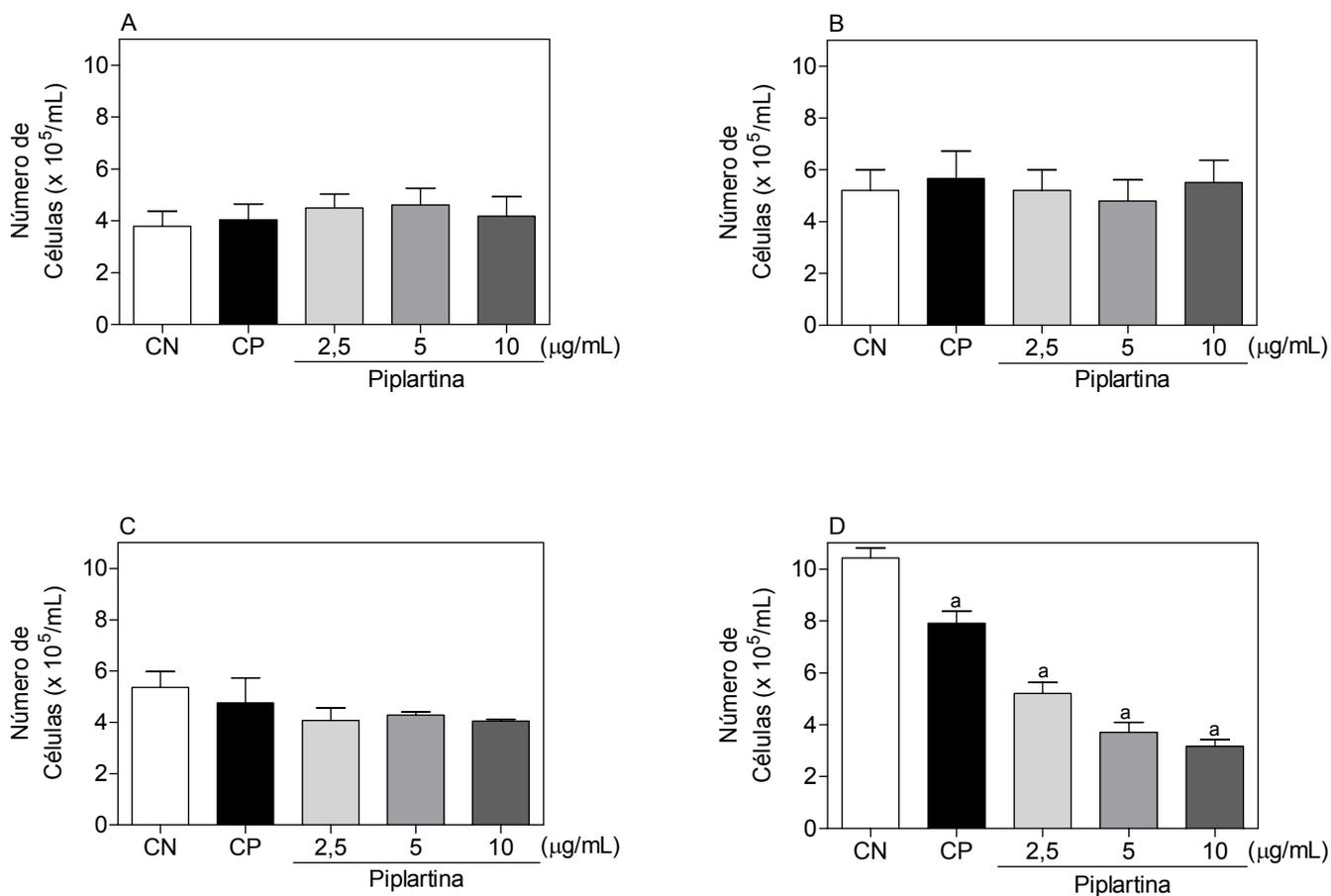


Figura 14 - Efeito da piplartina sobre a proliferação de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo após 3 (A), 6 (B), 12 (C) e 24 (D) horas de incubação. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (CP). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

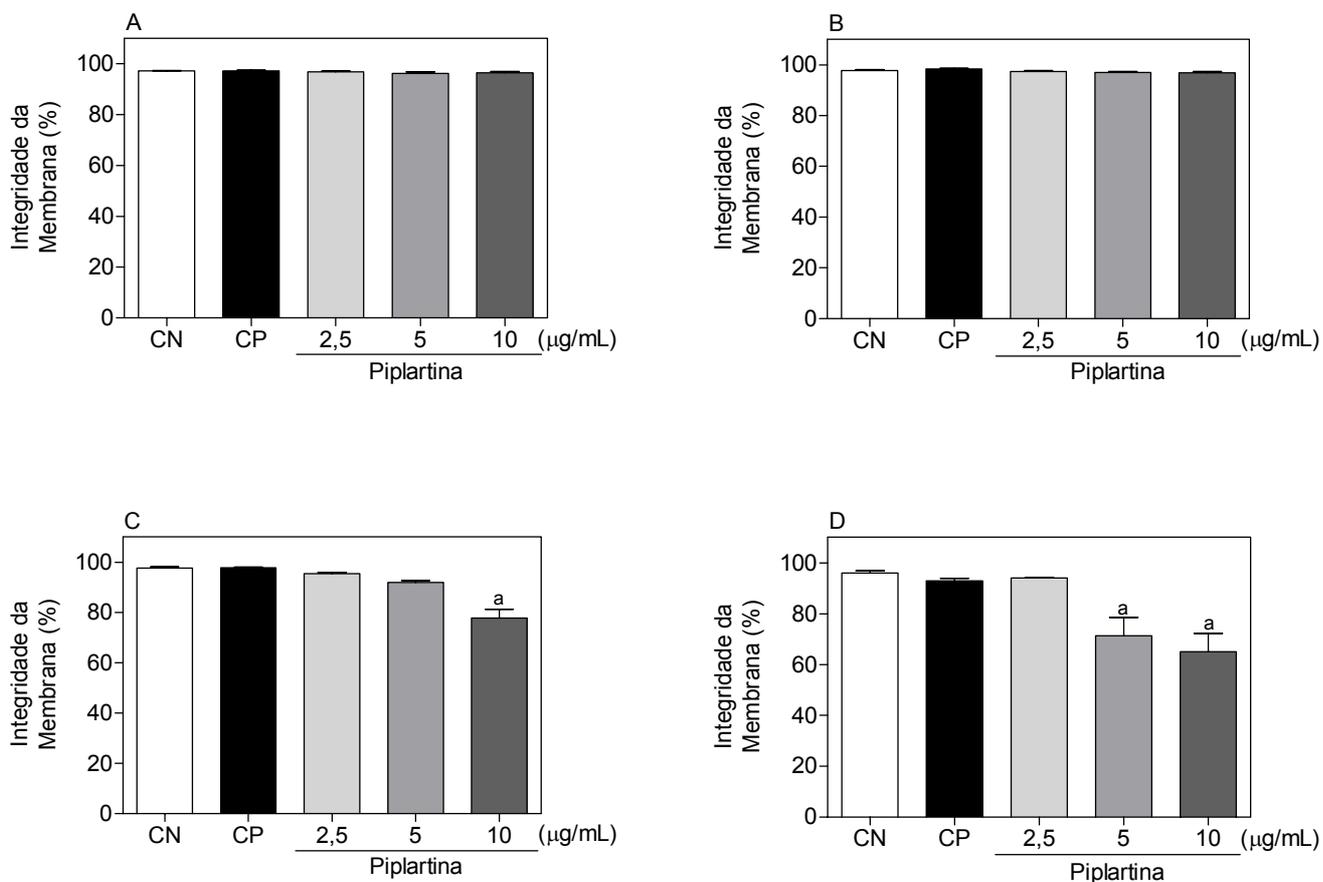


Figura 15 - Efeito da piplartina sobre a integridade da membrana citoplasmática de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo após 3 (A), 6 (B), 12 (C) e 24 (D) horas de incubação. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (CP). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

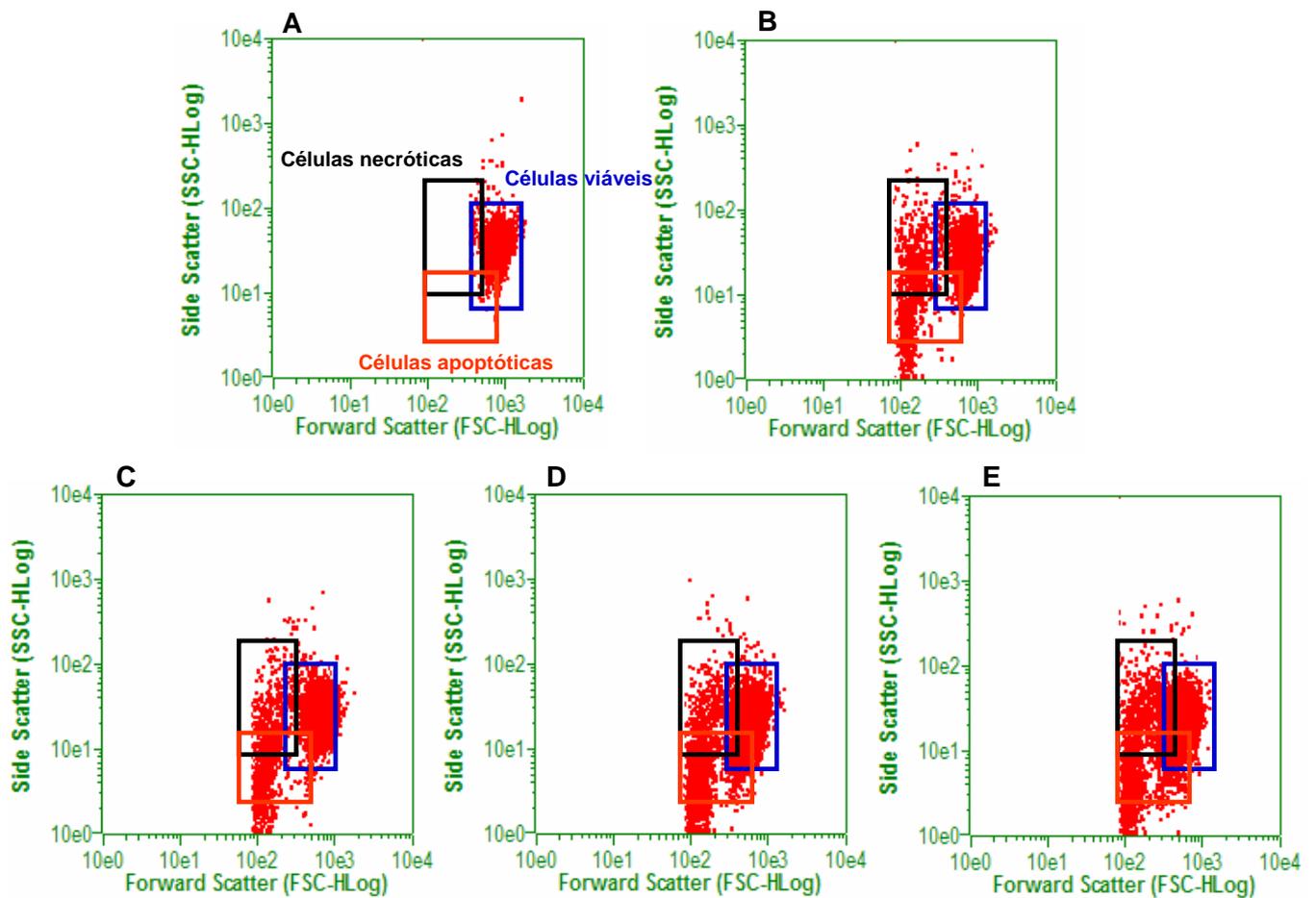


Figura 16 - Efeito da piplartina (2,5 µg/mL, C – 5 µg/mL, D - 10 µg/mL, E) sobre a morfologia de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 3 horas de incubação. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (B). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

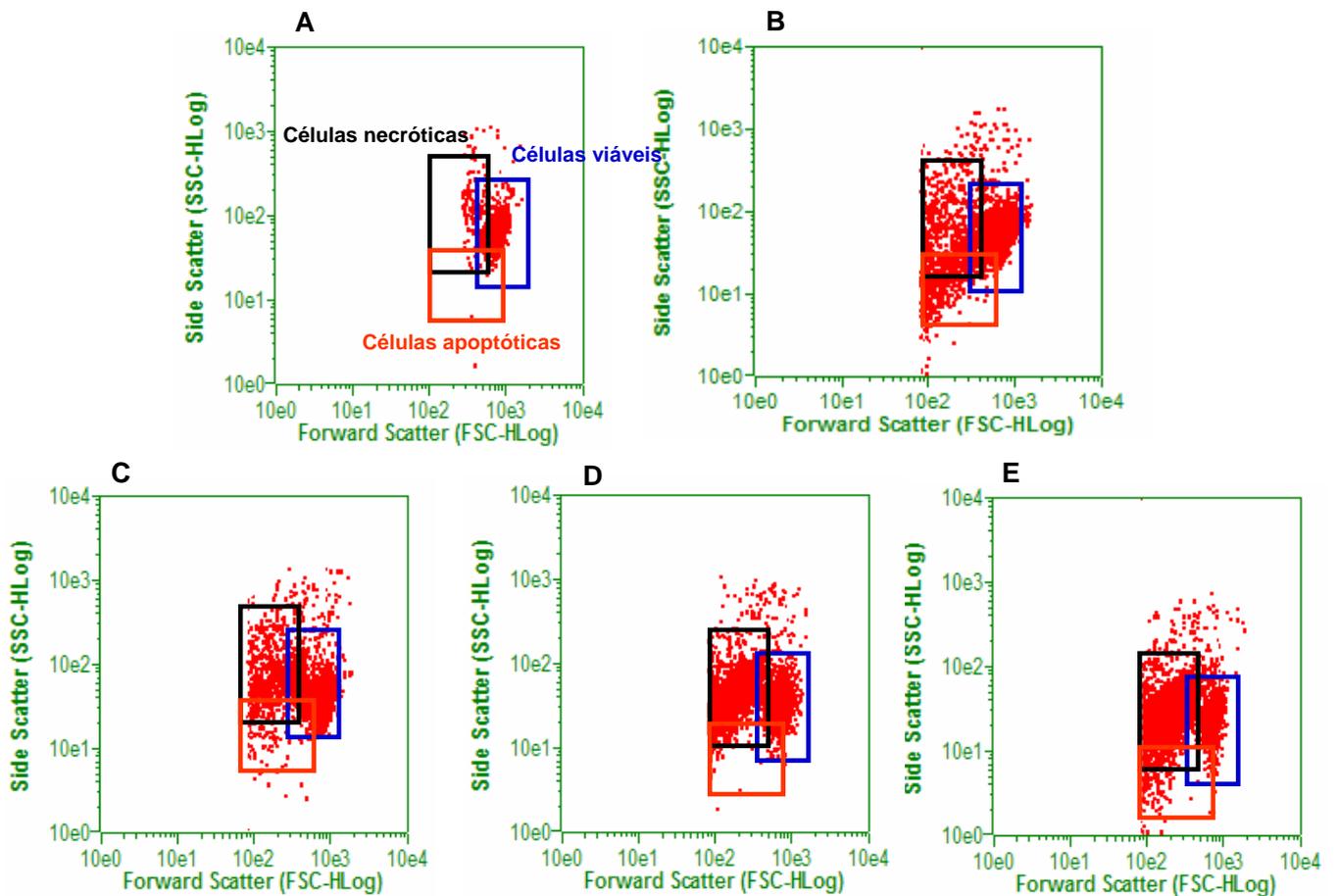


Figura 17 - Efeito da piplartina (2,5 µg/mL, C – 5 µg/mL, D - 10 µg/mL, E) sobre a morfologia de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 6 horas de incubação. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (B). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

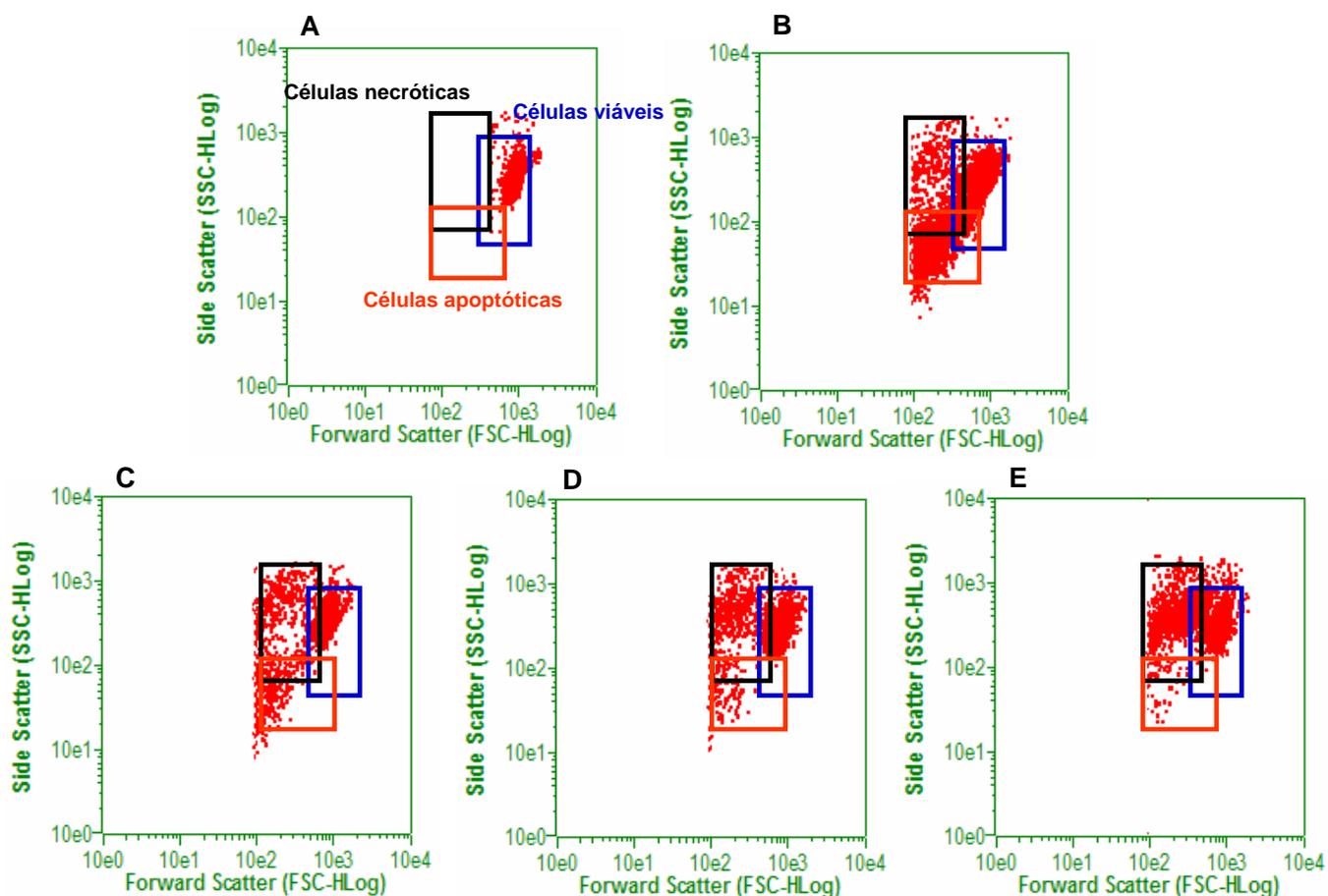


Figura 18 - Efeito da piplartina (2,5 µg/mL, C – 5 µg/mL, D - 10 µg/mL, E) sobre a morfologia de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 12 horas de incubação. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (B). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

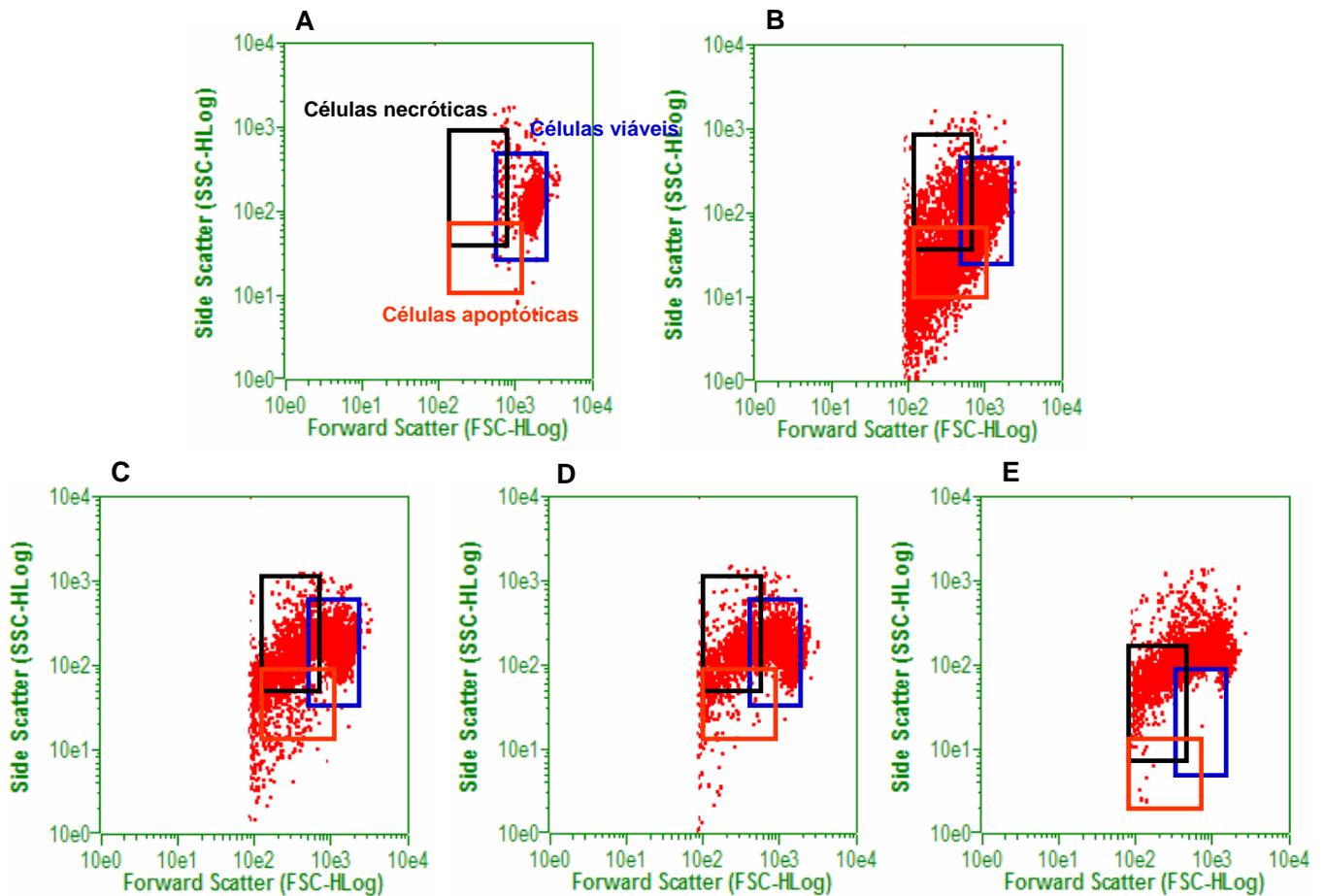


Figura 19 - Efeito da piplartina (2,5 µg/mL, C – 5 µg/mL, D - 10 µg/mL, E) sobre a morfologia de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 24 horas de incubação. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (B). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

4.2.2. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

A figura 20 mostra os resultados encontrados. Foi observada despolarização mitocondrial em células leucêmicas HL-60 tratadas com a maior concentração da piplartina (10 µg/mL) a partir de 3 horas de incubação. Entretanto, após 24 horas de incubação apenas o tratamento com a menor concentração da piplartina (2,5 µg/mL) apresentou despolarização mitocondrial. A doxorubicina, usada como controle positivo, apresentou despolarização mitocondrial também a partir de 3 horas de incubação.

4.2.3. Determinação da ativação da caspase-3

A figura 21 mostra os resultados encontrados. Foi observada ativação da caspase-3 em células leucêmicas HL-60 tratadas apenas com a menor concentração da piplartina (2,5 µg/mL).

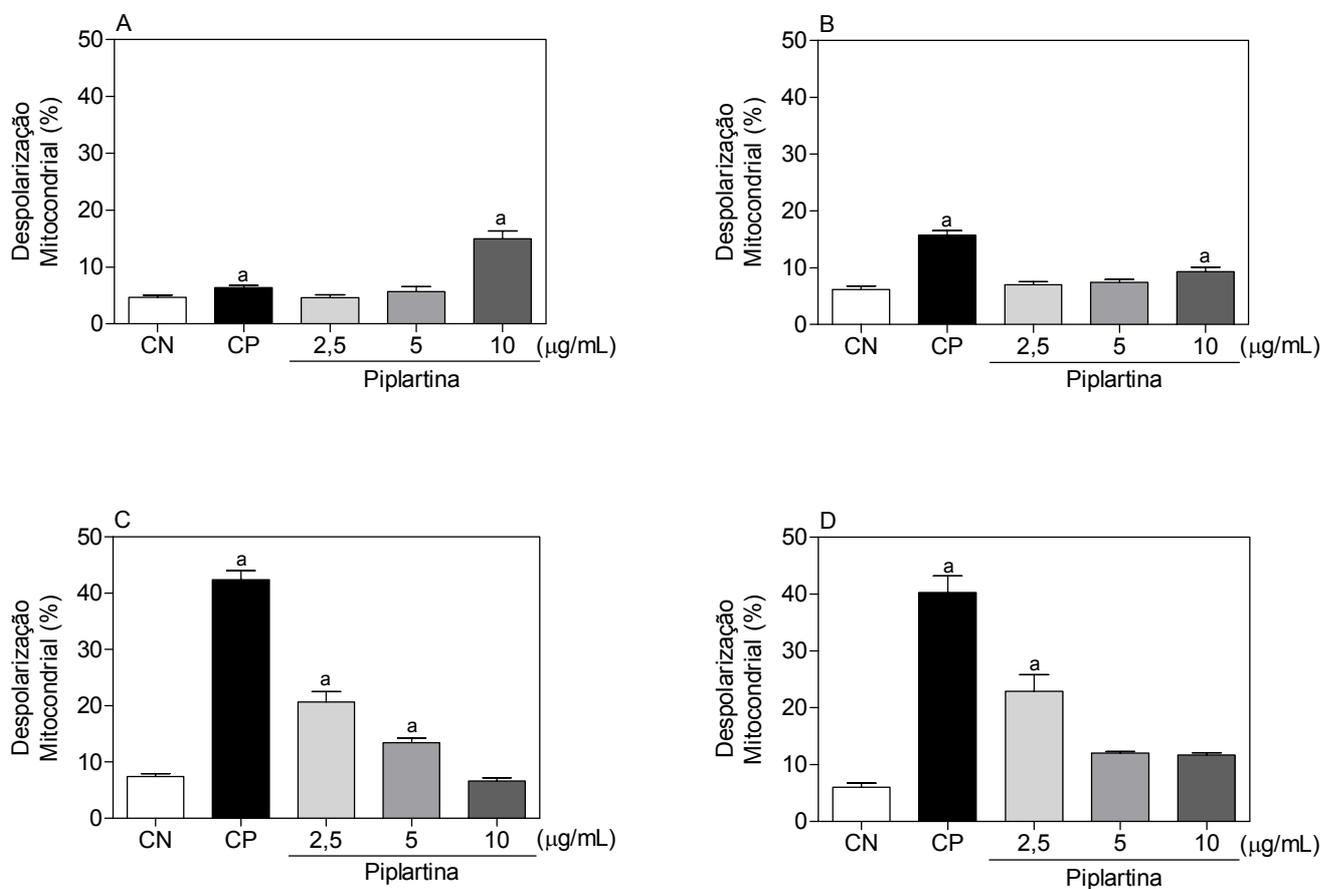


Figura 20 - Efeito da piplartina sobre o potencial transmembrânico de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123 após 3 (A), 6 (B), 12 (C) e 24 (D) horas de incubação. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (CP). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

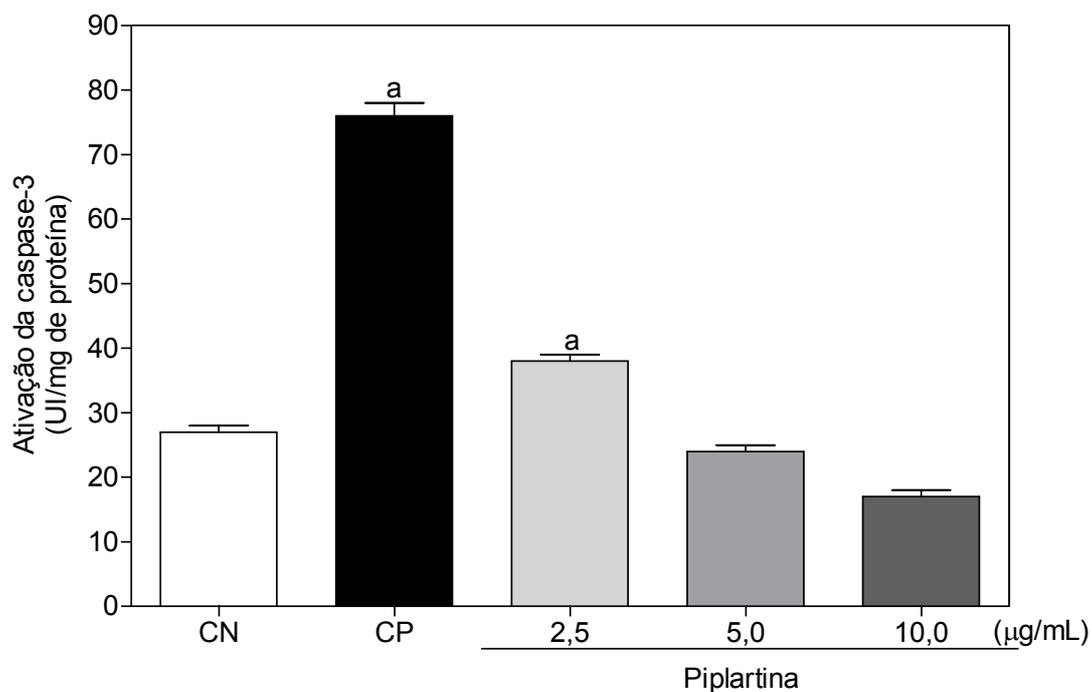


Figura 21 – Efeito da piplartina sobre a ativação da caspase-3 em células leucêmicas HL-60 após 24 horas de incubação. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (CP). Os resultados estão expressos como atividade específica. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.2.4. Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula

A tabela 10 mostra os resultados encontrados. A piplartina induziu parada do ciclo celular em G₂/M, em todas as concentrações testadas, após 3 horas de incubação (22,13 % do controle contra 27,03 %, 27,31 % e 28,03 % das células tratadas com piplartina nas concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente). A parada do ciclo celular foi seguida de fragmentação do DNA (sub-G₁) celular (2,77 % do controle contra 7,43 %, 7,55 % e 9,11 % das células tratadas com piplartina nas concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente, após 6 horas de incubação).

Após 12 horas de incubação, foi observado citotoxicidade, como observado pela fragmentação do DNA, preferencialmente para as células em G₂/M (21,56 % do controle contra 5,48 %, 6,06 % e 6,40 % das células em G₂/M e 2,53 % do controle contra 14,55 %, 19,56 % e 20,42 % das células em sub-G₁ das células tratadas com piplartina nas concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente).

Após 24 horas de incubação, a maioria das células apresentava o DNA fragmentado (2,60 % do controle contra 33,21 %, 40,53 % e 51,59 % das células tratadas com piplartina nas concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente). A doxorubicina, usada como controle positivo, também apresentou parada do ciclo celular G₂/M após 3 horas de incubação, seguido por fragmentação do DNA celular.

Tabela 10 – Efeito da piplartina sobre distribuição do ciclo celular de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo. A doxorrubicina foi usada como controle positivo (CP). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância.

Substâncias	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₁	G ₁	S	G ₂ /M
3 horas de incubação					
CN	-	2,56 \pm 0,27	50,09 \pm 2,18	22,30 \pm 0,66	22,13 \pm 1,07
CP	0,3	3,54 \pm 0,24 ^a	46,25 \pm 0,60	20,68 \pm 0,67	28,18 \pm 0,41 ^a
Piplartina	2,5	2,53 \pm 0,12	46,70 \pm 0,78	22,03 \pm 0,44	27,03 \pm 1,00 ^a
	5	2,73 \pm 0,23	48,72 \pm 0,94	20,72 \pm 1,21	27,31 \pm 0,37 ^a
	10	3,01 \pm 0,14	49,78 \pm 1,03	18,59 \pm 1,14	28,03 \pm 0,49 ^a
6 horas de incubação					
CN	-	2,77 \pm 0,38	57,59 \pm 0,97	21,07 \pm 0,64	19,26 \pm 0,62
CP	0,3	13,94 \pm 1,57 ^a	51,52 \pm 1,92	23,02 \pm 1,08	16,70 \pm 0,69 ^a
Piplartina	2,5	7,43 \pm 0,87 ^a	58,67 \pm 2,45	19,32 \pm 0,66	18,35 \pm 2,02
	5	7,55 \pm 0,45 ^a	59,14 \pm 1,33	19,63 \pm 0,69	20,59 \pm 0,56
	10	9,11 \pm 1,07 ^a	60,25 \pm 1,42	18,96 \pm 0,40	19,46 \pm 0,25
12 horas de incubação					
CN	-	2,53 \pm 0,21	54,17 \pm 0,52	21,96 \pm 1,04	21,56 \pm 0,57
CP	0,3	33,12 \pm 3,88 ^a	48,45 \pm 1,17 ^a	14,80 \pm 3,303 ^a	4,48 \pm 1,56 ^a
Piplartina	2,5	14,55 \pm 1,64 ^a	49,53 \pm 1,03	23,96 \pm 0,96	5,15 \pm 0,93 ^a
	5	19,56 \pm 0,95 ^a	53,94 \pm 1,65	24,30 \pm 0,31	6,06 \pm 0,80 ^a
	10	20,42 \pm 1,72 ^a	56,93 \pm 1,43	25,28 \pm 0,23	6,41 \pm 0,29 ^a
24 horas de incubação					
CN	-	2,60 \pm 0,42	50,70 \pm 1,170	20,70 \pm 0,52	23,64 \pm 0,48 ^a
CP	0,3	69,98 \pm 1,59 ^a	27,76 \pm 0,97 ^a	2,155 \pm 0,36 ^a	0,78 \pm 0,10 ^a
Piplartina	2,5	33,21 \pm 2,89 ^a	43,96 \pm 1,76	22,71 \pm 1,48	3,28 \pm 0,73 ^a
	5	40,53 \pm 2,23 ^a	42,89 \pm 1,66	19,26 \pm 0,46	2,55 \pm 0,43 ^a
	10	51,59 \pm 3,04 ^a	33,28 \pm 0,68 ^a	14,66 \pm 1,39 ^a	1,97 \pm 0,32 ^a

A tabela apresenta os valores correspondentes à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.2.5. Determinação do índice mitótico

Desde que a piplartina foi capaz de induzir parada do ciclo celular em G_2/M , o índice mitótico foi calculado após 3 horas de incubação com o fármaco a fim de avaliar o efeito deste sobre a mitose. As figuras 22 e 23 mostram os resultados encontrados. A piplartina não alterou o índice mitótico nas condições testadas. A comparação dos valores do índice mitótico com os resultados do ciclo celular, realizado por citometria de fluxo, sugeriu que a parada em G_2/M é na verdade uma parada na fase G_2 . A doxorrubicina, usada como controle positivo, também apresentou parada do ciclo celular na fase G_2 .

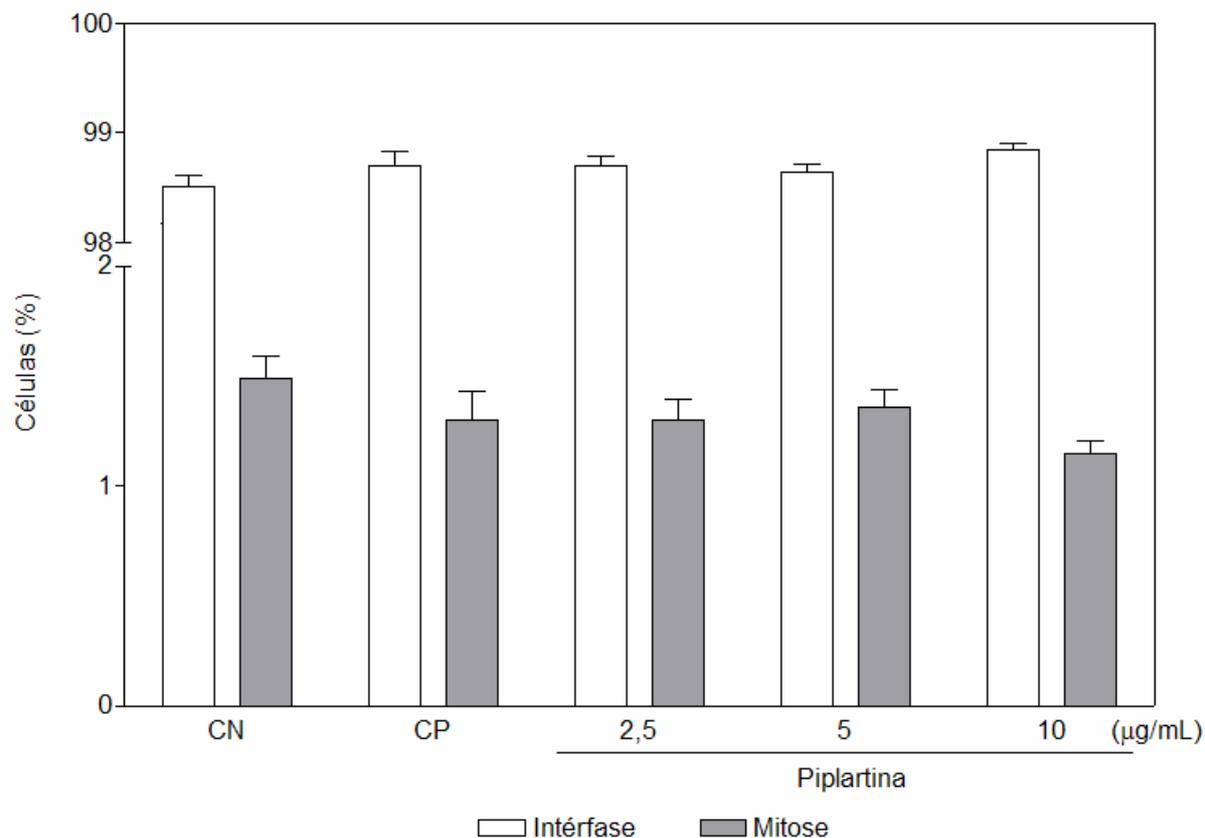


Figura 22 – Avaliação do efeito da piplartina sobre o índice mitótico de células leucêmicas HL-60 determinado por coloração diferencial com hematoxilina/eosina em células leucêmicas HL-60 após 3 horas de incubação. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (CP). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Mil células foram analisadas em cada lâmina. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

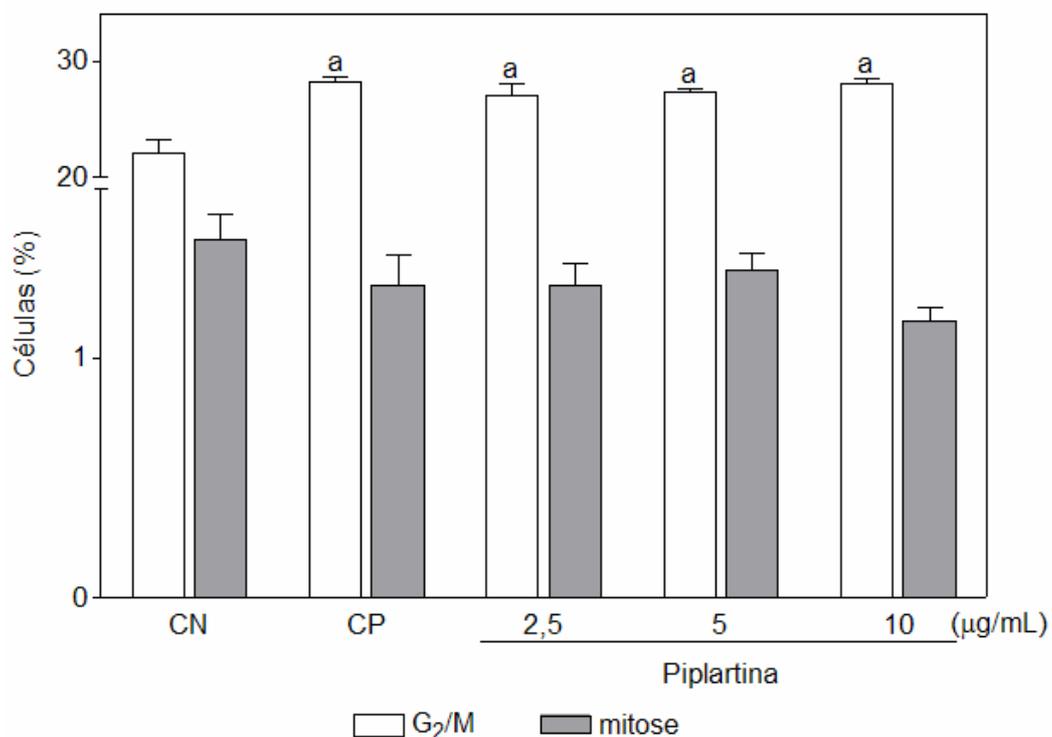


Figura 23 – Análise do índice mitótico demonstrando uma parada do ciclo celular em G₂ associada com o tratamento com a piplartina. O índice mitótico foi determinado por coloração diferencial com hematoxilina/eosina em células leucêmicas HL-60 após 3 horas de incubação. A porcentagem de células em G₂/M corresponde aos valores da tabela 10. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (CP). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Mil células foram analisadas em cada lâmina. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.3. Estudo da atividade genotóxica e mutagênica

No estudo da atividade genotóxica *in vitro*, o ensaio do cometa, em células V79 (fibroblastos de pulmão de *Hamster* Chinês), foi realizado para avaliar danos à fita simples e à fita dupla do DNA induzidos pela piplartina. Adicionalmente, o estudo do mecanismo de ação genotóxica foi avaliado por citometria de fluxo. A atividade mutagênica da piplartina foi investigada em dois modelos clássicos: ensaio de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* (modelo procariótico) e ensaio de mutagenicidade e recombinogênese em *Saccharomyces cerevisiae* (modelo eucariótico). Para avaliar o potencial genotóxico/mutagênico *in vivo* da piplartina, o ensaio do micronúcleo em medula óssea foi realizado em camundongos.

4.3.1. Avaliação da genotoxicidade *in vitro* - Dano ao DNA - Ensaio do cometa

Inicialmente foi avaliada a atividade citotóxica da piplartina na linhagem V79, no ensaio de formação de colônias em placas. A piplartina apresentou ser citotóxica em concentrações maiores que 10 µg/mL. Nas concentrações inferiores não foram detectados efeitos citotóxicos e, por tanto, foi estabelecida a concentração de 10 µg/mL como limite superior para o estudo da atividade genotóxica.

A tabela 11 apresenta o efeito genotóxico da piplartina, como avaliado pelo ensaio do cometa. A piplartina aumentou o índice de dano (ID) e a frequência de dano (FD) em ambas as versões do ensaio do cometa, condições alcalina e condições neutra, de maneira dependente da concentração. Sugerindo a quebra da fita dupla do DNA como principal responsável pela atividade genotóxica da piplartina. O metano sulfonato de metila, usado como controle positivo, também aumentou o índice e a frequência de danos ao DNA em ambos os ensaios, validando, assim, o ensaio.

Tabela 11 – Atividade genotóxica da piplartina em células V79 (fibroblastos de pulmão de *Hamster* Chinês) avaliada pelo teste do cometa após 3 horas de incubação. O metano sulfonato de metila foi usado como controle positivo (CP). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância.

Substâncias	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de Dano (ID)*	Freqüência de Dano (FD)#
Cometa alcalino (pH~13,0)			
CN	-	26,75 \pm 3,68	23,66 \pm 4,04
CP	40	225,5 \pm 9,20 ^a	93,33 \pm 3,78 ^a
Piplartina	1	39,75 \pm 6,70	26,00 \pm 3,91
	2,5	92,75 \pm 3,13 ^a	48,25 \pm 6,18 ^a
	5	134,0 \pm 6,97 ^a	63,25 \pm 2,06 ^a
	10	181,0 \pm 8,16 ^a	77,00 \pm 5,59 ^a
Cometa neutro (pH~8,0)			
CN	-	10,72 \pm 7,54	7,50 \pm 0,57
CP	40	95,46 \pm 2,93 ^a	50,0 \pm 2,30 ^a
Piplartina	1	22,75 \pm 2,62 ^a	20,01 \pm 5,71 ^a
	2,5	38,75 \pm 2,50 ^a	27,27 \pm 2,62 ^a
	5	64,00 \pm 3,16 ^a	38,00 \pm 3,36 ^a
	10	101,5 \pm 9,67 ^a	55,25 \pm 2,50 ^a

A tabela apresenta os valores correspondentes à média \pm D.P. de quatro experimentos independentes realizados em duplicata, obtidos a partir da contagem de 100 células por experimento. *, escores obtidos pela multiplicação do número de células de cada classe (0, 1, 2, 3 e 4) pela classe de dano, variando de 0 (sem dano) a 400 (dano máximo). #, valores calculados como percentual de dano (%). a, $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.3.2. Estudo do mecanismo de ação genotóxico em células V79

O estudo do mecanismo de ação genotóxico da piplartina foi realizado na linhagem celular V79 (fibroblastos de pulmão de *Hamster* Chinês). Foram avaliados a viabilidade celular, o potencial transmembrânico da mitocôndria e o conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, por citometria de fluxo.

4.3.2.1. Determinação da viabilidade celular

A piplartina não causou redução significativa na proliferação celular nem na viabilidade celular (figura 24 e 25). A doxorubicina, por sua vez, também não alterou estes parâmetros. Entretanto, morfologia celular foi alterada em ambas as concentrações testadas. A figura 26 mostra os gráficos de dispersão do volume celular e granulosidade representativos. Na análise do desvio da luz incidida sobre as células, foi observado um aumento do número de células apoptóticas em ambas as concentrações testadas. A doxorubicina, usada como controle positivo, também apresentou padrão celular típico de apoptose.

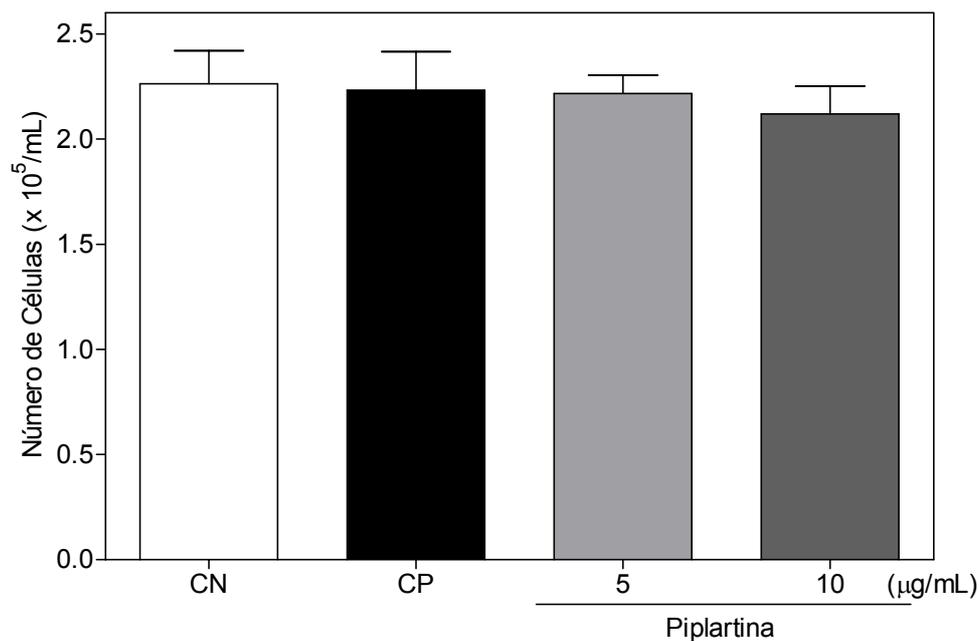


Figura 24 - Efeito da piplartina sobre a proliferação de células V79 (fibroblastos de pulmão de *Hamster* Chinês) determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo após 3 horas de incubação. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorubicina (1 µg/mL) foi usada como controle positivo (CP). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Os *debris* celulares foram excluídos das análises.

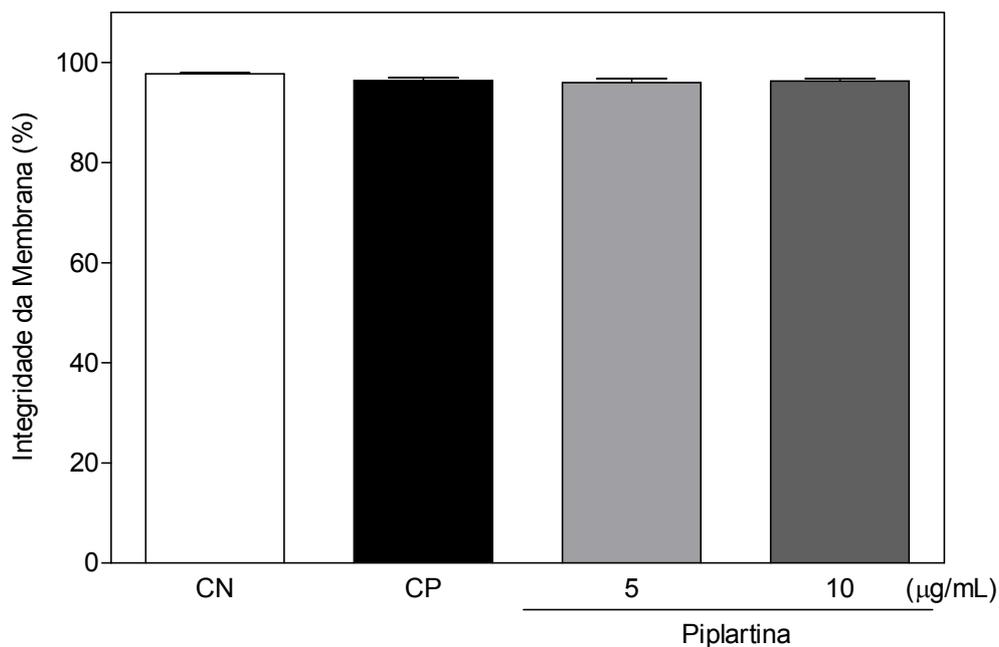


Figura 25 - Efeito da piplartina sobre a integridade da membrana citoplasmática de células V79 (fibroblastos de pulmão de *Hamster Chinês*) determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo após 3 horas de incubação. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorrubicina (1 µg/mL) foi usada como controle positivo (CP). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Os *debris* celulares foram excluídos das análises.

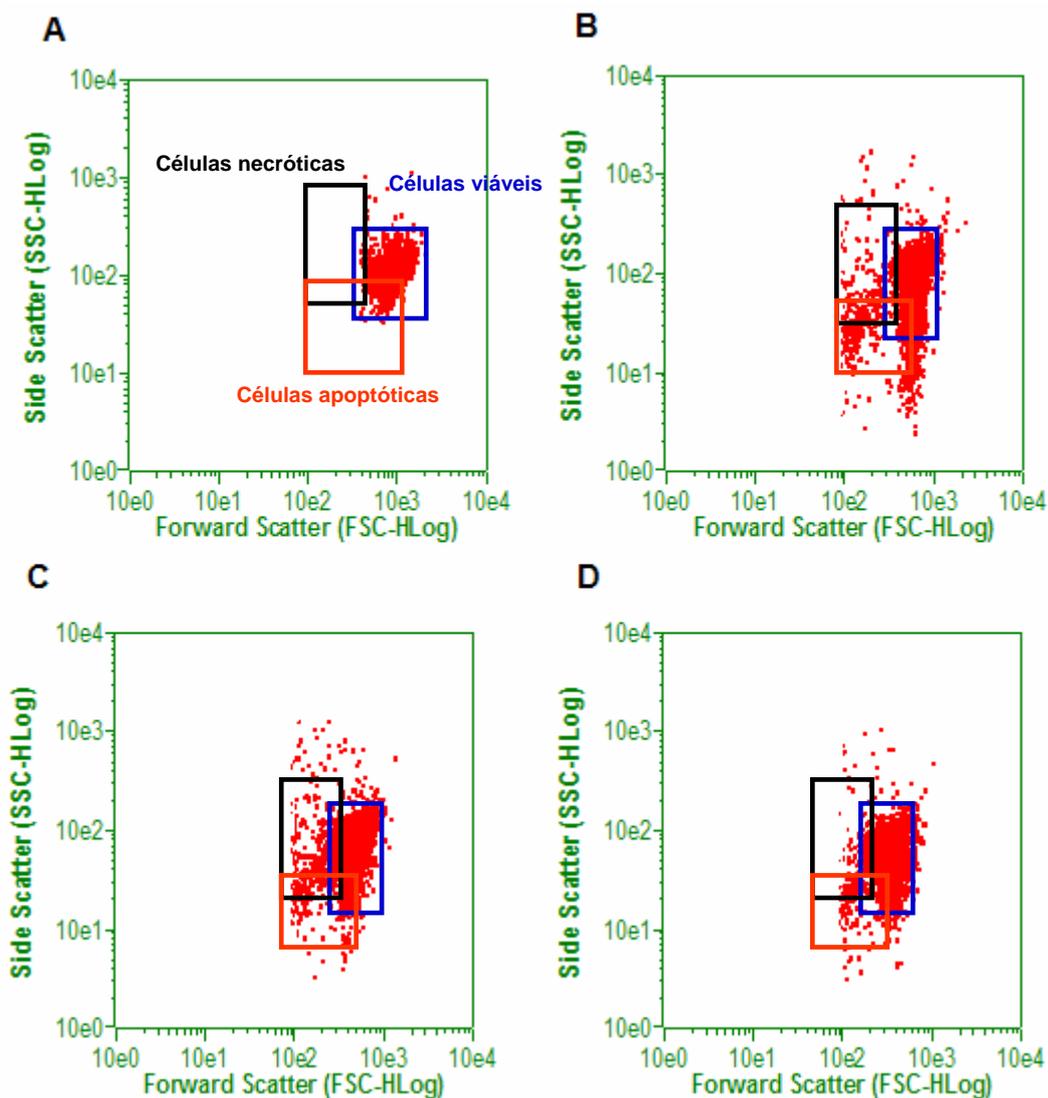


Figura 26 - Efeito da piplartina (5 $\mu\text{g/mL}$, C - 10 $\mu\text{g/mL}$, D) sobre a morfologia de células V79 (fibroblastos de pulmão de *Hamster* Chinês) determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 3 horas de incubação. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorubicina (1 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (B). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

4.3.2.2. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

A figura 27 mostra os resultados encontrados. Foi observada despolarização mitocondrial em células V79 tratadas com ambas as concentrações da piplartina. A doxorubicina, usada como controle positivo, também apresentou despolarização mitocondrial.

4.3.2.3. Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula

A tabela 12 mostra os resultados encontrados. A piplartina induziu parada do ciclo celular em G₂/M, em ambas as concentrações testadas (22,85 % do controle contra 28,51 % e 26,97 % das células tratadas com piplartina nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente). A parada do ciclo celular foi acompanhada de fragmentação do DNA (sub-G₁) celular (1,41 % do controle contra 5,79 % e 9,82 % das células tratadas com piplartina nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente).

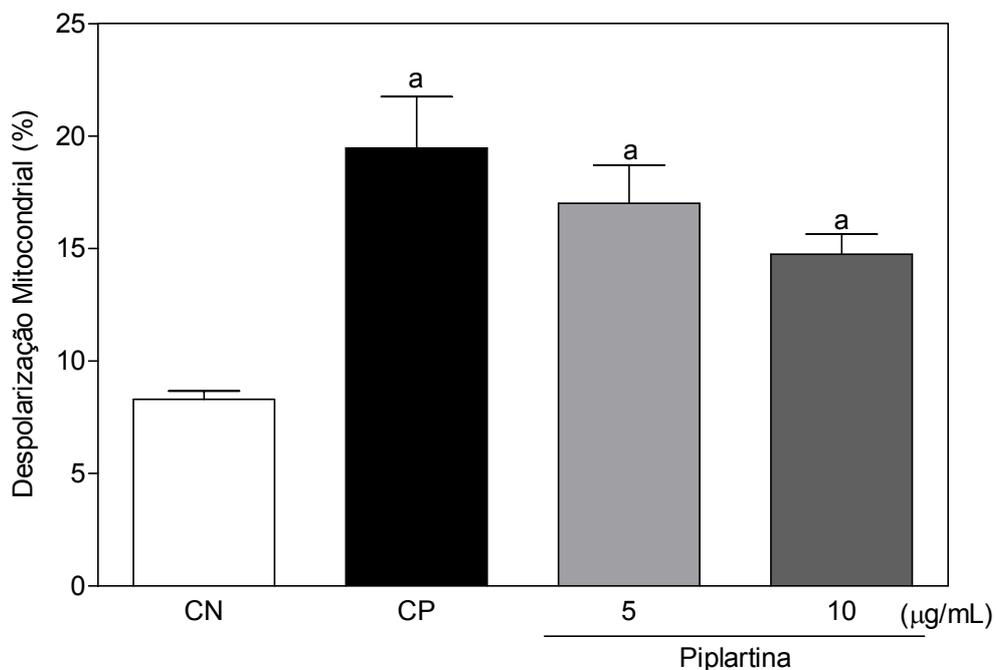


Figura 27 - Efeito da piplartina sobre o potencial transmembrânico de células V79 (fibroblastos de pulmão de *Hamster* Chinês) determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123 após 3 horas de incubação. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância. A doxorubicina (1 µg/mL) foi usada como controle positivo (CP). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

Tabela 12 – Efeito da piplartina sobre a distribuição do ciclo celular em células V79 (fibroblastos de pulmão de *Hamster* Chinês) determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo. A doxorubicina foi usada como controle positivo (CP). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância.

Substâncias	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₁	G ₁	S	G _{2/M}
CN	-	1,41 \pm 0,28	48,97 \pm 1,18	21,97 \pm 0,81	22,85 \pm 0,91
CP	1,0	15,22 \pm 0,76 ^a	47,64 \pm 1,52	23,32 \pm 0,45	13,51 \pm 1,10 ^a
Piplartina	5	5,79 \pm 1,58 ^a	38,94 \pm 1,68 ^a	23,74 \pm 1,24	28,51 \pm 0,94 ^a
	10	9,82 \pm 0,71 ^a	38,31 \pm 3,34 ^a	22,85 \pm 1,59	26,97 \pm 0,36 ^a

A tabela apresenta os valores correspondentes à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.3.3. Avaliação da mutagenicidade no ensaio de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* – Teste de Ames

Inicialmente, o efeito citotóxico da piplartina foi avaliado usando a linhagem TA 100. A piplartina apresentou citotoxicidade em concentrações maiores que 40 µg/mL. Nas concentrações inferiores não foram detectados efeitos citotóxicos e, portanto, foi estabelecida a concentração de 40 µg/mL como limite superior para o estudo da atividade mutagênica no ensaio de Ames.

A tabela 13 apresenta os resultados obtidos para a atividade mutagênica por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*his+*) nas linhagens TA98 e TA97a e a tabela 14 apresenta os resultados obtidos para a atividade mutagênica por substituição de pares de bases (*his+*) nas linhagens TA100 e TA102. Os resultados mostram o número de revertentes *his+*/placa, bem como o índice de mutagenicidade, para a piplartina nas diferentes concentrações testadas na presença e ausência de ativação metabólica (S9). Verifica-se que não ocorreu aumento da frequência de mutantes revertentes na presença de piplartina nas diferentes concentrações testadas e os índices de mutagenicidade foram todos menores que 2, indicando ausência de atividade mutagênica no teste de Ames. O 4-nitroquinolina-N-óxido, a aflatoxina B e a azida sódica, usados como controles positivos, aumentaram o índice de mutagenicidade validando, assim, o ensaio.

Tabela 13 – Avaliação da atividade mutagênica por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*his+*) nas linhagens TA98 e TA97a de *Salmonella typhimurium* após tratamento com piplartina sem (-S9) ou com (+S9) ativação metabólica. O 4-nitroquinolina-N-óxido (para -S9) e a aflatoxina B1 (para o +S9) foram usados como controle positivo (CP). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância.

Substâncias	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Linhagens de <i>S. typhimurium</i>			
		TA98		TA97a	
		Rev./placa	IM	Rev./placa	IM
Sem ativação metabólica (-S9)					
CN	-	23 \pm 4	-	158 \pm 16	-
CP	0,5	301 \pm 29	12,9	798 \pm 134	5,1
Piplartina	8	21 \pm 4	0,9	184 \pm 25	1,0
	16	23 \pm 6	1,0	159 \pm 15	0,9
	24	26 \pm 3	1,1	167 \pm 31	0,9
	32	16 \pm 3	0,7	167 \pm 7	0,9
	40	19 \pm 4	0,6	119 \pm 21	1,0
Com ativação metabólica (+S9)					
CN	-	25 \pm 1	-	153 \pm 30	-
CP	1	1031 \pm 139	41,8	709 \pm 214	4,6
Piplartina	8	25 \pm 2	1,0	182 \pm 12	1,2
	16	22 \pm 7	0,9	180 \pm 35	1,2
	24	26 \pm 3	1,1	166 \pm 44	1,1
	32	21 \pm 2	0,8	156 \pm 13	1,0
	40	27 \pm 6	1,1	150 \pm 8	1,0

A tabela apresenta o número de revertentes por placa (Rev./placa) correspondente à média \pm D.P. e índice de mutagenicidade (IM – n° de revertentes na placa teste/ n° de revertentes do controle negativo) de três experimentos independentes realizados em triplicata. A substância é considerada mutagênica quando o IM for maior ou igual a 2, em pelo menos uma das doses testadas e, quando houver uma relação dose resposta entre as concentrações testada e o número de revertentes induzidos.

Tabela 14 – Avaliação da atividade mutagênica por substituição de pares de bases (*his+*) nas linhagens TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* após tratamento com piplartina sem (-S9) ou com (+S9) ativação metabólica. O 4-nitroquinolina-N-óxido (para -S9 na linhagem TA102), azida sódica 5µg/mL (para -S9 na linhagem TA100) e a aflatoxina B1 (para o +S9) foram usados como controle positivo (CP). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância.

Substâncias	Concentrações (µg/mL)	Linhagens de <i>S. typhimurium</i>			
		TA100		TA102	
		Rev./placa	IM	Rev./placa	IM
Sem ativação metabólica (-S9)					
CN	-	137 ± 12	-	340 ± 28	-
CP	0,5	972 ± 36	7,1	2703 ± 134	7,9
Piplartina	8	136 ± 20	1,0	378 ± 68	1,1
	16	116 ± 1	0,8	282 ± 13	0,8
	24	130 ± 10	0,9	365 ± 11	1,1
	32	119 ± 15	0,9	317 ± 61	0,9
	40	153 ± 22	1,1	299 ± 13	0,9
Com ativação metabólica (+S9)					
CN	-	93 ± 16	-	403 ± 11	-
CP	0,5	1054 ± 163	11,3	972 ± 233	2,4
Piplartina	8	80 ± 17	0,9	567 ± 47	1,4
	16	89 ± 3	0,9	572 ± 14	1,4
	24	92 ± 11	1,0	588 ± 31	1,4
	32	85 ± 17	0,9	632 ± 14	1,6
	40	114 ± 9	1,2	355 ± 262	0,9

A tabela apresenta o número de revertentes por placa (Rev./placa) correspondente à média ± D.P. e índice de mutagenicidade (IM – n° de revertentes na placa teste/ n° de revertentes do controle negativo) de três experimentos independentes realizados em triplicata. A substância é considerada mutagênica quando o IM for maior ou igual a 2, em pelo menos uma das doses testadas e, quando houver uma relação dose resposta entre as concentrações testada e o número de revertentes induzidos.

4.3.4. Avaliação da mutagenicidade e recombinação em *Saccharomyces cerevisiae*

Inicialmente foi avaliada a atividade citotóxica da piplartina em fase exponencial de crescimento e em fase estacionária de crescimento na linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae*. A piplartina não apresentou citotoxicidade em *S. cerevisiae* durante a fase estacionária de crescimento, entretanto, apresentou ser citotóxica durante a fase exponencial de crescimento em concentrações maiores que 100 µg/mL. Portanto, foi estabelecida a concentração de 100 µg/mL como limite superior para o estudo da atividade mutagênica e recombinação.

A tabela 15 apresenta os resultados obtidos para a indução de mutação reversa e para frente ou *forward* (*can1*) na linhagem haplóide N123 de *S. cerevisiae* e a tabela 16 apresenta os resultados obtidos para a indução de mutação pontual (*his-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV185-14c de *S. cerevisiae*. A piplartina não induziu mutagenicidade em nenhuma das linhagens de *S. cerevisiae* em culturas com PBS, mas mostrou-se como um agente mutagênico quando as linhagens foram cultivadas com meio de cultura. A indução de mutação reversa e para frente ou *forward* (*can1*) na linhagem N123 ou mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem XV185-14c foram observada apenas nas maiores concentrações testadas. A indução de mutação pontual (*his-7* e *lys1-1*) na linhagem XV185-14c foi observada em todas as concentrações testadas. O 4-nitroquinolina-N-óxido, usado como controle positivo, também apresentou resultados positivos nos testes realizados, validando, assim, o ensaio.

O efeito da piplartina em induzir recombinações mitóticas intergênicas ou *crossing-over* (*+cyh2*) e intragênicas ou conversão gênica (*leu1-1/leu1-12*) foi avaliado na linhagem diplóide XS2316 de *S. cerevisiae* (tabela 17). A piplartina causou recombinação em *S. cerevisiae* cultivada em PBS apenas na maior concentração testada. Entretanto, causou recombinações mitóticas intergênica e intragênica em todas as concentrações testadas quando a levedura foi cultivada com meio de cultura. O 4-nitroquinolina-N-óxido, usado como controle positivo, também apresentou resultados positivos neste teste, validando, assim, este ensaio.

Tabela 15 – Indução de mutação reversa e para frente ou *forward* (*can1*) na linhagem haplóide N123 de *Saccharomyces cerevisiae* após tratamento com piplartina em fase exponencial de crescimento. O 4-nitroquinolina-N-óxido foi usado como controle positivo (CP). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância.

Substâncias	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Sobrevivência (%)	Revertentes $\text{Can}/10^7$ Sobreviventes*
Culturas com PBS (sem condições de crescimento)			
CN	-	100 (321)#	$3,03 \pm 0,22$
CP	0,5	55,09 (177)	$17,36 \pm 1,41^a$
Piplartina	10	94,70 (304)	$3,61 \pm 0,27$
	25	90,87 (292)	$3,95 \pm 0,16$
	50	81,21 (261)	$4,72 \pm 0,2$
	100	69,70 (224)	$6,1 \pm 0,28$
Cultura com meio de cultura (com condições de crescimento)			
CN	-	100 (250)	$4,01 \pm 0,35$
CP	0,5	48,06 (120)	$26,68 \pm 0,44^a$
Piplartina	10	83,55 (208)	$5,27 \pm 0,50$
	25	72,61 (181)	$7,16 \pm 0,77^a$
	50	69,57 (173)	$9,22 \pm 1,06^a$
	100	60,18 (150)	$13,94 \pm 1,63^a$

A tabela apresenta os valores correspondentes à média \pm D.P. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, Revertentes de lócus-específico. #, Número entre parênteses corresponde ao número de colônias contadas. a, $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 16 – Indução de mutação pontual (*his-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV185-14c de *Saccharomyces cerevisiae* após tratamento com piplartina em fase exponencial de crescimento. O 4-nitroquinolina-N-óxido foi usado como controle positivo (CP). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância.

Substâncias	Concentrações (µg/mL)	Sobrevivência (%)	Revertentes His/10 ⁷ Sobreviventes*	Revertentes Lys/10 ⁷ Sobreviventes#	Revertentes Hom3/10 ⁷ Sobreviventes*
Culturas com PBS (sem condições de crescimento)					
CN	-	100 (124)§	12,39 ± 1,63	1,87 ± 0,46	2,16 ± 0,57
CP	0,5	58,51 (72)	114,25 ± 1,92 ^a	41,17 ± 4,85 ^a	21,07 ± 1,37 ^a
Piplartina	10	96,54 (120)	11,09 ± 0,34	1,52 ± 0,15	1,67 ± 0,10
	25	86,74 (102)	13,92 ± 0,65	2,16 ± 0,51	2,16 ± 0,51
	50	80,78 (100)	14,98 ± 1,47	2,93 ± 0,99	1,98 ± 1,00
	100	75,20 (93)	16,06 ± 1,77	3,57 ± 1,19	3,58 ± 0,70
Cultura com meio de cultura (com condições de crescimento)					
CN	-	100 (382)	9,88 ± 1,27	7,33 ± 0,10	4,27 ± 0,76
CP	0,5	45,23 (172)	56,92 ± 3,54 ^a	50,36 ± 5,12 ^a	22,10 ± 2,01 ^a
Piplartina	10	89,95 (343)	22,67 ± 1,88 ^a	11,61 ± 2,36	5,03 ± 0,51
	25	84,78 (323)	22,07 ± 0,91 ^a	13,78 ± 1,33 ^a	5,46 ± 0,50
	50	58,09 (222)	26,51 ± 1,31 ^a	18,15 ± 0,63 ^a	8,41 ± 1,06 ^a
	100	47,17 (180)	30,56 ± 1,65 ^a	20,93 ± 1,71 ^a	10,0 ± 0,95 ^a

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± D.P. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, Revertentes de locus-específico. #, Revertentes de locus-não específico. §, Número entre parênteses corresponde ao número de colônias contadas. a, $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 17 – Indução de recombinações mitóticas intergênica ou *crossing-over* (+/*cyh2*) e intragênica ou conversão gênica (*leu1-1/leu1-12*) na linhagem diplóide XS2316 de *Saccharomyces cerevisiae* após tratamento com piplartina em fase exponencial de crescimento. O 4-nitroquinolina-N-óxido foi usado como controle positivo (CP). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância.

Substâncias	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Sobrevivência (%)	Recombinações intergênica/ 10^5	Recombinações intragênica/ 10^5
			Sobreviventes	Sobreviventes
Culturas com PBS (sem condições de crescimento)				
CN	-	100 (473)#	11,31 \pm 1,58	2,66 \pm 0,55
CP	0,5	45,44 (215)	86,73 \pm 1,82 ^a	44,19 \pm 2,82 ^a
Piplartina	10	83,23 (394)	14,67 \pm 2,02	4,35 \pm 0,52
	25	79,81 (378)	19,39 \pm 1,38 ^a	5,38 \pm 0,03
	50	76,12 (361)	25,30 \pm 0,47 ^a	6,15 \pm 0,74 ^a
	100	63,01 (298)	30,29 \pm 1,82 ^a	6,63 \pm 0,58 ^a
Cultura com meio de cultura (com condições de crescimento)				
CN	-	100 (782)	30,08 \pm 1,71	3,79 \pm 0,12
CP	0,5	44,43 (347)	101,74 \pm 5,89 ^a	32,01 \pm 2,21 ^a
Piplartina	10	87,85 (687)	46,95 \pm 1,52 ^a	5,77 \pm 0,30
	25	83,71 (655)	51,51 \pm 2,01 ^a	6,38 \pm 0,19 ^a
	50	79,84 (624)	52,72 \pm 1,57 ^a	6,99 \pm 0,30 ^a
	100	66,55 (520)	60,76 \pm 5,63 ^a	9,48 \pm 0,36 ^a

A tabela apresenta os valores correspondentes à média \pm D.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. #, Número entre parênteses corresponde ao número de colônias contadas. a, $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.3.5. Avaliação da genotoxicidade/mutagenicidade em medula óssea de camundongos – Teste do micronúcleo *in vivo*

A tabela 18 apresenta os resultados encontrados. A piplartina aumentou significativamente a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCM) após 24 horas de tratamento, quando comparado com o grupo controle. Entretanto, não foi observado aumento significativo na frequência de micronúcleos após 48 de tratamento, provavelmente devido à regeneração medular. Houve uma relação dose resposta entre a indução de EPCM e as diferentes doses do fármaco administrado. Não houve diferenças estatisticamente significante entre os animais machos ou fêmeos, sugerindo que o estrógeno não interfere nesta ação. De qualquer modo, a piplartina não alterou a relação de eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC) em nenhum período analisado (tabela 19).

De acordo com os resultados, a piplartina apresentou resultado positivo neste ensaio, ou seja, apresenta atividade genotóxica/mutagênica *in vivo*. Esta resposta positiva pode ser atribuída a uma atividade clastogênica e/ou aneuploidogênica da piplartina.

Tabela 18 – Frequência de eritrócitos policromáticos micronúcleados (EPCM) em medula óssea em camundongos após tratamento com piplartina. O metano sulfonato de etila foi usado como controle positivo (CP). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância.

Substâncias	Dose (mg/kg)	Nº de animais	Total de EPC contados	24 horas		48 horas	
				Nº de EPCM/animal	EPCM (%)	Nº de EPCM/animal	EPCM (%)
Machos							
CN	-	5	10000	4,80 ± 0,20	0,24	4,20 ± 0,80	0,21
CP	200	5	10000	37,40 ± 4,45 ^a	1,87	30,80 ± 3,29 ^a	1,54
Piplartina	50	5	10000	4,00 ± 0,55	0,20	4,00 ± 0,32	0,20
	100	5	10000	15,60 ± 1,81*	0,78	7,00 ± 3,03	0,35
Fêmeas							
CN	-	5	10000	6,60 ± 1,29	0,33	4,00 ± 0,84	0,20
CP	200	5	10000	43,00 ± 2,19 ^a	2,15	41,20 ± 0,80 ^a	2,06
Piplartina	50	5	10000	5,60 ± 1,89	0,28	5,00 ± 1,52	0,25
	100	5	10000	16,00 ± 1,98 ^a	0,80	7,80 ± 1,24	0,39

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de *n* animais. a, $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 19 - Proporção de eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC) de medula óssea em camundongos após tratamento com piplartina. O metano sulfonato de etila foi usado como controle positivo (CP). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância.

Substâncias	Dose (mg/kg)	Nº de animais	Total de EPC contados	24 horas		48 horas	
				Nº de EPC/animal	EPC/ (EPC + ENC) (%)	Nº de EPC/animal	EPC/ (EPC + ENC) (%)
Machos							
CN	-	5	1000	506,2 ± 14,36	50,62	500,2 ± 10,97	50,02
CP	200	5	1000	278,4 ± 30,46 ^a	27,84	372,8 ± 33,42 ^a	37,28
Piplartina	50	5	1000	498,2 ± 7,36	49,82	456,6 ± 11,11	45,66
	100	5	1000	476,0 ± 24,51	47,60	438,6 ± 28,12	43,86
Fêmeas							
CN	-	5	1000	495,8 ± 10,93	49,58	479,6 ± 14,14	47,96
CP	200	5	1000	309,0 ± 56,07 ^a	30,90	233,8 ± 26,26 ^a	23,38
Piplartina	50	5	1000	496,2 ± 12,65	49,62	475,0 ± 20,02	47,50
	100	5	1000	455,2 ± 13,95	45,52	473,6 ± 26,05	47,36

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de *n* animais. *a*, *P* < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.4. Estudo farmacocinético

Dentre o estudo farmacocinético, foi estudada a cinética de absorção da piplartina após uma única dose de 50 mg/kg em ratos. Para tanto, inicialmente a metodologia bioanalítica de detecção da piplartina em plasma de ratos foi desenvolvida e validada.

4.4.1. Desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica

Os dados apresentados nesta seção mostram os resultados obtidos com os procedimentos laboratoriais utilizados para demonstrar que o método analítico descrito é adequado e confiável para as análises propostas. O método analítico proposto foi desenvolvido e validado segundo os seguintes critérios: especificidade, recuperação, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade.

A determinação da piplartina em plasma de ratos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por espectrometria de massas no modo MS/MS utilizando a carbamazepina como padrão interno.

A piplartina e o padrão interno, carbamazepina, foram extraídos do plasma de ratos por meio de extração líquido-líquido utilizando tolueno. Após a extração, as amostras foram secas sob fluxo de ar comprimido, ressuspendidas em fase móvel, acetonitrila/água (70:30 v/v) mais 0,2 % de ácido acético, e analisados por HPLC com detecção por espectrometria de massas.

4.4.1.1. Especificidade

A figura 28 mostra os resultados encontrados. O método proposto mostrou-se específico, pois a análise da amostra de plasma de rato com piplartina mostrou que não foi encontrada interferência significativa no tempo de retenção do fármaco ou do padrão interno quando se compararam os cromatogramas obtidos do

plasma de ratos branco. Assim, o analito apresentou tempo de retenção de 3,45 minutos e m/z 317,42 > 220,9 e o padrão interno apresentou tempo de retenção de 2,93 minutos e m/z 236,4 > 193,83. Os tempos de retenção permaneceram inalterados durante todo o procedimento de validação e quantificação do fármaco.

4.4.1.2. Recuperação

Tendo em vista os critérios de validação para a eficiência do procedimento de extração utilizado no método analítico, a tabela 20 apresenta os resultados das análises da recuperação do fármaco e do padrão interno. Como pode ser observado na tabela, o analito apresentou as seguintes percentagens de recuperação referentes às análises do controle de qualidade baixo, médio e alto, respectivamente: 86.07 %, 68.62 % e 72,23 %.

4.4.1.3. Determinação do limite de quantificação

Os resultados das corridas analíticas, realizadas com cinco amostras extraídas com piplartina 2 ng/mL, permaneceram dentro dos critérios exigidos para determinação da menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. Deste modo, a resposta do pico para o limite de quantificação foi 5 vezes maior que qualquer interferência na amostra branco no tempo de retenção do fármaco, sendo esta resposta identificável e reproduzível com precisão de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão.

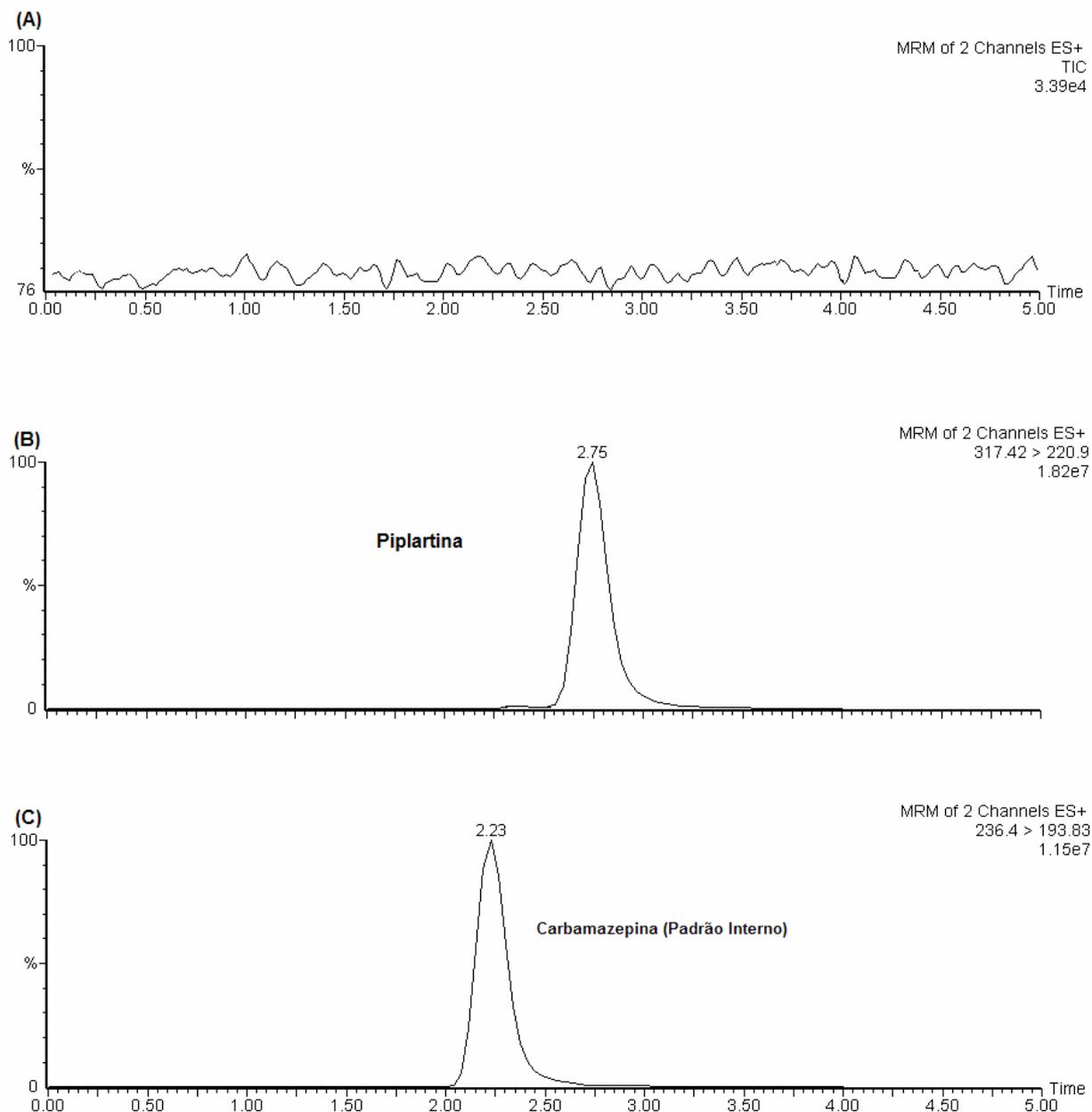


Figura 28 – Perfil cromatográfico mostrando a especificidade referente ao método analítico para quantificação da piplartina em plasma de ratos por HPLC com detecção por espectrometria de massas. (a) Plasma de ratos branco. (b) Plasma de ratos branco adicionado da piplartina (2 ng/mL). (c) Plasma de ratos branco adicionado de padrão interno (carbamazepina, 145 ng/mL). As análises foram realizadas em HPLC acoplada ao espectrômetro de massas (MS/MS) operando no modo positivo. Foi utilizada uma coluna C18 e acetonitrila e água (70:30, v/v) mais 0,2 % de ácido acético, como fase móvel, em um fluxo de 1 mL/min. As amostras foram submetidas à extração líquido-líquido.

Tabela 20 – Recuperação absoluta média do procedimento de purificação das amostras de plasma de ratos para a piplartina, empregando extração líquido-líquido. Os valores são apresentados como médias dos percentuais de recuperação e os respectivos valores de precisão, expressos em coeficientes de variação (C.V., %) de três análises independentes.

Concentração da piplartina (ng/mL)	Piplartina	
	Recuperação absoluta (%)	Precisão (C.V., %)
20	86,07	2,59
625	68,62	1,8
1250	72,23	3,29

4.4.1.4. Curva de calibração/linearidade

O método atendeu as especificações descritas tendo sido linear nas concentrações testadas de 2, 10, 50, 250, 500 e 1.250 ng/mL, e permitiu linearidade até 2.500 ng/mL com um coeficiente de correlação (r^2) maior que 0,98 ($r^2=0,9968$). Uma típica equação da reta foi: $y = 0,00838139 * x + 0,0230658$, onde y representa a razão entre a área do pico da piplartina e do padrão interno, e x representa a concentração da piplartina (figura 29).

A linearidade da metodologia foi validada uma vez que as análises, em triplicata, dos seis padrões de calibração apresentaram desvio menor que 20% em relação à concentração nominal do limite de quantificação (2 ng/mL), desvio menor que 15% em relação a concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração e coeficiente de correlação maior que 0,98.

4.4.1.5. Precisão e exatidão

Para obter a precisão e a exatidão, foram utilizadas 3 concentrações distintas dentro da faixa das concentrações esperadas, incluindo o limite de quantificação e as concentrações do controle de qualidade. Por definição, o coeficiente de variação (CV), para a precisão, não pode exceder 15% para cada concentração analisada (tolerância até 20% da concentração do limite de quantificação). Em se tratando da exatidão, deve estar dentro de 15% do valor atual em relação à média das amostras de cada concentração (tolerância até 20% da concentração do limite de quantificação). As análises da precisão e exatidão intra-ensaio e inter-ensaio estão apresentadas nas tabelas 21.

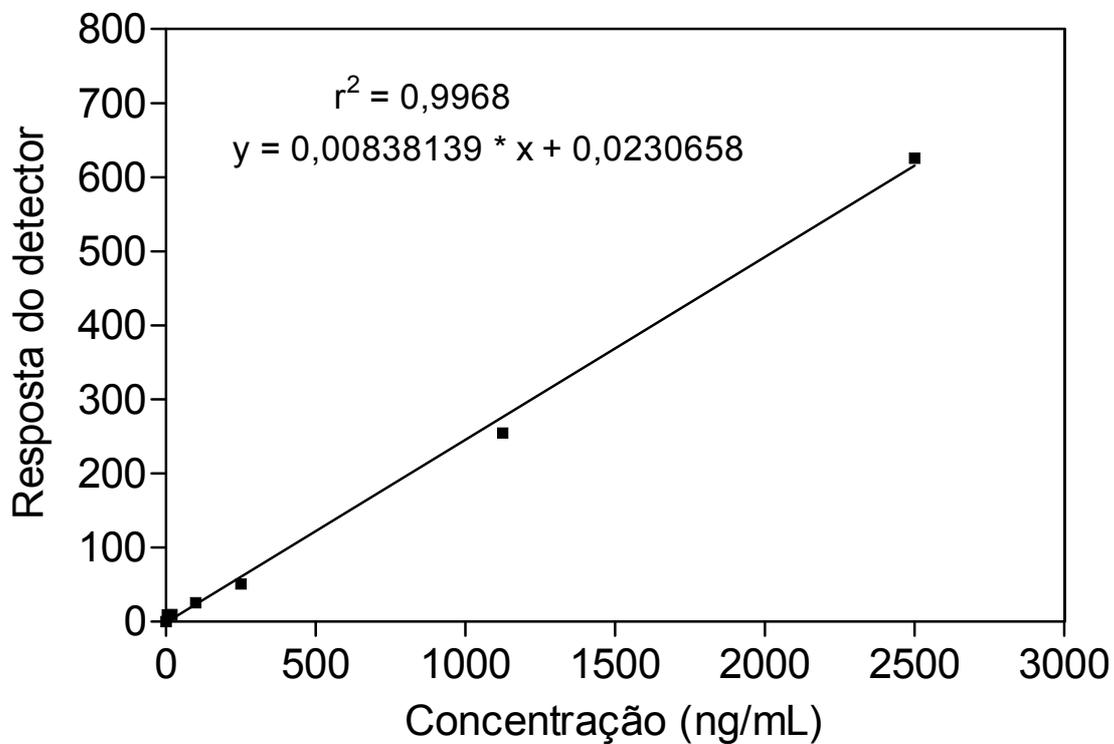


Figura 29 - Curva analítica mostrando a linearidade referente ao método analítico para quantificação da piplartina em plasma de ratos por HPLC com detecção por espectrometria de massas. A curva foi construída com intervalos de concentração de 2 a 2.500 ng/mL da piplartina. As amostras foram submetidas à extração líquido-líquido.

Tabela 21 - Precisão e exatidão intra-ensaio e inter-ensaio referentes ao método analítico para quantificação da piplartina em plasma de ratos por HPLC com detecção por espectrometria de massas. Cada valor representa a média de seis determinações para a precisão e exatidão intra-ensaio e cinco análises por dia durante 3 dias para a precisão e exatidão inter-ensaio.

Concentração (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Intra-ensaio			
20	18,59	6,70	-7,05
625	638,75	3,42	2,20
1.250	1205,22	4,03	-3,58
Inter-ensaio			
20	18,86	5,97	-5,70
625	630,41	3,73	0,87
1.250	1230,44	6,46	-1,56

4.4.1.6. Estabilidade

A tabela 22 apresenta os resultados das análises feitas com as amostras do controles de qualidade contendo piplartina submetidos aos três ciclos de congelamento e descongelamento ou após permanência á temperatura ambiente por 4 horas, respectivamente. A finalidade destes testes foi verificar a ocorrência de degradação de fração significativa do fármaco durante os ciclos ou durante a anlise das amostras.

Os resultados mostram que não houve alteração significativa na concentração no analito durante os três ciclos de congelamento e descongelamento ou após permanência à temperatura ambiente por 4 horas.

Tabela 22 – Estabilidade da piplartina em amostra de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas a temperatura de – 20 °C e submetidas a três ciclos de congelamentos e descongelamentos ou após permanência à temperatura ambiente por 4 horas. Cada resultado representa a média de três análises.

Concentração (ng/mL)	Piplartina (valor de P)^a
Ciclos de congelamentos e descongelamentos	
20	0,0821
1.250	0,0613
4 horas à temperatura ambiente	
20	0,0722
1.250	0,0687

^a $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (Student's t-test).

4.4.2. Estudo de disposição cinética da piplartina

As concentrações plasmáticas médias da piplartina, após a administração intraperitoneal de uma única dose de 50 mg/kg em ratos ($n = 3$ para cada tempo de coleta), estão sendo apresentadas na tabela 23.

A curva média de decaimento plasmático da piplartina, após a administração intraperitoneal de uma única dose de 50 mg/kg em ratos ($n = 3$ para cada tempo de coleta), está sendo apresentado na figura 30.

A tabela 24 apresenta os valores dos parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da curva de disposição cinética da piplartina, após a administração intraperitoneal de uma única dose de 50 mg/kg em ratos ($n = 3$ para cada tempo de coleta).

Tabela 23 – Concentrações plasmáticas da piplartina após a administração intraperitoneal de uma única dose de 50 mg/kg em ratos ($n = 3$ para cada tempo de coleta).

Tempo (h)	Concentração plasmática (ng/mL)
0	N.Q.
0,083	3.580 ± 157,7
0,166	3.255 ± 35,84
0,25	2.275 ± 54,49
0,5	1.805 ± 22,58
1	1.123 ± 114,6
2	650,5 ± 140,7
3	479,9 ± 17,34
6	331,7 ± 51,52
12	274,6 ± 39,28
24	46,57 ± 2,66

N.Q. Valores não quantificáveis. Os valores estão sendo mostrados como média ± E.P.M.

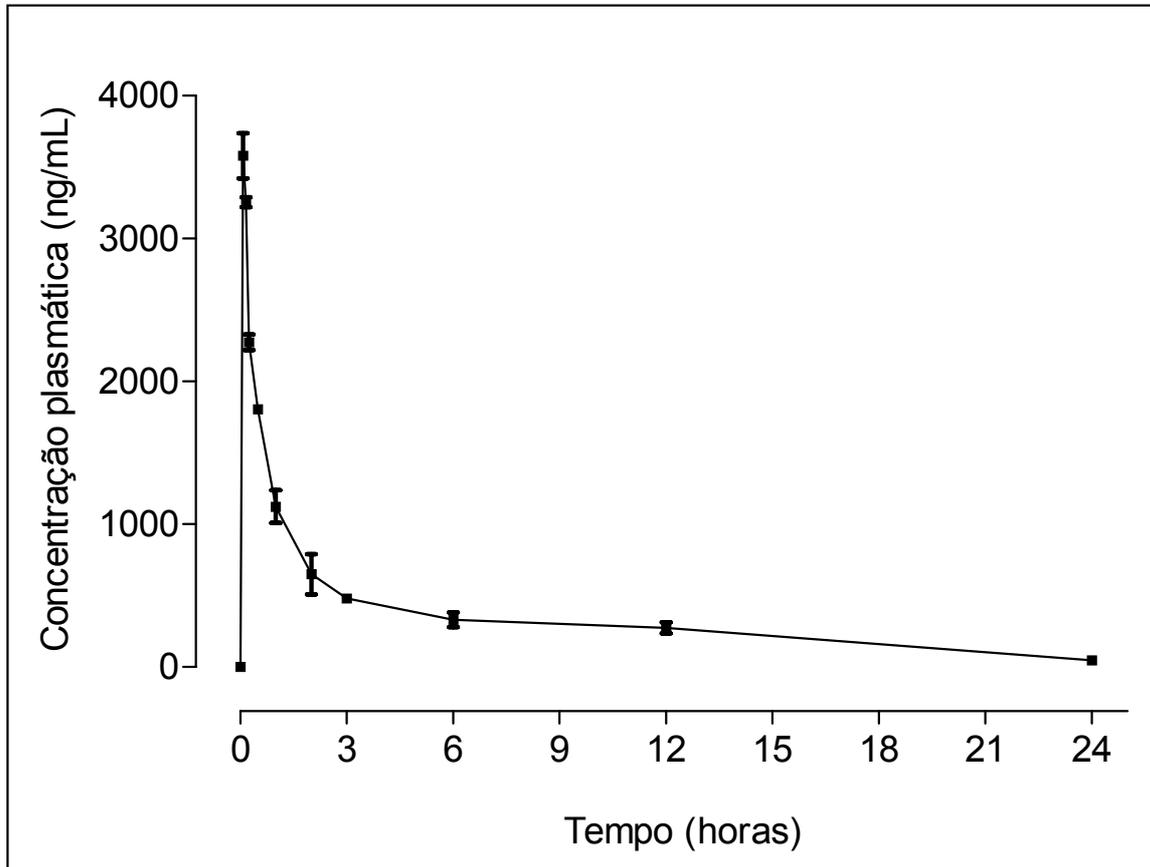


Figura 30 – Curva de decaimento plasmático da piplartina após a administração intraperitoneal de uma única dose de 50 mg/kg em ratos ($n = 3$ para cada tempo de coleta).

Tabela 24 – Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da curva de disposição cinética da piplartina, após a administração intraperitoneal de uma única dose de 50 mg/kg em ratos ($n = 3$ para cada tempo de coleta).

Símbolo	Resultados
AUC_{0-24h}	8.471,26 ng/h/L
AUC_{0-∞}	8.505,25 ng/h/L
C_{max}	3.580,0 ng/mL
Cl	5,88 L/kg/h
K_{el}	1,37 h
t_{1/2}	0,5 h
T_{max}	0,083 h
Vd	13.888,9 L

4.5. Avaliação da associação do 5-Fluourouracil com a piplartina

Na avaliação da associação do 5-Fluourouracil com a piplartina, foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo*. O efeito da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina foi avaliado *in vitro* sobre a proliferação de células tumorais humana. Os efeitos dos tratamentos com a piplartina (50 mg/kg/dia), o 5-FU (10 mg/kg/dia) ou a associação do 5-FU (10 mg/kg/dia) com a piplartina (50 mg/kg/dia) foram avaliados em camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180. Adicionalmente, análises histopatológicas, bioquímicas e hematológicas foram realizadas com o intuito de avaliar efeitos tóxicos causados pelo tratamento dos animais com os compostos.

4.5.1. Avaliação da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina sobre a proliferação de células tumorais humanas *in vitro*

A tabela 25 apresenta os valores de CI_{50} obtidos para o 5-FU na presença e na ausência da piplartina. A concentração de 5-FU que causa 50% de inibição da proliferação celular (CI_{50}) em células HL-60, MDA-MB-435, SF-295 e HCT-8 foi 84,68, 9,19, 2,33 e 11,18 μ M, respectivamente. A piplartina aumentou a eficácia do 5-FU, como observado pelo menor valor de CI_{50} . Por exemplo, quando o 5-FU foi usado em combinação com a piplartina o valor de CI_{50} diminuiu de 2,33 para 0,49 μ M em células SF-295.

Tabela 25 – Efeito da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina sobre a proliferação de células tumorais humanas.

Linhagens	5-Fluorouracil	
	Cl ₅₀ (µM)	
	-	Piplartina (5µM)
HCT-8	11,18 ± 0,71	4,70 ± 0,55 ^a
SF-295	2,33 ± 0,51	0,49 ± 0,11 ^a
HL-60	84,68 ± 0,66	38,13 ± 0,43 ^a
MDA-MB-435	9,19 ± 0,85	1,95 ± 0,27 ^a

A tabela apresenta os valores de Cl₅₀ ± E.P.M. de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata pelo método do MTT após 72 horas de exposição com as células HL-60 (leucemia promielocítica), HCT-8 (côlon), SF-295 (glioblastoma) e MDA-MB-435 (melanoma) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0. a, $P < 0,05$ quando comparado com o 5-FU na ausência da piplartina por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.5.2. Avaliação do efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre a massa tumoral de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180

O efeito da associação do 5-FU com a piplartina em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 esta apresenta na figura 31. Houve redução significativa ($P < 0,05$) dos tumores de animais tratados com o 5-FU e com a piplartina, bem como de animais tratados com o 5-FU associado com a piplartina. No 8º dia após o transplante do tumor, a massa tumoral média dos animais controle foi de $1,90 \pm 0,12$ g, enquanto que dos animais tratados com a piplartina foi de $1,43 \pm 0,12$ g e $0,99 \pm 0,10$ g dos tratados com o 5-FU. Quando os animais foram tratados com o 5-FU associado com a piplartina, a massa tumoral foi de $0,61 \pm 0,10$ g. Houve diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) entre a piplartina, o 5-FU ou o tratamento do 5-FU associado com a piplartina em relação ao controle e entre si.

O percentual de inibição tumoral da piplartina foi de 24,61 %, enquanto que para o 5-FU foi de 47,71 %. O percentual de inibição do 5-FU aumentou para 68,04 % quando associado à piplartina. Assim, os resultados mostram que o efeito da associação do 5-FU com a piplartina sobre a massa tumoral de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 é do tipo adição. Isso indica que a piplartina pode aumentar a atividade antitumoral de agentes antineoplásicos, como observado para o quimioterápico 5-FU.

As análises histopatológicas dos tumores (figura 32) retirados de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 do grupo controle mostraram características de neoplasia maligna 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 a piplartina, o 5-FU ou pela associação do 5-FU com a piplartina, as áreas de necrose de coagulação foram mais extensas do que as observadas nos animais do grupo controle, demonstrando morte celular.

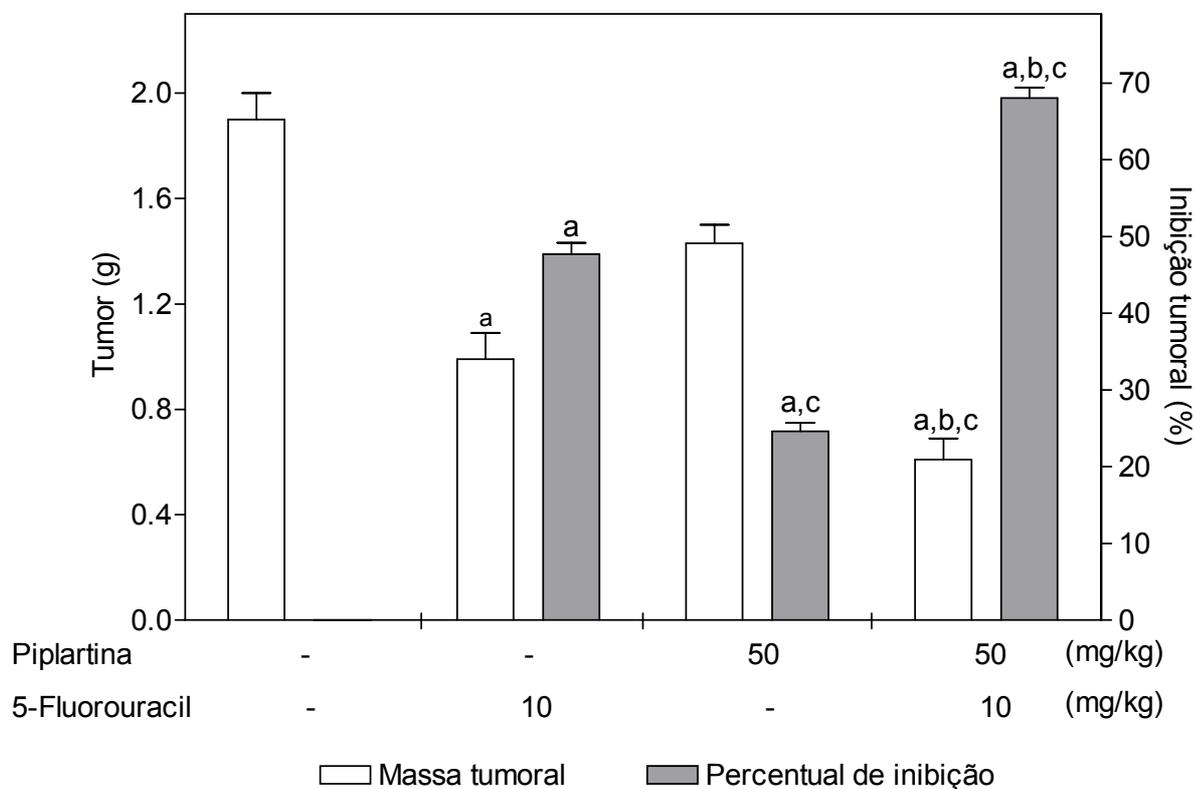


Figura 31 – Efeito da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina sobre a massa tumoral de animais transplantados com o tumor Sarcoma 180. O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir os compostos (DMSO 10%). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de dez animais. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. b, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo tratado com a piplartina por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. c, $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado com o 5-FU por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

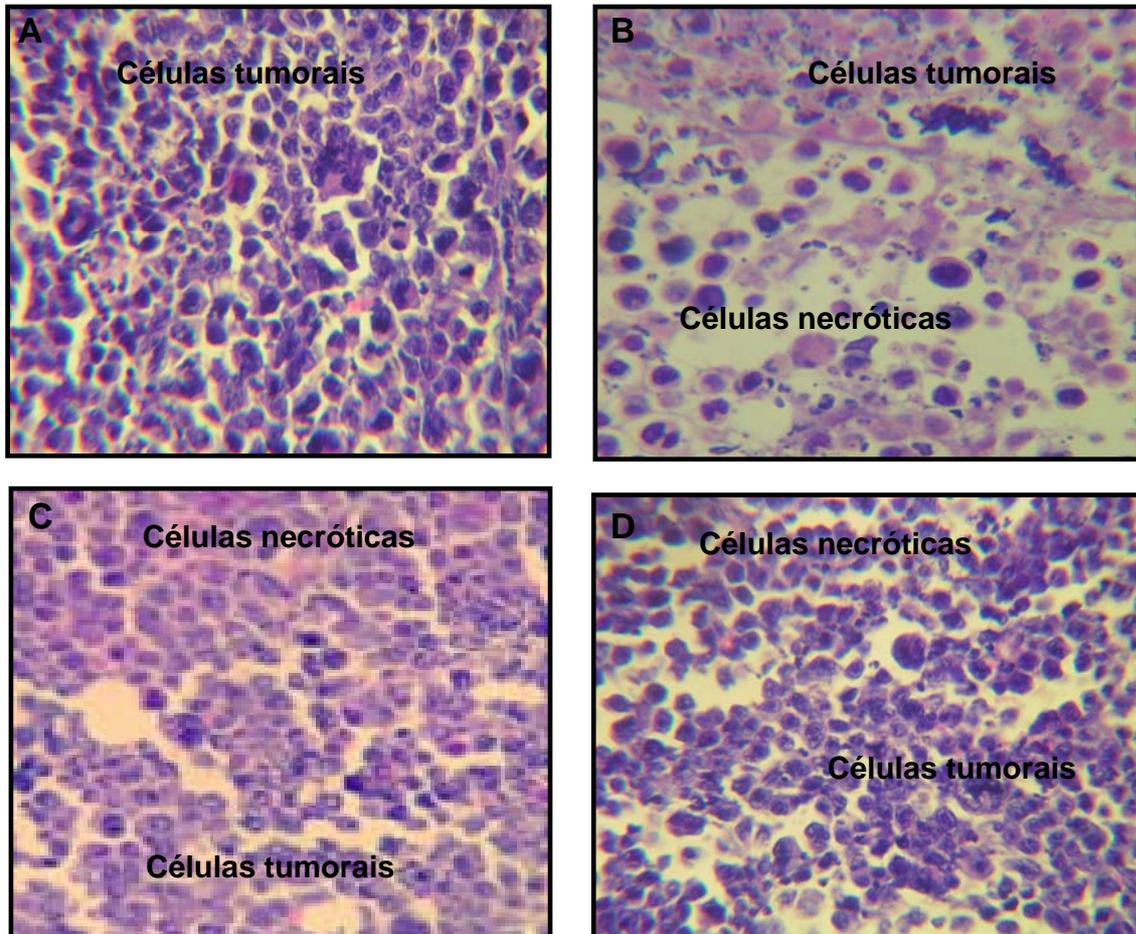


Figura 32 - Histopatologia dos tumores de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180. O controle negativo (**A**) foi tratado com o veículo usado para diluir o composto (DMSO 10%). Os animais foram tratados com o 5-fluorouracil (10 mg/Kg, **B**), piplartina (50 mg/Kg, **C**) ou pela associação (**D**) do 5-fluorouracil (10 mg/Kg) com a piplartina (50 mg/Kg). Aumento de 400X.

4.5.3. Avaliação dos aspectos toxicológicos

4.5.3.1. Efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180

A tabela 26 apresenta os resultados encontrados. Nenhuma diferença foi encontrada na massa corpórea dos animais tratados quando comparados com o grupo controle ($P > 0,05$). Em relação à massa úmida dos órgãos (fígado, baço e rins) dos animais tratados com a piplartina ou 5-FU associado com a piplartina em camundongos, saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180, não foram observadas alterações ($P > 0,05$). Por outro lado, o tratamento dos animais com 5-FU causou significativa ($P < 0,05$) redução da massa dos baços, quando comparado com o grupo controle.

Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao tamanho dos baços dos camundongos saudáveis e transplantados com o tumor Sarcoma 180. A massa úmida do baço dos camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 ($0,56 \pm 0,03$ g para o grupo salina) apresentou-se aumentada em relação a dos camundongos saudáveis ($0,23 \pm 0,02$ g para o grupo salina), sugerindo uma esplenomegalia e hematopoiese esplênica induzida pelo tumor Sarcoma 180. Não foram encontradas diferenças na massa úmida dos demais órgãos analisados em relação a camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 ou camundongos saudáveis.

Tabela 26 – Efeito da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos (fígado, rins e baço) de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180.

Substâncias	Dose (mg/kg)	Aumento na massa corpórea (g)	Fígado (g/100g de massa corpórea)	Baço (g/100g de massa corpórea)	Rins (g/100g de massa corpórea)
Camundongos saudáveis					
Salina	-	3,24 ± 1,19	4,51 ± 0,18	0,23 ± 0,02	1,09 ± 0,03
DMSO 10%	-	3,15 ± 1,02	4,29 ± 0,20	0,40 ± 0,08	1,11 ± 0,05
5-FU	10	2,87 ± 1,06	4,57 ± 0,27	0,45 ± 0,01	1,05 ± 0,08
Piplartina	50	2,98 ± 1,04	4,28 ± 0,40	0,31 ± 0,04	1,15 ± 0,05
Piplartina + 5-FU	50 + 10	3,05 ± 1,00	4,32 ± 0,22	0,33 ± 0,08	1,14 ± 0,04
Camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180					
Salina	-	4,99 ± 1,05	5,22 ± 0,09	0,56 ± 0,03 ^b	1,32 ± 0,05
DMSO 10%	-	4,64 ± 1,03	5,05 ± 0,12	0,62 ± 0,08 ^b	1,15 ± 0,09
5-FU	10	4,48 ± 1,11	4,26 ± 0,52	0,40 ± 0,10 ^a	1,06 ± 0,03
Piplartina	50	4,56 ± 1,15	4,58 ± 0,26	0,63 ± 0,05 ^b	1,04 ± 0,05
Piplartina + 5-FU	50 + 10	4,81 ± 1,06	5,07 ± 0,87	0,62 ± 0,24 ^b	1,19 ± 0,10

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de dez animais. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo (DMSO 10%) experimental por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. b, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo salina de animais saudáveis por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.5.3.2. Efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180

A tabela 27 apresenta os resultados encontrados. Não foram encontradas alterações significantes ($P > 0,05$) nos níveis plasmáticos dos parâmetros bioquímicos analisados em nenhum dos grupos tratados seja de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180. Entretanto, foi observado um discreto aumento nos níveis plasmáticos da AST em camundongos saudáveis tratados com DMSO 10% ($108,0 \pm 4,6$ UI/L) quando comparados com o grupo salina ($82,3 \pm 11,5$ UI/L), sugerindo uma leve hepatotoxicidade intrínseca do DMSO 10%. O mesmo foi observado quando o grupo salina de camundongos saudáveis ($82,3 \pm 11,5$ UI/L) foi comparado com o grupo salina de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 ($113,9 \pm 9,7$ UI/L), agora sugerindo uma leve hepatotoxicidade intrínseca do tumor sarcoma 180. De qualquer modo, nenhuma dessas alterações foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Em relação aos níveis da ALT ou uréia não foi encontrada nenhuma alteração seja em relação aos grupos controle DMSO 10% ou salina, seja em relação aos grupos de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180.

Tabela 27 – Efeito da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina sobre os parâmetros bioquímicos (aspartato aminotransferase - AST, alanina aminotransferase – ALT e uréia) de sangue periférico de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180.

Substâncias	Dose (mg/kg)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	Uréia (mg/dL)
Camundongos saudáveis				
Salina	-	82,3 ± 11,5	52,1 ± 9,3	34,1 ± 6,2
DMSO 10%	-	108,0 ± 4,6	47,9 ± 12,7	29,8 ± 8,5
5-FU	10	115,9 ± 10,5	45,8 ± 11,3	29,2 ± 9,3
Piplartina	50	112,9 ± 9,3	41,8 ± 7,4	40,4 ± 5,2
Piplartina + 5-FU	50 + 10	99,0 ± 12,9	58,9 ± 9,2	37,5 ± 3,2
Camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180				
Salina	-	113,9 ± 9,7	45,2 ± 15,9	28,5 ± 6,1
DMSO 10%	-	106,4 ± 9,6	50,8 ± 10,7	31,6 ± 9,1
5-FU	10	119,6 ± 14,1	35,9 ± 14,3	27,5 ± 5,3
Piplartina	50	112,9 ± 9,3	41,8 ± 7,4	40,4 ± 5,2
Piplartina + 5-FU	50 + 10	99,0 ± 12,9	58,9 ± 9,2	37,5 ± 3,2

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de cinco animais.

4.5.3.3. Efeito da associação do 5-fluorouracil com a piplartina sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180

A tabela 28 apresenta os resultados encontrados. Em todos os camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180, incluindo os grupos controle tratados apenas com solução salina ou DMSO 10%, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) no número total de leucócitos circulantes quando comparado com os camundongos saudáveis. Além disso, houve uma diferença significativa ($P < 0,05$) na relação do percentual de linfócitos e neutrófilos circulantes nos grupos controles de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 (linfócito 56,8 % e neutrófilos 39,5 % para o grupo salina) em relação aos camundongos saudáveis (linfócito 70,52 % e neutrófilos 16,2 % para o grupo salina), sugerindo que o tumor Sarcoma 180 pode estar atuando na produção de fator estimulador de colônia.

Quando os camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180 foram tratados com o 5-FU, uma redução significativa ($P < 0,05$) no número de leucócitos foi observada. Já o tratamento dos animais transplantados com o tumor Sarcoma 180 com a piplartina não modificou o número de leucócitos circulantes e ainda normalizou a alteração na proporção dos leucócitos. A associação do 5-FU com a piplartina reduziu a leucopenia induzida pelo 5-FU e ainda normalizou as percentagens de leucócitos circulantes. Não foram encontradas alterações nos parâmetros hematológicos analisados em camundongos saudáveis tratados com a piplartina.

Tabela 28 – Efeito da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina sobre os parâmetros hematológicos (hemoglobina, plaquetas e leucócitos) de sangue periférico de camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180.

Substâncias	Dose (mg/kg)	Hemoglobina (g/dL)	Plaquetas (10 ⁷ céls/ μ L)	Leucócitos totais (10 ³ céls/ μ L)	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
					Eosinófilo	Linfócito	Neutrófilo	Monócito
Camundongos saudáveis								
Salina	-	14,15 \pm 0,41	8,91 \pm 0,47	5,66 \pm 0,52	0,98	77,52	16,2	5,3
DMSO 10%	-	13,25 \pm 0,53	7,42 \pm 0,59	4,25 \pm 0,43	0,8	69,62	23,0	7,0
5-FU	10	12,49 \pm 0,53	8,02 \pm 0,39	3,04 \pm 0,23 ^a	1,3	55,4 ^a	40,0 ^a	3,3
Piplartina	50	14,34 \pm 0,83	6,98 \pm 0,45	6,69 \pm 0,44	1,3	78,5	12,9	7,3
Piplartina + 5-FU	50 + 10	13,9 \pm 0,21	7,42 \pm 0,59	5,73 \pm 0,77 ^c	0,79	65,9	26,9	6,4
Camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180								
Salina	-	13,02 \pm 0,32	7,1 \pm 0,65	8,18 \pm 0,53 ^a	1,0	56,8 ^a	39,5 ^a	2,7
DMSO 10%	-	12,04 \pm 0,53	8,6 \pm 0,53	7,95 \pm 0,78 ^a	1,0	53,9 ^a	42,3 ^a	2,8
5-FU	10	12,42 \pm 0,49	9,2 \pm 0,62	3,32 \pm 0,42 ^{a,b}	1,6	52,3 ^a	42,9 ^a	3,2
Piplartina	50	14,58 \pm 0,72	9,5 \pm 1,20	9,65 \pm 1,05 ^a	0,9	69,2	26,4	3,5
Piplartina + 5-FU	50 + 10	12,45 \pm 0,69	9,4 \pm 0,78	6,19 \pm 0,98 ^{a,c}	1,9	72,6 ^b	21,0 ^b	4,5

A tabela apresenta os valores correspondentes à média \pm E.P.M. de cinco animais. a, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo salina de camundongos saudáveis por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. b, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo salina de camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180 por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. c, $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado com o 5-FU experimental por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.5.3.4. Análise histopatológica dos órgãos de camundongos, saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180, tratados com o 5-fluorouracil associado com a piplartina

As análises histopatológicas dos fígados e rins dos animais tratados com a piplartina, o 5-FU ou tratados com a associação do 5-FU com a piplartina mostraram leve hepatotoxicidade e nefrotoxicidade desses compostos nas doses testadas.

Alguns dos achados histopatológicos incluíram hiperplasia das células de Kupffer, áreas de congestão venosa centrolobular, infiltrado local de células inflamatórias crônicas, intensa tumefação turva dos hepatócitos e hemorragia sinusoidal para o fígado (figura 33) e discretas alterações no epitélio tubular proximal, com preservação da estrutura glomerular, para os rins (figura 34). Todos os achados histológicos foram encontrados tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados, entretanto foram mais evidentes nos animais tratados com o 5-FU e tratados com a associação do 5-FU com a piplartina. Não foram encontradas diferenças em relação aos camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180.

As análises histopatológicas dos baços (figura 35) dos animais tratados com a piplartina apresentaram poupa branca circunscrita, megacariócitos por toda extensão e folículos linfóides evidentes. Por outro lado, não foram evidenciadas alterações significantes nos outros grupos experimentais em comparação com o grupo controle.

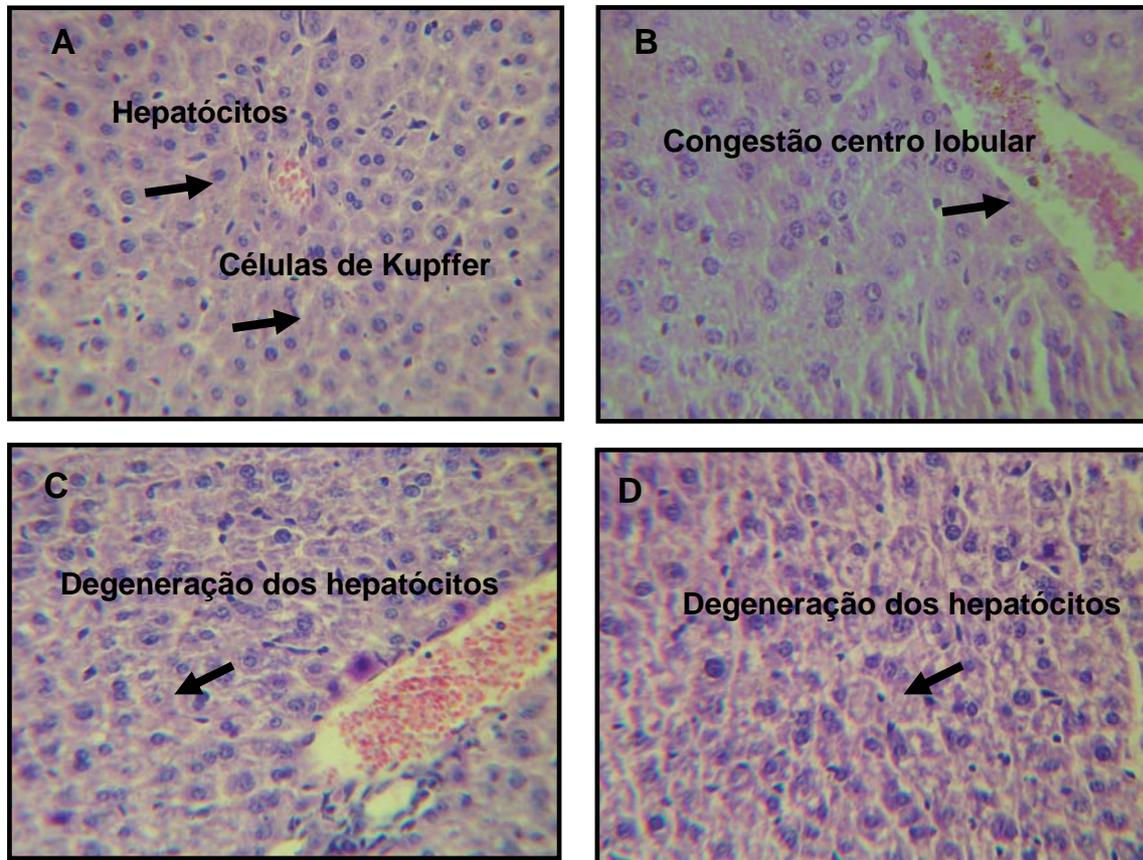


Figura 33 - Histopatologia dos fígados de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180. O controle negativo (**A**) foi tratado com o veículo usado para diluir o composto (DMSO 10%). Os animais foram tratados com o 5-fluorouracil (10 mg/Kg, **B**), piplartina (50 mg/Kg, **C**) ou pela associação (**D**) do 5-fluorouracil (10 mg/Kg) com a piplartina (50 mg/Kg). Aumento de 400X.

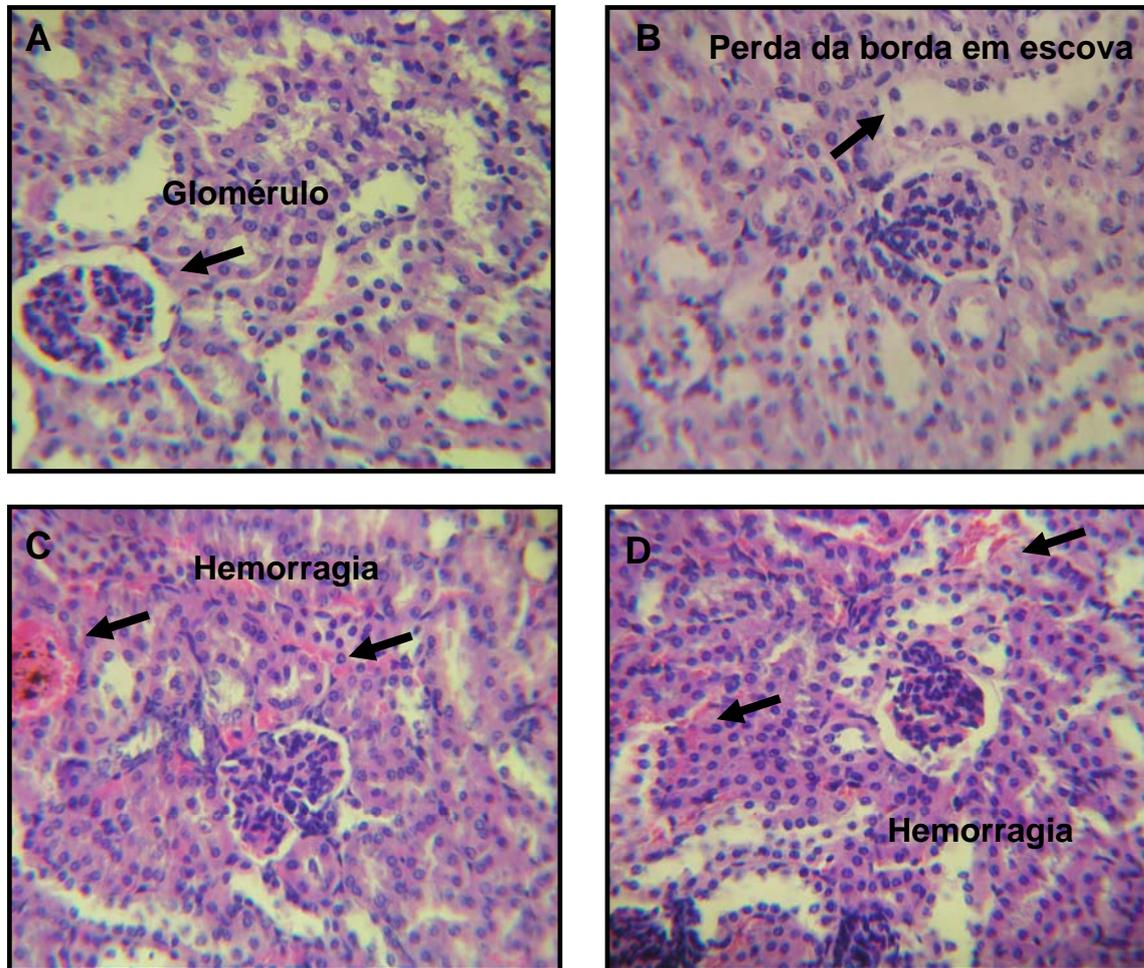


Figura 34 - Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180. O controle negativo (**A**) foi tratado com o veículo usado para diluir o composto (DMSO 10%). Os animais foram tratados com o 5-fluorouracil (10 mg/Kg, **B**), piplartina (50 mg/Kg, **C**) ou pela associação (**D**) do 5-fluorouracil (10 mg/Kg) com a piplartina (50 mg/Kg). Aumento de 400X.

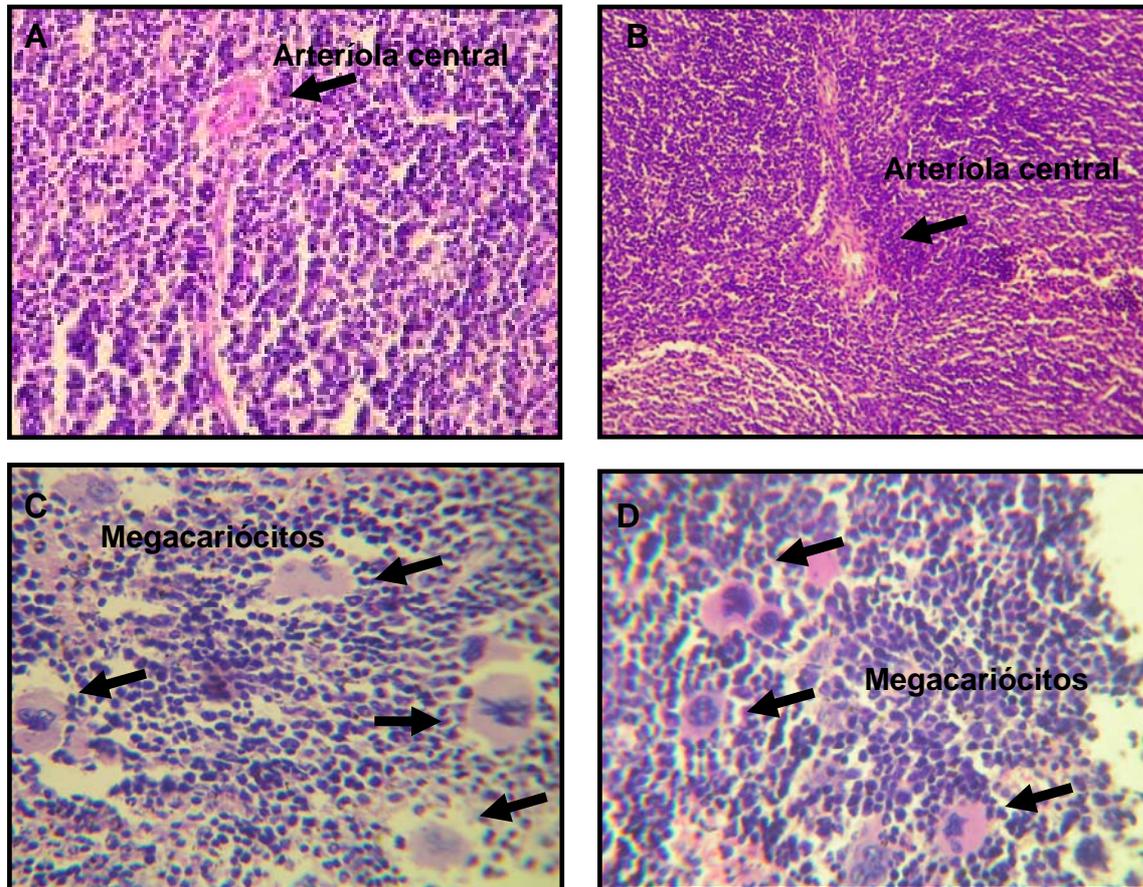


Figura 35 - Histopatologia dos baços de camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir o composto (DMSO 10%). Os animais foram tratados com o 5-fluorouracil (10 mg/Kg, B), piplartina (50 mg/Kg, C) ou pela associação (D) do 5-fluorouracil (10 mg/Kg) com a piplartina (50 mg/Kg). Aumento de 400X.

4.6. Resumo dos resultados obtidos com a piplartina

No estudo da relação estrutura-atividade, o grupo carbonila α - β -insaturada do anel amídico mostrou ser essencial para atividade citotóxica da piplartina. O índice de seletividade foi de aproximadamente 45 vezes, quando comparada a sua atividade citotóxica em linhagem leucêmica *versus* PBMC. Seu mecanismo de ação está relacionado com bloqueio do ciclo celular na fase G_2 e induziu morte celular por apoptose com participação da via intrínseca (via mitocondrial).

A piplartina apresentou-se como um agente genotóxico, quando avaliado pelo teste do cometa, sugerindo a quebra da fita dupla do DNA como principal responsável por esse efeito. Esta não foi mutagênica para a bactéria *S. typhimurium*, quando testada no ensaio de Ames (modelo procariótico) na ausência e na presença da fração S9. Entretanto, apresentou-se como um potente agente mutagênico e recombinogênico para a levedura *S. cerevisiae* (modelo eucariótico). A atividade genotóxica/mutagênica da piplartina foi confirmada no modelo do micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Em relação ao estudo farmacocinético, o método bioanalítico desenvolvido e validado para a quantificação da piplartina em plasma de ratos apresentou-se específico, sensível, preciso e exato, justificando sua aplicação em estudos farmacocinéticos. Quando submetida a um estudo de disposição cinética, a piplartina apresentou um perfil de absorção característico de um modelo monocompartimental. Esta apresentou os seguintes valores para os parâmetros farmacocinéticos: $AUC_{0-24} = 8.471,26$ ng/h/L, $AUC_{0-\infty} = 8.505,25$ ng/h/L, $C_{max} = 3.580,00$ ng/mL, $Cl = 5,88$ L/h, $Vd = 13.888,9$ L, $K_{el} = 1,37$ h, $t_{1/2} = 0,5$ h e $T_{max} = 0,083$ h.

Por fim, a piplartina aumentou o efeito antitumoral do quimioterápico 5-FU e ainda diminuiu seus efeitos colaterais.

A tabela 29 mostra, de forma resumida, todos os resultados encontrados aqui com o estudo da atividade citotóxica da piplartina.

Tabela 29 – Resumo dos resultados encontrados para o estudo da atividade citotóxica da piplartina.

Estudo	Resultados
1. Estudo da atividade citotóxica	
1.1. Relação estrutura-atividade	O grupo carbonila α - β -insaturada do anel amídico é essencial para a atividade citotóxica
1.2. Seletividade	Aproximadamente 45X
2. Estudo do mecanismo de ação citotóxico	
2.1. Efeito sobre a indução de morte celular	Apoptose com participação da via intrínseca
2.2. Efeito sobre o ciclo celular	Parada em G ₂
3. Estudo da atividade genotóxica e mutagênica	
3.1. Ensaio do cometa	Genotóxico
3.2. Estudo do mecanismo de ação genotóxico	
3.2.1. Efeito sobre a indução de morte celular	Apoptose com participação da via intrínseca
3.2.2. Efeito sobre o ciclo celular	Parada em G ₂ /M
3.3. Ensaio de Ames (modelo procariótico)	Não mutagênico
3.4. Ensaio com <i>S. cerevisiae</i> (modelo eucariótico)	Mutagênico
3.5. Ensaio do micronúcleo <i>in vivo</i>	Mutagênico
4. Estudo farmacocinético	
4.1. Validação do método	Sensível, preciso e exato
4.2. Estudo de disposição cinético	Modelo monocompartimental
5. Estudo da associação do 5-FU com a piplartina	
5.1. Ensaio <i>in vitro</i>	Potencializa o 5-FU
5.2. Ensaio <i>in vivo</i>	Potencializa o 5-FU
5.2.1. Toxicidade	
5.2.1.1. Parâmetros bioquímicos	Não alterado
5.2.1.2. Parâmetros hematológicos	Previne leucopenia induzida pelo 5-U
5.2.1.3. Análise histopatológica	Leve hepatotoxicidade e nefrotoxicidade

Discussão

5. Discussão

Os produtos naturais apresentam atividades biológicas altamente específicas baseadas em novos mecanismos de ação. Assim, os produtos naturais continuam sendo uma das principais fontes de novos compostos para o desenvolvimento de novos fármacos (PEZZUTO, 1997; NEWMAN *et al.*, 2003; AGGARWAL & SHISHODIA, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2007).

A piplartina, um conhecido alcalóide amida encontrado em algumas pimentas (*Piper spp.* – Piperaceae), apresenta atividades biológicas diversas. Dentre estas atividades, destaca-se a atividade anticâncer. A piplartina apresentou citotoxicidade, em várias linhagens de células tumorais humanas, e atividade antimitótica, em ovos de ouriço do mar (DUH *et al.*, 1990a; DUH *et al.*, 1990b; TSAI *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2007). Além disso, quando submetida a testes pré-clínicos *in vivo*, esta reduziu o crescimento de células da linhagem tumoral Sarcoma 180, o que a confere um promissor potencial antitumoral (BEZERRA *et al.*, 2006). A atividade antiproliferativa da piplartina parece está relacionada com a da síntese de DNA e indução de morte celular por ambas as vias, apoptose e necrose (BEZERRA *et al.*, 2007).

Com o objetivo de melhor entender a atividade anticâncer deste produto natural, aqui foi realizado um estudo farmacológico no que se diz respeito às propriedades anticâncer da piplartina. Inicialmente, foram avaliadas a relação estrutura-atividade citotóxica da piplartina e sua seletividade em relação a células normais e tumorais. Foi também estudado o mecanismo de ação citotóxico deste composto.

O produto natural não precisa ser necessariamente o melhor composto para o uso farmacêutico (KINGSTON, 1996). Esses compostos podem servir como protótipo para o desenho 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 estudo da relação estrutura-atividade biológica.

Apesar das inúmeras vantagens das novas técnicas de estudo da relação estrutura-atividade, onde novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos pela análise de dados teóricos, obtidos por técnicas recentes de modelagem molecular, as técnicas tradicionais de modificação molecular e relação estrutura-atividade, apesar de serem dispendiosas e requer extenso período de investigação, são, ainda, de suma importância na descoberta e na caracterização de novos fármacos (WERMUTH *et al.*, 1998; THOMAS, 2000).

Os estudos clássicos da relação estrutura-atividade exigem a síntese de diversos análogos, estruturalmente relacionados a um composto protótipo, e a realização de sucessivos testes de atividade biológica. Assim, é possível estabelecer algumas generalizações sobre a influência de mudanças estruturais específicas nos efeitos biológicos, incluindo o tamanho e formato da cadeia carbônica, a natureza e o grau de substituição e a estereoquímica de um composto protótipo (THOMAS, 2000).

Assim, com o intuito de avaliar a relação estrutura-atividade citotóxica da piplartina, cinco derivados foram sintetizados e avaliados quanto ao seu potencial citotóxico. Entretanto, nenhum dos análogos (sintetizados) da piplartina (**30-34**) apresentam atividade citotóxica nas linhagens de células tumorais testadas.

Certos grupos funcionais são essenciais para a atividade biológica, como os aceptores de Michael, como a carbonila α - β -insaturada, que é reconhecida como grupo químico responsável pela atividade citotóxica de compostos orgânicos em geral por interagirem com o DNA e/ou proteínas (NAKAYACHI *et al.*, 2004; AHN & SOK, 1996). Duh *et al.* (1990b) sugeriram que os dois grupos carbonila α - β -insaturada presente na estrutura da piplartina era responsável pela atividade citotóxica desta molécula. De fato, a redução das insaturações nos grupos carbonila α , β -insaturada da piplartina levou a um composto (**30**) (tabela 30, em amarelo e verde) não citotóxico. Isto confirma que os dois grupos carbonila α - β -insaturada são grupos importantes para a atividade citotóxica da piplartina (tabela 30, em vermelho e azul), sugerindo que a piplartina pode estar atuando como um acceptor de Michael e, assim, sua atividade citotóxica pode estar relacionada com a interação desta molécula com o DNA celular.

Adicionalmente, derivados hidrolizados ou/e com a presença de 2-diaminoetano, ester dimetil ou grupo tiofeno mostraram-se como uma alternativa inviável quando se desejou aumentar a atividade citotóxica do composto natural, pela obtenção dos compostos (**31-34**). De todo modo, estes compostos apresentam um dos dois grupos carbonila α - β -insaturada (tabelas 30 e 31, em vermelho) e não são citotóxicos, sugerindo que apenas um dos grupos é essencial para a atividade citotóxica. Assim, apenas a carbonila α - β -insaturada do anel amídico é importante para a atividade citotóxica da piplartina. De fato, o *N*-(3-metoxi-4,5-metilenodioxidihidrocinaoíl)- Δ^3 -piridin-2-ona (**35**) (tabela 31, em azul), um composto estruturalmente relacionado com a piplartina, é citotóxico e apenas apresenta a carbonila α - β -insaturada do anel amídico (DUH *et al.*, 1990a). Além disso, diferentes grupos funcionais do anel benzeno (*N*-(3,4-dimetoxicinaoíl)- Δ^3 -piridin-2-ona (**36**) e *N*-(3-metoxi-4,5-metilenodioxicinaoíl)- Δ^3 -piridin-2-ona (**37**)) não alteram a atividade citotóxica do composto (tabela 31, em verde pardo), sugerindo que estes radicais pouco interferem na atividade anticâncer (DUH *et al.*, 1990b). Entretanto, o 5,6-dihidro-2(1*H*)-piridona (**38**) (tabela 31, em azul), a carbonila α - β -insaturada no anel amídico sem o restante da estrutura da piplartina, o qual parece ser o grupo farmacofórico para a atividade citotóxica deste composto, não é citotóxico (TSAI *et al.*, 2005). Portanto, podemos concluir que apesar da carbonila α - β -insaturada do anel amídico ser essencial para atividade citotóxica da piplartina outros grupos da molécula também contribuem, de alguma forma, para a sua atividade anticâncer.

Tabela 30 – Estrutura química de compostos relacionados à piplartina.

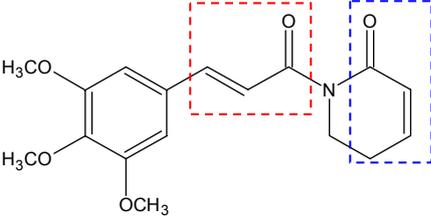
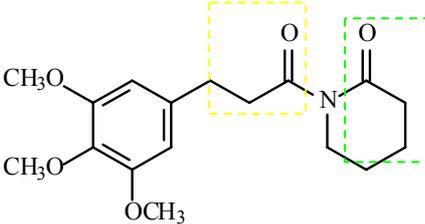
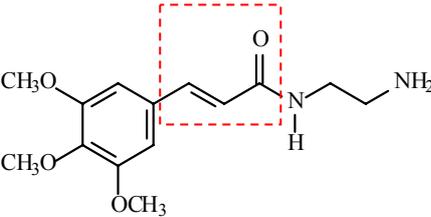
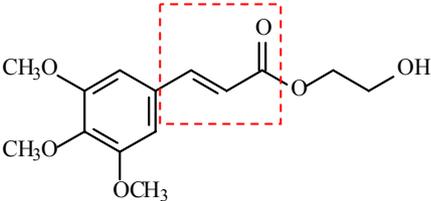
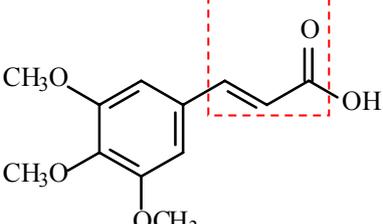
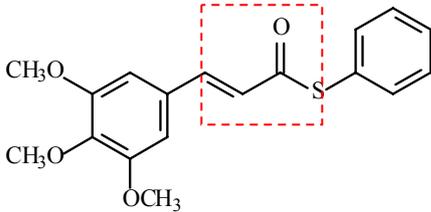
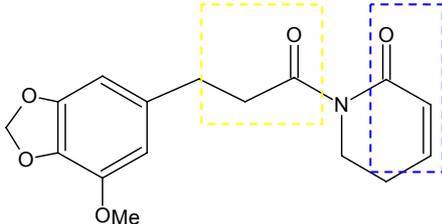
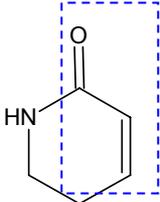
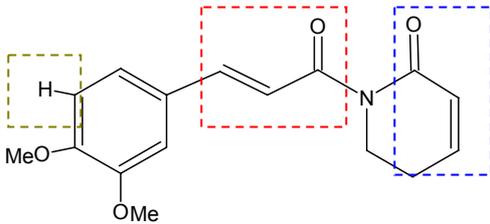
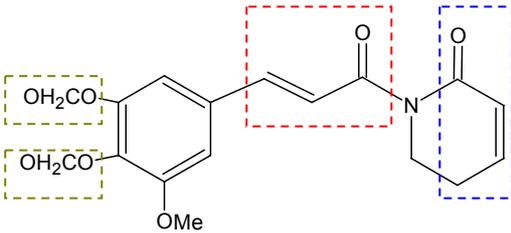
Composto	Estrutura química	Faixa de Cl_{50} [$\mu\text{g/mL}$] (μM)	Referências
Piplartina		0,1 – 2,7 (0,3 – 8,5)	DUH <i>et al.</i> , 1990a,b; TSAI <i>et al.</i> , 2005; BEZERRA <i>et al.</i> , 2005; 2007
(30)		>25 (77,9)	Presente trabalho
(31)		>25 (93,6)	Presente trabalho
(32)		>25 (88,6)	Presente trabalho
(33)		>25 (105,0)	Presente trabalho

Tabela 31 – Estrutura química de compostos relacionados à piplartina (continuação).

Composto	Estrutura química	Faixa de CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$] (μM)	Referências
(34)		>25 (75,8)	Presente trabalho
(35)		2,2 – 5,8 (7,7 – 20,0)	DUH <i>et al.</i> , 1990a
(38)		>50 (515,5)	TSAI <i>et al.</i> , 2005
(36)		0,8 – 3,2 (2,9 – 11,3)	DUH <i>et al.</i> , 1990b
(37)		0,4 – 2,6 (1,2 – 7,4)	DUH <i>et al.</i> , 1990b

A quimioterapia clássica tem como mecanismo fundamental a inibição não-seletiva da proliferação celular. A maior parte dos alvos moleculares sobre os quais os quimioterápicos atuam estão também presentes em células não tumorais, de forma que esses agentes apresentam baixa ou nenhuma seletividade. De fato, os mecanismos que conferem à seletividade, ainda que mínima, apresentada por alguns quimioterápicos não são bem esclarecidos. Esses fármacos exibem, de modo geral, estreitas janelas terapêuticas, onde as diferenças entre as doses que produzem o efeito antitumoral e as que causam toxicidade são bastante pequenas. Dessa forma, nas doses em que precisam ser administrados para que os efeitos terapêuticos sejam obtidos, severa toxicidade é com frequência observada. Portanto, se aumentar a distância entre as curvas dose-resposta e a curva dose-toxicidade, o manejo clínico dos quimioterápicos poderá ser significativamente aprimorado.

De acordo com vários autores, na avaliação do potencial citotóxico de uma substância, é de extrema importância a utilização de células normais a fim de se avaliar a seletividade para célula normal ou tumoral (ZUCO *et al.*, 2002; ANAZETTI *et al.*, 2003). Quando a atividade citotóxica da piplartina foi avaliada em células humanas normais (PBMC), esta apresentou um índice de seletividade de aproximadamente 45 vezes em relação à linhagem HL-60. Este valor ficou próximo do índice de seletividade da doxorubicina, usada como controle positivo, que foi de aproximadamente 50 vezes também em relação à linhagem HL-60.

Com o intuito de avaliar o estudo do mecanismo de ação citotóxico da piplartina, foram realizados estudos a níveis celulares e moleculares utilizando a linhagem HL-60 como modelo. Foram avaliados a integridade da membrana celular, o potencial transmembrânico da mitocôndria e o conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, por citometria de fluxo. O efeito da piplartina sobre a ativação da caspase-3 também foi avaliado. Adicionalmente, o índice mitótico foi determinado por coloração diferencial por hematoxilina/eosina.

A piplartina reduz de maneira dependente da concentração a proliferação celular. A viabilidade celular, avaliada pela integridade da membrana plasmática, foi determinada pela incorporação do iodeto de propídeo. A piplartina não causou dano na membrana citoplasmática nas primeiras horas avaliadas em nenhuma das concentrações testadas. Entretanto, causou perda da integridade da membrana, na

maior concentração testadas, 12 e 24 horas após o período de incubação. De fato, quando analisada através de morfologia diferencial por hematoxilina/eosina e/ou laranja de acridina/brometo de etídio após 24 horas de exposição, nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, a piplartina apresentou padrões celulares típicos de necrose (BEZERRA *et al.*, 2007). Adicionalmente, na análise do desvio da luz polarizada, a piplartina apresentou eventos celulares típicos de células em processo apoptótico desde as primeiras horas analisadas em todas as concentrações testadas. Além disso, foi observado fragmentação do DNA celular desde as primeiras horas (períodos em que não havia alteração na integridade da membrana citoplasmática) de incubação com o composto na maior concentração testada. Assim, as células que apresentaram perda da integridade da membrana citoplasmática após 12 e 24 horas após a incubação com a piplartina podem ser consideradas células apoptóticas em estágios finais ou necrose secundária.

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 neoplasias. O mecanismo defeituoso de apoptose pode ocasionar diversas patologias, inclusive câncer (MAJNO & JORIS, 1995; OPALKA *et al.*, 2002). Em contraste a 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 (por exemplo citocinas, isquemia, calor, irradiação e patógenos) fazem com que células da mesma população morram por necrose (SERGEY *et al.*, 2003).

Em relação ao processo apoptótico, ocorre à perda da assimetria dos fosfolípídeos de membrana e a exposição da fosfatidilserina na sua superfície externa, ativação das vias intrínsecas e/ou extrínsecas, ativação da cascata de caspases, seguida da clivagem das alças de DNA (VERMES, 1995), porém sem a ruptura da integridade da membrana celular (KOOPMAN, 1994; MAJNO & JORIS, 1995; MERCHANT, 2001). A quebra em fragmentos de 30 a 50 kpb é um evento inicial na apoptose (BROWN, 1993) e ocorre pela ação de uma endonuclease que cliva o DNA. Já na etapa final do processo, ocorre uma degradação incompleta do DNA nas regiões internucleossomais, produzindo fragmentos de, aproximadamente,

200pb que aparecem no gel de eletroforese como uma banda (ORMEROD, 1998). Na necrose ocorre à perda da integridade da membrana celular.

Os estudos relacionados ao tipo de morte celular foram prosseguidos com o intuito de melhor caracterizar a via apoptótica envolvida. A mitocôndria desempenha papel chave na deflagração da apoptose em algumas condições celulares. A via extrínseca da apoptose é também conhecida como via mitocondrial, tendo como o principal modulador dessa via, a proteína Bcl-2 da super família Bcl-2, que consiste de membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, e a interação do equilíbrio global entre o balanço dessas proteínas pode determinar o destino da célula (ORRENIUS, 2004). A alteração no potencial transmembrânico mitocondrial pode ser medida para avaliação indireta da ativação da via intrínseca. Modelos atuais sugerem que o Bax/Bak, que é um subgrupo de moléculas (Bax, Bak, Bok e Bcl-x5), com função pró-apoptótica central e são mantidas e verificadas pela proteína antiapoptótica Bcl-2. Essas moléculas são, por sua vez, inativadas pela “BH3-only”, uma família de proteínas como a Bim, Bid, Bik, Noxa e Puma. O “BH3-only” faz uma ligação hidrofóbica com as proteínas da família Bcl-2 e atua como sensores celulares que regulam a ativação da morte celular por apoptose na via intrínseca (STRASSER, 2005). Esta via é ativada por uma multiplicidade de estímulos, incluindo fármacos citotóxicos, estresse genotóxico, retirada de fatores de crescimento, dano no DNA, perda de ancoragem e pelos chamados modificadores de resposta imune como as imidazoquiloninas (LEVERKUS, 2004). É importante que muitas proteínas devam ser inativadas para expressão do Bax/Bak, e estas, por sua vez, conduzirem o processo da apoptose através da mitocôndria (CORY *et al*, 2003).

A perda do potencial transmembrânico da mitocôndria é refletida pela menor capacidade da mitocôndria de acumular rodamina 123. A piplartina causou despolarização da mitocôndria inicialmente (após 3 horas de incubação) apenas após a exposição das células com a maior concentração da piplartina, em seguida, foi observado despolarização mitocondrial em células tratadas com a menor concentração da piplartina. Estes resultados corroboram com os dados encontrados no estudo da viabilidade e morfologia celular. Estes dados sugerem, ainda, a participação da via intrínseca da apoptose na morte celular induzida pela piplartina.

A indução da apoptose pela piplartina foi posteriormente confirmada em ensaio de ativação de caspase-3. Os resultados mostram ativação da caspase-3,

após 24 horas de incubação, apenas na menor concentração testadas. A ativação das caspases é reconhecida como um processo fundamental no desenvolvimento da apoptose. Numerosos estímulos podem ativar as caspases, que vão da ativação de receptores de membrana celular até os que causam disfunção mitocondrial (SALVESEN & DIXIT, 1997). As caspases podem ser divididas em iniciadoras (caspases-8 e -9), sendo as executoras as responsáveis pela ativação de mecanismos que levam às mudanças de morfologia celular características da apoptose e fragmentação do DNA (CAI *et al.*, 1998). A ativação da caspase-9, especificamente, ocorre via mitocôndria (via intrínseca), por meio da clivagem pelo apoptossoma, formando, entre outros compostos, pelo citocromo c liberado da mitocôndria, e responsável pelo desencadeamento da cascata apoptótica, evidenciando assim uma disfunção nessa organela e culminando na ativação da caspase-3. Entretanto, não foi possível avaliarmos o efeito da piplartina sobre a ativação da caspase-9 para confirmar a participação da via mitocondrial na apoptose induzida pela piplartina.

É bem estabelecido que o desequilíbrio no metabolismo energético ou no estado redox celular pode ativar mecanismos que conduzam a morte celular por necrose ou apoptose, com importantes participações da transição de permeabilidade mitocondrial. A transição de permeabilidade mitocondrial tem sido associada com necrose ou apoptose de acordo com os níveis de ATP da célula. Assim, enquanto a apoptose depende da ação de caspases iniciadoras e executoras, a necrose é dependente preferencialmente da exaustão do ATP. Por outro lado, o ATP é necessário para o desencadeamento da apoptose, de tal forma que a passagem deste processo para necrose pode ser determinado por estresse oxidativo que seja suficiente para inativar caspases e uma disfunção mitocondrial suficiente para exaurir o ATP (GRATTAGLIANO *et al.*, 2002). Isso pode justificar o fato de que apesar da piplartina mostrar-se com padrões celulares e moleculares de morte celular por apoptose nas primeiras horas de incubação, após o final do período de exposição ocorreu a passagem do processo de apoptose para uma necrose secundária. Isso explica os resultados encontrados com a ativação de caspase-3, onde apenas na menor concentração testada foi encontrado resultado positivo.

A piplartina causou parada do ciclo celular em G₂/M, como observada pela análise do ciclo celular por citometria de fluxo, em todas as concentrações após 3

horas de incubação, seguido de fragmentação do DNA celular, preferencialmente, das células em fase de G₂/M. A análise do índice mitótico foi decisiva para demonstrar que há uma parada do processo de divisão celular na fase G₂ do ciclo celular.

Todo o DNA nuclear devem ser replicado antes de iniciar a divisão celular, completando a fase S para proceder à fase M. O controle do sistema de ciclo celular tem atividade de enzimas e proteínas responsáveis por conduzir cada etapa do processo no tempo apropriado, e acompanhado da desativação dessas, logo que o processo for completado. Se a síntese de DNA for lenta ou paralisada (por causa de um prejuízo no DNA que requer reparo, por exemplo), mitose e divisão celular serão então adiadas. Isto é necessário também para garantir que cada estágio do ciclo seja completado antes que se inicie o próximo (ALBERTS *et al.*, 1998; ALBERTS *et al.*, 2002).

Este sistema-controle do ciclo celular está baseado em duas famílias de proteínas que são chave para seu funcionamento. A primeira é a família das proteinoquinases dependentes das ciclinas (cdk), as quais induzem processos dependentes da fosforilação de serinas e treoninas em proteínas selecionadas. A segunda é uma família de proteínas ativadoras especializadas, chamadas ciclinas, que se ligam às moléculas de cdk e controlam sua habilidade em fosforilar proteínas-alvo apropriadas. A formação, ativação e a separação dos complexos ciclinas-cdk são os eventos fundamentais que coordenam o ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 1998; ALBERTS *et al.*, 2002).

A exposição de células a certos agentes antineoplásicos também causam parada do ciclo celular na fase G₂. Este pode ser causado por danos aos cromossomos e é irreversível. O bloqueio do ciclo celular na fase G₂ é característico de agentes que induzem quebra de fita dupla to DNA, como os inibidores de topoisomerase II (CLIFFORD *et al.*, 2003; LARSEN *et al.*, 2003; BARTEK & LUKAS, 2007; PLESCA *et al.*, 2007).

A relação entre a atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica ainda não está bem esclarecida. Sabe-se que vários agentes alquilantes, bem como a irradiação ionizante, são considerados leucemogênicos. Além disso, muitos outros agentes antineoplásicos de uso clínico são genotóxicos e mutagênicos como, por

exemplo, o etoposídeo (8), tenoposídeo (9), ansacrina, doxorubicina, entre outros (ANDERSON & BERGER, 1994; DE MESA *et al.*, 2002). Apesar do risco de um agente quimioterápico induzir um novo tipo de câncer ao paciente, o benefício resultante da remissão ou cura da neoplasia é considerado. De qualquer modo, já existem indicações de que certos agentes alquilantes, por exemplo, a ciclofosfamida, podem ser menos carcinogênicos que outros. A avaliação sistemática da carcinogenicidade dos agentes citotóxicos em diversas espécies animais permite a identificação e o desenvolvimento de agentes menos tóxicos que irão substituir outros agentes mais carcinogênicos nos esquemas de quimioterapia (AYDEMIR & BILALOGLU, 2003).

Vários ensaios para identificação de agentes mutagênicos e/ou genotóxicos vem sendo desenvolvidos (MACGREGOR *et al.*, 2000). As mutações são detectadas freqüentemente através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita ou hereditária no genótipo de um organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA. Basicamente, as mutações são divididas em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas (SILVA *et al.*, 2003a).

As mutações gênicas são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos e são detectadas através de análises citogenéticas (FRIEDBERG *et al.*, 1995). Dependendo do tipo de lesão que se quer detectar são necessários, portanto, diferentes testes.

Bactérias como *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* são utilizadas nos métodos mais amplamente empregados para detecção de mutações gênicas. Mas, como estas bactérias são organismos simples, os resultados obtidos nem sempre são válidos para células animais ou outros eucariontes. Portanto, para se obter dados sobre mutação gênica em eucariotos há testes em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), em *Drosophila* ou mesmo mutações somáticas em mamíferos, pelo teste de HGPRT (gene de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, ligado ao cromossomo X dos mamíferos). Para detectar mutações cromossômicas os testes mais utilizados incluem as aberrações cromossômicas e micronúcleos, sendo que estes testes exigem que as células estejam em estado proliferativo (LE-CURIEUX *et*

al., 1993; TICE *et al.*, 1998, MACGREGOR *et al.*, 2000). Além disso, estes ensaios também são úteis na elucidação de mecanismos de ação.

Estes testes têm um sistema de validação internacional e podem ser desenvolvidos tanto *in vitro* como *in vivo*, desde que se conheça adequadamente a biologia do organismo-teste. Um outro teste, o ensaio do cometa, que detecta quebras no DNA, também tem sido recomendado (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; TICE, 1995; SINGH & STEPHENS, 1996; SINGH, 2000).

Com o intuito de avaliar o potencial carcinogênico da piplartina, esta foi submetida a uma bateria de testes para avaliar sua atividade genotóxica e mutagênica. No estudo da atividade genotóxica, o ensaio do cometa, em células V79, foi realizado para avaliar danos à fita simples e à fita dupla do DNA induzidos pela piplartina. Posteriormente, o mecanismo de ação genotóxico foi também avaliado. A atividade mutagênica da piplartina foi investigada em dois modelos clássicos: ensaio de mutação gênica reversa em *S. typhimurium* (modelo procariótico) e ensaio de mutagenicidade e recombinação em *S. cerevisiae* (modelo eucariótico).

A piplartina foi capaz de induzir danos ao DNA, como observado pelo ensaio do cometa alcalino e cometa neutro, em células V79. A versão alcalina do teste, descrita por Singh *et al.* (1988), permite medir a ocorrência de quebra da fita simples e dupla, sítios alcali-lábeis e *cross-links* no DNA, já a versão neutra do teste, descrita por Wojewodzka *et al.* (2002), permite medir apenas a ocorrência de quebra da fita dupla no DNA. A piplartina apresentou-se atividade em ambas as versões do ensaio do cometa, condições alcalina e condições neutra, sugerindo a quebra da fita dupla do DNA como principal responsável pela atividade genotóxica da piplartina. Contudo, o ensaio do cometa não prevê necessariamente o potencial mutagênico das substâncias testadas, uma vez que detecta alterações no DNA que podem ou não ser reparadas eficientemente.

Em relação ao estudo do mecanismo de ação genotóxico, foi avaliado o efeito da piplartina sobre o ciclo celular e indução de morte celular. A piplartina não alterou a proliferação celular de células V79 após 3 horas de incubação. A viabilidade celular também não foi modificada. Entretanto, a análise morfológica mostrou padrões celulares típicos de células em apoptose. Estes resultados foram

confirmando com a análise do potencial transmembrânico da mitocôndria. Estes dados sugerem, assim, a participação da via intrínseca da apoptose na morte celular induzida pela piplartina. Adicionalmente, a piplartina causou parada do ciclo celular em G₂/M, como observada pela análise do ciclo celular por citometria de fluxo, em ambas as concentrações após 3 horas de incubação, acompanhado de fragmentação do DNA celular. Estes resultados encontrados em células V79 corroboram com os estudos de mecanismo de ação citotóxica em células leucêmicas HL-60, sugerindo que o mecanismo de ação citotóxico e genotóxico ocorre pela mesma via.

Muitos alcalóides causam danos diretos ao DNA de células de mamíferos, principalmente por efeitos intercalantes (ANSAH *et al.*, 2005; ANSARI *et al.*, 2005; DING *et al.*, 1999; KLUZA *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2004; VAN-DER-HEIJDEN *et al.*, 2004). De fato, os compostos que apresentam o grupo carbonila α - β -insaturada, o grupo farmacofórico para a atividade citotóxica da piplartina, em suas estruturas são conhecidos pela sua ação genotóxica. A genotoxicidade destes compostos é baseada em uma interação direta com as bases dos ácidos nucleicos via adição de Michael ou formação de bases de Schiff (HENSCHLER & EDER, 1986; CZERNY *et al.*, 1998). Estes compostos são altamente reativos com o DNA, o qual resulta em danos ao DNA, formação de ductos com o DNA ou proteínas, mutações e inibição enzimática (EDER *et al.*, 1993; JANZOWSKI *et al.*, 2003). De fato a piplartina induz quebra da fita dupla do DNA.

Nos experimentos realizados nas quatro linhagens de *S. typhimurium* (TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 102) em ambas as situações (com ou sem ativação metabólica), os resultados mostraram que não houve aumento do número de revertentes obtidos nas placas tratadas. Este resultado é comparado ao respectivo controle negativo e controles positivos utilizados para cada cepa na ausência e na presença da fração S9. Estes resultados indicaram que a piplartina não é mutagênica pelo teste de Ames nas condições testadas.

A especificidade das linhagens fornece informações sobre os tipos de mutações que são induzidas por agentes genotóxicos. Existem bancos de dados disponíveis contendo resultados do teste com *Salmonella* para uma grande variedade de compostos químicos, medicamentos e misturas complexas (GRIFFITHS *et al.*, 2002). Na bateria de cepas testadas, todas possuem mutações

em diferentes pontos no *operon* histidina além das mutações *rfa*, *uvrB* que aumentam a sensibilidade das mesmas aos mutágenos (MARON & AMES, 1983; GOMES-CARNEIRO, 1997).

A TA 97a apresenta a mutação *hisGD6610* em um *hot spot* presente no gene *hisD*, que é constituído por uma seqüência de seis citosinas. Esta mutação é revertida por mutagênicos *frameshift* que causam a deleção de um par de bases, dando origem a uma pseudo histidinol desidrogenase, contendo um resíduo extra de prolina que, embora apresente 60% da atividade da enzima produzida pela cepa selvagem, ainda permite um crescimento bacteriano normal em meio mínimo. A TA 98 é capaz de detectar substâncias que causam mutações do tipo *frameshift* (mutação que ocasiona um deslocamento no quadro de leitura dos códons) revertendo uma mutação pré-existente *hisD3052* no gene *hisD* que, por sua vez, codifica a síntese da enzima histidinol desidrogenase que participa da biossíntese da histidina (MARON & AMES, 1983; GOMES-CARNEIRO, 1997).

A TA 100 apresenta a mutação *hisG46* no gene *hisG* que codifica a primeira enzima da biossíntese da histidina. Essa mutação é revertida por substituição de um par de bases da trinca que codifica a prolina, restituindo a trinca original que codifica a leucina. (GOMES-CARNEIRO, 1997). A cepa TA102 contém a mutação ochre TAA no gene *hisG* e detecta eficientemente mutágenos como formaldeído, glioxal, vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes cross-link, como mitomicina-C. Esta linhagem detecta principalmente danos oxidativos (MARON & AMES, 1983; GOMES-CARNEIRO, 1997).

Este teste de mutação gênica utiliza células procarióticas, as quais diferem das células de mamíferos em fatores como permeabilidade, metabolismo, estrutura dos cromossomos e processo de reparo do DNA. O teste não fornece informação direta sobre a potência mutagênica em mamíferos, apesar da alta concordância dos resultados com o teste de Ames e ensaios de carcinogenicidade com roedores (RABELO-GAY *et al*, 1991).

Os ensaios com leveduras têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos, servindo para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (HENRIQUES *et al.*, 1987; POLI *et al.*, 1999; TERZIYSKA *et al.*, 2000).

A levedura *S. cerevisiae* é um organismo eucariótico amplamente estudado e notavelmente semelhante às células de mamíferos no que se referem às macromoléculas, organelas e proteínas com homologia a proteínas humanas, tornando-a uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (COSTA & FERREIRA, 2001).

Quando o potencial mutagênico da piplartina foi avaliado nas linhagens haplóides de *S. cerevisiae* (N123 e XV185-14c), esta se apresentou como um potente agente mutagênico. A atividade mutagênica da piplartina ocorreu de maneira dependente da fase de crescimento e da concentração. Além disso, a piplartina foi citotóxica, em doses altas (50 µg/mL e 100 µg/mL), durante a fase exponencial de crescimento em culturas com PBS (sem condições de crescimento) ou meio de cultura (com condições de crescimento), não apresentando atividade na fase estacionária do crescimento.

A piplartina foi mutagênica nas linhagens haplóides de *S. cerevisiae* apenas na fase exponencial de crescimento em culturas meio de cultura, não apresentando efeito com culturas em PBS. Isto sugere que a atividade mutagênica da piplartina pode estar relacionada, pelo menos em partes, com sua habilidade de interagir diretamente com o DNA, pois sua atividade citotóxica e mutagênica foi verificada principalmente em condições de crescimento celular, onde a molécula de DNA é mais acessível.

A reversão de auxotrofia para prototrofia pode ser causada por uma substituição, inserção ou deleção de pares de bases, ou ainda uma mutação induzida por supressor do gene mutante original (HENRIQUES *et al.*, 1987). Para que seja identificada a mutação reversa é necessária a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas. Na linhagem haplóide N123 de *S. cerevisiae* há a detecção de indução de mutação reversa e para frente ou *forward* (*can1*). Na linhagem haplóide de *S. cerevisiae* XV185-14c há detecção de dois tipos de mutações locus específico: reversões do alelo ocre *lys1-1* (alteração no códon UAA de término de cadeia) ou do alelo *missense his1-7* (códon alterado codifica um aminoácido diferente), e reversões por deslocamento do quadro de leitura do DNA (*frameshift*) verificadas no locus *hom3-10* (VON-BORSTEL *et al.*, 1971;

HAWTHORNE, 1969; SCHULLER & VON-BORSTEL, 1974; PARRY & PARRY, 1984; VON-BORSTEL & HIGGINS, 1998).

Reforçando a hipótese da interação da piplartina com o DNA, este composto induziu recombinações mitóticas intergênica (*crossing-over*) (+/*cyh2*) e intragênica (conversão gênica) (*leu1-1/leu1-12*) na linhagem diplóide XS2316 de *S. cerevisiae*, provavelmente como consequência à quebra da fita dupla do DNA induzida pela piplartina. Estes dados também corroboram com os resultados encontrados para o ensaio do cometa. Vários outros alcalóides têm sido descrito por serem capazes de induzir danos ao DNA e serem mutagênicos e recombinogênicos (MA *et al.*, 2004; BOEIRA *et al.*, 2002; LAGO *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2007).

Em um estudo semelhante, o etoposídeo (8) e tenoposídeo (9), falham em induzir mutagenicidade nas linhagens TA 98, TA 100 e TA 1535 de *S. typhimurium* ou nas linhagens 113/143 e WP2 *uvrA* de *Escherichia coli* no teste de Ames, mas são capazes de induzir mutagenicidade em células de mamíferos, como indicado pela indução de danos ao DNA, indução de mutações na enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase e indução de troca entre cromátides irmãs em células de ovário de *Hamster* (NAKANOMYO *et al.*, 1986; GUPTA *et al.*, 1987). Além disso, estes quimioterápicos são capazes de induzir genotoxicidade em células da medula óssea de camundongos (NAKANOMYO *et al.*, 1986).

Muitos agentes quimioterápicos, como a ansacrina, etoposídeo (8) e tenoposídeo (9), são potentes agentes clastogênicos em células de mamíferos, mas não são mutagênicos em bactérias. Estas observações têm sido atribuídas às interações destes compostos com a enzima nuclear topoisomerase II (GUPTA, 1990). Isto pode ser explicado devido às diferenças entre a fisiologia da enzima nuclear topoisomerase II de células procarióticas e de células eucarióticas (GUPTA, 1990; HOROWITZ *et al.*, 1997). Isso sugere que a piplartina pode apresentar um efeito inibitório sobre a atividade da enzima topoisomerase II de células eucarióticas. Assim, a para do ciclo celular em G₂ e indução de quebra da fita dupla do DNA causadas pela piplartina podem ser consequências de um efeito inibitório sobre a atividade da enzima topoisomerase II.

O potencial genotóxico/mutagênico *in vivo* da piplartina também foi avaliado. Para tanto, o ensaio do micronúcleo em medula óssea foi realizado em

camundongos saudáveis 24 e 48 horas após a administração do fármaco. Um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronúcleados, de forma tempo- e dose-dependente, foi observado após o tratamento dos animais com piplartina. A piplartina aumentou significativamente a frequência EPCM após 24 horas de tratamento, entretanto, alterou a frequência de EPCM após 48 de tratamento, provavelmente devido à regeneração medular.

O teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* visa detectar e quantificar a ação genotóxica/mutagênica de agentes indutores, sendo amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais como parte de uma bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001).

Este teste avalia danos aos cromossomos, uma vez que este método permite a avaliação confiável tanto da perda quanto da ruptura do cromossomo, (FENECH, 2005). Este teste é capaz de revelar a ação de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) em células em estágio de divisão celular (MACGREGOR *et al.*, 1987). Esse ensaio apresenta algumas vantagens em relação aos outros, entre as quais podem ser citadas sensibilidade, custo e confiabilidade. Esse teste pode ser executado praticamente em qualquer população de células que esteja em constante divisão, sendo a medula óssea de mamíferos uma das regiões mais adequadas, visto que suas células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de divisão (HEDDLE, 1973).

Portanto, os resultados encontrados no teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos podem ser atribuídos a uma ação clastogênica e/ou aneugênica da piplartina. Estes resultados corroboram com os dados encontrados *in vitro* no ensaio do cometa, em células V79, e no modelo de mutagenicidade e recombinação, em *S. cerevisiae*.

Assim, os resultados apresentados aqui mostram uma ação citotóxica, genotóxica e mutagênica da piplartina. Seu mecanismo de ação parece estar relacionado ações (intercalação/danos) da piplartina sobre o DNA celular acarretando em uma inibição da atividade da enzima topoisomerase II seguido de

indução de quebra de fita dupla do DNA. As conseqüências desse efeito genotóxico é a parada do ciclo celular em G₂, seguido de morte celular por apoptose e/ou indução de mutações (figura 36). Infelizmente, não foi possível realizar um ensaio que avaliasse o efeito da piplartina sobre a atividade da enzima topoisomerase II e/ou a intercalação deste alcalóide com o DNA.

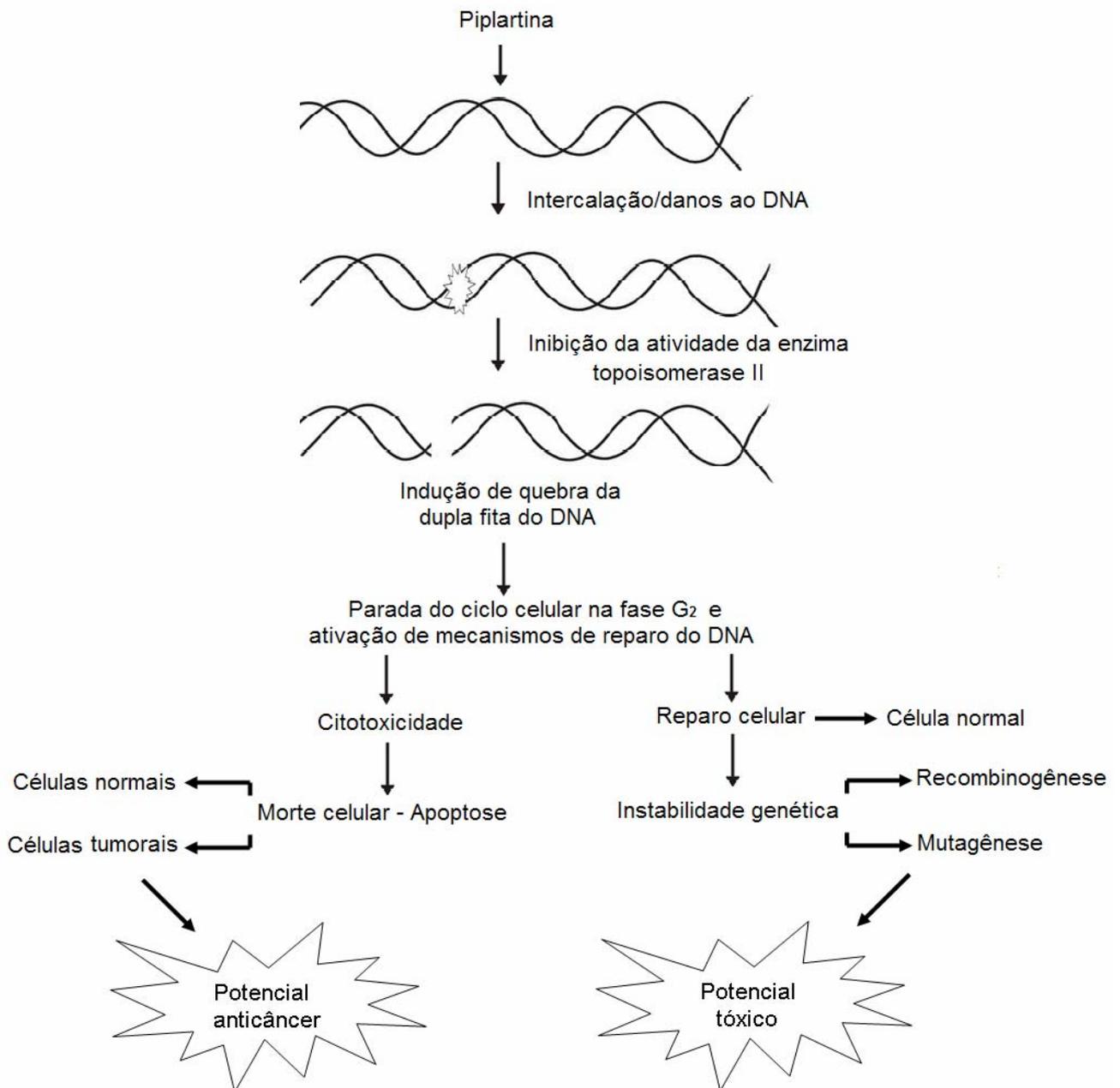


Figura 36 – Mecanismo de ação proposto para a atividade citotóxica/genotóxica da piplartina.

Dando continuidade ao estudo farmacológico da piplartina, esta foi avaliada em relação a sua farmacocinética. Foi estudada a cinética de absorção da piplartina após uma única dose em ratos. Para tanto, inicialmente a metodologia bioanalítica de detecção da piplartina em plasma de ratos foi desenvolvida e validada.

A validação de um método bioanalítico deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (FINDLAY *et al.*, 2000; SHAH *et al.*, 2000; MEI *et al.*, 2003; KIMANANA, 1998; HARTMANN *et al.*, 1998). Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise (BRASIL, 2003).

As técnicas mais utilizadas no desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica para quantificação de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma ou urina são a cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e estas combinadas com a espectrometria de massas (MS) tais como, LC-MS, LC-MS-MS, CG-MS e CG-MS-MS (SHAH *et al.*, 2000).

O método utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas foi selecionado por possibilitar a quantificação da piplartina em amostras de plasma com especificidade, precisão e exatidão. O método desenvolvido mostrou-se específico e, durante a aplicação do mesmo, comprovou-se sensibilidade adequada à aplicação em estudos de farmacocinética, no qual a detecção de pequenas concentrações plasmáticas é de extrema importância.

Durante o desenvolvimento de métodos cromatográficos, uma consideração importante é a escolha do uso de padrão externo ou padrão interno. Sempre que é possível obter um padrão estruturalmente semelhante ao analito, a utilização do padrão interno é a opção de escolha. O padrão interno é adicionado inicialmente às amostras, passando por todas as etapas de pré-tratamento. Para determinar a concentração do analito, utiliza-se a razão entre as respostas do analito e padrão interno, possibilitando minimizar os erros oriundos de possíveis perdas durante o preparo das amostras (CAUSON, 1997). No método aqui desenvolvido, utilizou-se a carbamazepina como padrão interno, pois esta apresentou adequada seletividade no método desenvolvido.

As amostras biológicas contendo fármacos devem passar por um tratamento prévio à sua análise cromatográfica, objetivando uma separação cromatográfica livre de interferentes (QUEIROZ *et al.*, 2001). Neste trabalho, as amostras foram purificadas por extração líquido-líquido simples, utilizando-se tolueno como solvente extrator, possibilitando maior recuperação do analito e do padrão interno.

A fase móvel utilizada neste método constitui-se por uma mistura de acetonitrila e água, na proporção 70:30 (v/v), acrescida de 0,2 % de ácido acético. Esse último foi utilizado para favorecer a protonação da piplartina. O tempo de corrida de cada análise cromatográfica foi de 5 minutos. Um tempo de análise reduzido representa uma redução da quantidade de fase móvel utilizada e aumento de vida útil da coluna cromatográfica.

O método desenvolvido e validado mostrou-se linear na faixa de concentração de 2 – 2.500 ng/mL, com índice de correlação (r^2) de 0,995. O limite de quantificação encontrado foi de 2 ng/mL com precisão e exatidão aceitável. Esta faixa de linearidade e este valor de limite de quantificação são adequados à aplicação do método em estudos farmacocinéticos.

Além de um método bioanalítico ser específico e sensível este deve ser preciso e exato. A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais em idênticas condições de ensaio e a exatidão, o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um aceito como referência. Um método bioanalítico é considerado preciso e exato quando as análises dos controles de qualidade baixo, médio, alto e limite de quantificação mostrarem valores não excedentes a $\pm 15\%$ do valor nominal analisado e para o limite de quantificação este desvio não deve exceder $\pm 20\%$ tanto para as mesmas corridas (Intra-ensaio) quanto para corridas analíticas diferentes (Inter-ensaio) (BRASIL, 2003; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; BRESSOLLE *et al.*, 1996; DADGAR & BURNETT, 1995).

Os valores obtidos para a análise da piplartina nos estudos intra-ensaio variaram de 3,42 a 6,7 % para a precisão e de -7,05 a 2,2 % para a exatidão. As amostras analisadas em dias diferentes (inter-ensaios) apresentaram precisão entre 3,73 a 5,97 % e exatidão entre -5,70 a 0,87 %. Os resultados apresentados estão de acordo com o estabelecido pelas diretrizes para a validação de métodos analíticos (BRESSOLE *et al.*, 1996).

As amostras de piplartina em plasma a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ permaneceram estáveis ao serem submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento. A análise de amostras de plasma descongeladas e mantidas à temperatura ambiente por 4 horas também demonstrou que esta permanece estável, indicando adequabilidade do método ao tempo e condições de análise.

Assim, o método bioanalítico (LC-MS-MS) desenvolvido e validado para determinação da piplartina em plasma de ratos apresentou-se específico, sensível, preciso e exato, justificando sua aplicação em estudos farmacocinéticos.

O método desenvolvido foi aplicado em um estudo de disposição cinética em ratos. Neste estudo, a piplartina foi administrada por via intraperitoneal, em dose única de 50 mg/kg. Após a administração da piplartina, a curva de concentração plasmática (na escala logarítima) *versus* tempo declinou linearmente, assim o perfil de decaimento plasmático pode ser descrito por uma única função exponencial. Esta situação é descrita como modelo monocompartimental (SHARGEL & YU, 1999; DIPIRO, 2002).

O modelo de um compartimento, ou monocompartimental, é considerado o mais simples, pois inclui somente um compartimento e representa fármacos que após a administração, se distribuem para todos os tecidos atingindo rapidamente o equilíbrio em todo o organismo. A administração pode se por via intravascular ou extravascular (WELLING, 1997; SHARGEL & YU, 1999; DIPIRO, 2002).

Os processos de absorção e eliminação que ocorrem após administração de um fármaco por via extravascular, e que definem o perfil plasmático resultante, são adequadamente descritos por modelos de primeira ordem, os quais permitem a determinação dos parâmetros K_{ab} (constantes de absorção de primeira ordem), F (fração da dose absorvida) e K_{el} (constante de eliminação terminal). Assim, utilizando o modelo monocompartimental aberto com absorção e eliminação de primeira ordem é possível à determinação dos parâmetros farmacocinéticos AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , Cl , V_d , K_{el} , $t_{1/2}$ e T_{max} (WELLING, 1997).

A piplartina apresentou os seguintes valores para os parâmetros farmacocinéticos: $AUC_{0-24} = 8.471,26\text{ ng/h/L}$, $AUC_{0-\infty} = 8.505,25\text{ ng/h/L}$, $C_{max} = 3.580,00\text{ ng/mL}$, $Cl = 5,88\text{ L/h}$, $V_d = 13.888,9\text{ L}$, $K_{el} = 1,37\text{ h}$, $t_{1/2} = 0,5\text{ h}$ e $T_{max} = 0,083\text{ h}$.

Assim, a piplartina atinge níveis plasmáticos em torno de 4.000 ng/mL que são próximos dos valores encontrados para a sua atividade citotóxica *in vitro* para células tumorais (efeito anticâncer) e valores abaixo em relação as encontrados para a atividade citotóxica em PBMC (efeitos tóxicos). Isto confirma que a atividade biológica da piplartina seja devido a uma atuação direta deste composto nos sítios de ações celulares.

No passo seguinte, a associação do 5-FU com a piplartina foi avaliada em estudos *in vitro* e *in vivo*. O efeito da associação do 5-fluorouracil (5-FU) com a piplartina foi avaliado *in vitro* sobre a proliferação de células tumorais humana. Os efeitos dos tratamentos com a piplartina (50 mg/kg/dia), o 5-FU (10 mg/kg/dia) ou a associação do 5-FU (10 mg/kg/dia) com a piplartina (50 mg/kg/dia) foram avaliados em camundongos saudáveis ou transplantados com o tumor Sarcoma 180. Adicionalmente, análises histopatológicas, bioquímicas e hematológicas foram realizadas com o intuito de avaliar efeitos tóxicos causados pelo tratamento dos animais com os compostos.

A piplartina aumentou a eficácia do 5-FU *in vitro* e *in vivo*. Em relação a proliferação celular *in vitro*, a piplartina diminuiu os valores de CI_{50} do quimioterápico 5-FU, corroborando que a piplartina apresenta uma ação direta sobre as células do tumor. A administração concomitante do 5-FU com a piplartina apresentou-se como uma associação útil para a redução do tumor experimental Sarcoma 180. A atividade antitumoral da piplartina já havia sido descrita no modelo experimental Sarcoma 180, nas doses de 50 e 100 mg/kg, onde esta foi capaz de reduzir o crescimento tumoral, provavelmente por uma ação direta sobre o tumor, como observada pela quantificação do marcador de proliferação tumoral Ki67 (BEZERRA *et al.*, 2006). Os resultados encontrados com a combinação do 5-FU com a piplartina indicam uma opção de melhora na eficácia da terapêutica antineoplásica.

Na quimioterapia do câncer, fármacos antineoplásicas são freqüentemente usadas em combinações. Este tipo de tratamento (poliquimioterapia) 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 (MORINAGA *et al.*, 2003). Um bom exemplo disso é a quimioterapia da leucemia linfoblástica aguda. A eficácia do tratamento da leucemia linfoblástica aguda aumentou expressivamente ao longo dos anos. A sobrevida livre

de evento aumentou de cerca de 10% na década de 60 para aproximadamente 80% atualmente. Esse avanço se deve em grande parte a adoção da poliquimioterapia a partir dos anos 80. A refratariedade ao tratamento é observada com freqüência na quimioterapia, não obstante o uso da poliquimioterapia que tem por objetivo atingir diferentes alvos moleculares e vias intracelulares justamente para reduzir essa probabilidade (CHEOK & EVANS, 2006). Entretanto, a quimioterapia do câncer ainda encontra limitações determinadas pela elevada incidência de toxicidade.

Devido a essas elevadas incidências de toxicidade, com freqüência, internações são necessárias para o tratamento de intercorrências (especialmente infecciosas) que, além do risco iminente que representam por si mesmas, determinam interrupção do tratamento quimioterápico, aumentando, portanto a incidência de ineficácia da quimioterapia. Esses são eventos comuns para diversos tipos de câncer. De todo modo, a associação do 5-FU com a piplartina não apenas foi eficiente para aumentar a resposta antitumoral do antineoplásico, mas também reduziu os efeitos colaterais deste agente quimioterápico. Como visto nos resultados, a leucopenia induzida pelo 5-FU foi prevenida com a associação com a piplartina.

As células da medula óssea são bastante sensíveis à agressão causada pelos agentes quimioterápicos. Como consequência, os glóbulos brancos (leucócitos) e vermelhos (hemácias), assim como as plaquetas podem ter sua produção comprometida, determinando queda em suas contagens no sangue (KATZUNG, 2003).

Os leucócitos são as células do sangue encarregadas da defesa do organismo contra infecções. Sendo constantemente produzidos pela medula óssea, circulam no sangue por alguns dias e migram para os tecidos onde vão destruir os microorganismos invasores. Por isso, a queda na contagem de leucócitos no sangue (leucopenia) predispõe o organismo a infecções (KATZUNG, 2003; TAKIGUCHI *et al.*, 2001). Assim, a associação do 5-FU com a piplartina é vista como uma combinação benéfica.

Além disso, o fator estimulador de colônias, produzido pelo tumor Sarcoma 180, aumenta o número de células polimorfonucleares em sangue periférico (OKAWA *et al.*, 1992). Os resultados confirmam que o tumor Sarcoma 180 modifica os parâmetros leucocitários. Houve também diferenças em relação ao tamanho dos

baços dos camundongos saudáveis e transplantados com o tumor Sarcoma 180, sugerindo uma esplenomegalia e hematopoiese esplênica induzida pelo tumor Sarcoma 180. Por outro lado, o tratamento dos animais com 5-FU causou significativa redução da massa dos baços. Adicionalmente, o tratamento com a piplartina normaliza a proporção de leucócitos em sangue periférico, compensando o efeito do tumor, e prevenindo a redução do baço causada pelo 5-FU.

Os glóbulos vermelhos permanecem na circulação por períodos muito maiores que os leucócitos. Assim, a anemia - queda na contagem dos glóbulos vermelhos no sangue - torna-se evidente somente após alguns ciclos de quimioterapia. Por isso, não foi evidenciada anemia, induzida pelo 5-FU, no modelo experimental adotado.

A toxicidade de uma substância também pode ser avaliada investigando-se o aspecto macroscópico e a massa de seus órgãos. O fígado e rins são órgãos responsáveis pela detoxicação do organismo, e em casos de intoxicação podem ter seu volume e/ou peso aumentado. Os animais foram avaliados quanto à massa do fígado e dos rins. A massa corporal absoluta dos animais, assim como a massa do fígado e dos rins não apresentou diferenças significativas entre os grupos testes e o grupo controle. Estes resultados indicam que as doses testadas não produziram toxicidade a níveis macroscópicos.

Ainda em relação ao estudo toxicológico, foram realizados testes de dano hepático (níveis plasmáticos das transaminases: aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT) e teste da função glomerular renal (níveis plasmáticos de uréia). Além disso, análises histopatológicas foram realizadas nos fígados e rins de animais tratados.

Na análise das transaminases, sensíveis indicadores da injúria celular hepática, não foram encontradas alterações em relação aos grupos tratados e grupo controle. As análises histopatológicas dos fígados removidos de animais tratados sugerem que o fígado pode ser considerado como alvo potencial da toxicidade da piplartina, caracterizando uma leve hepatotoxicidade do composto. 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 piplartina podem ser consideradas reversíveis (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000; KUMMAR, 2004; MCGEE *et al.*, 1992). Estes dados corroboram com os encontrados na literatura (BEZERRA *et al.*, 2006).

Na análise dos níveis plasmáticos da uréia, um marcador da taxa de filtração glomerular, também não foi encontrado alterações em relação aos grupos tratados e grupo controle. O nível de uréia sanguíneo é geralmente usado para diagnosticar e indicar, a severidade da insuficiência renal, porque ela é comparativamente mais fácil de ser estimada. Entretanto, os níveis aumentados de uréia podem ser devidos, não somente a uma alteração na excreção, mas a um aumento na produção, associado a dietas ricas em proteínas, febre, hemorragias gastrointestinais e fármacos que estimulam o catabolismo e o anabolismos (VARLEY *et al.*, 1980). A determinação da creatinina tem sido preferida porque ela parece ser independente da ingestão de proteínas e sua produção a partir da degradação da fosfocreatina do músculo é relativamente constante (VARLEY *et al.*, 1980). Entretanto, tecnicamente a determinação não é tão simples. Em animais de pequeno porte, como os camundongos, os valores encontrados são geralmente muito baixos e raramente apresentam algum significado. Além de que seus níveis sanguíneos caem com o desgaste muscular. Vacuolização do epitélio e trechos hemorrágicos foram alguns dos achados histopatológicos dos rins de animais tratados com a piplartina, sugerindo discreta nefrotoxicidade, entretanto, como o tecido estava preservado, a regeneração pode ser completa. Assim, as alterações observadas nos animais tratados com a piplartina podem ser consideradas reversíveis (TISHER & BRENNER, 1994). Estes dados também corroboram com os encontrados na literatura (BEZERRA *et al.*, 2006).

Assim, os resultados sugerem que a piplartina, não apenas apresenta atividade antitumoral, mas também, pode aumentar a eficácia do quimioterápico 5-FU. Este composto apresenta baixa toxicidade e ainda possui ação protetora contra os danos hematológicos induzido pelo quimioterápico 5-FU.

Por fim, podemos afirmar que a piplartina, um produto natural encontrado em pimentas, apresenta potencial anticâncer promissor. A determinação do grupo farmacofórico para a atividade citotóxica da piplartina, bem como a avaliação do seu potencial mutagênico, de seu mecanismo de ação, da sua eficácia em modelos animais e estudo de absorção são de extremo valor para o conhecimento

farmacológico da atividade anticâncer deste alcalóide. Os resultados obtidos neste estudo vêm para contribuir com os estudos farmacodinâmicos, a níveis celulares e moleculares, e farmacocinéticos deste alcalóide. De qualquer modo, estudos complementares que contemplem análises de alvo molecular, modelagem estrutural, eficácia em modelos xenográficos e estudos toxicológicos e farmacocinéticos adicionais pré-clínicos e clínicos são requeridos para a validação deste fármaco para uso humano.

Conclusão

6. Conclusão

- Por fim, podemos afirmar que a piplartina, um produto natural encontrado em pimentas, apresenta uma atividade anticâncer promissora.
- No estudo da relação estrutura-atividade, o grupo carbonila α - β -insaturada do anel amídico mostrou ser essencial para atividade citotóxica da piplartina.
- O índice de seletividade foi de aproximadamente 45 vezes, quando comparada a sua atividade citotóxica em linhagem leucêmica *versus* PBMC.
- Seu mecanismo de ação está relacionado com bloqueio do ciclo celular na fase G₂ e induziu morte celular por apoptose com participação da via intrínseca (via mitocondrial).
- A piplartina apresentou-se como um agente genotóxico, quando avaliado pelo teste do cometa, sugerindo a quebra da fita dupla do DNA como principal responsável por esse efeito.
- Esta não foi mutagênica para a bactéria *S. typhimurium*, quando testada no ensaio de Ames (modelo procariótico) na ausência e na presença da fração S9. Entretanto, apresentou-se como um potente agente mutagênico e recombinogênico para a levedura *S. cerevisiae* (modelo eucariótico).
- A atividade genotóxica/mutagênica da piplartina foi confirmada no modelo do micronúcleo em medula óssea de camundongos.
- Em relação ao estudo farmacocinético, o método bioanalítico desenvolvido e validado para a quantificação da piplartina em plasma de ratos apresentou-se específico, sensível, preciso e exato, justificando sua aplicação em estudos farmacocinéticos. Quando submetida a um estudo de disposição cinética, a piplartina apresentou um perfil de absorção característico de um modelo monocompartimental.
- Por fim, a piplartina aumentou o efeito antitumoral do quimioterápico 5-FU e ainda diminuiu seus efeitos colaterais.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.1397 – 1421, 2006.

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v.170, p.211 - 224, 1994.

AHN, B.Z.; SOK, D.E. Michael acceptors as a tool for anticancer drug design. **Current Pharmaceutical Design**, v.2, p.247 – 262, 1996.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAAF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. 4th Edn., Garland Publishing, Inc. New York, 1294p., 2002.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAAF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Essential Cell Biology. An Introduction to the Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing, Inc. New York, 630p., 1998.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v.188, p.261 – 274, 2003.

ANDERSON, D.; YU, T.W.; PHILLIPS, B.J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutation Research**, v.307, p.261 - 271, 1994.

ANDERSON, R.D.; BERGER, N.A. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. **Mutation Research**, v.309, p.109 – 142, 1994.

ANSAH, C.; KHAN, A.; GOODERHAM, N.J. *In vitro* genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. **Toxicology**, v.208, p.141 – 147, 2005.

ANSARI, K.M.; DHAWAN, A.; KHANNA, S.K.; DAS, M. *In vivo* DNA damaging potential of sanguinarine alkaloid, isolated from argemone oil, using alkaline Comet assay in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.147 – 153, 2005.

APTSIAURI, N.; CABRERA, T.; MENDEZ, R.; GARCIA-LORA, A.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.601, p.123 – 131, 2007.

ATAL, C.K.; DHAR, K.L.; SINGH, J. The chemistry of Indian *Piper species*. **Lloydia**, v.38, p.256 – 264, 1975.

ATKIN, A.L.; RIAZI, M.A.; GREER, C.L.; ROY, K.L.; BELL, J.B. The functional analysis of nonsense suppressors derived from *in vitro* engineered *Saccharomyces cerevisiae* tRNA (Trp) genes. **Genes**, v.134, p.57 - 65, 1993.

AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley and Sons, New York, 1989.

AYDEMIR, N.; BILALOGLU, R. Genotoxicity of two anticancer drugs, gemcitabine and topotecan, in mouse bone marrow *in vivo*. **Mutation Research**, v.537 p.43 – 51, 2003.

BARTEK, J.; LUKAS, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.19, p.238 – 245, 2007.

BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from

Piper. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.801 – 807, 2006.

BEZERRA, D.P.; MILITÃO, G.C.G.; CASTRO, F.O.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1 – 8, 2007.

BEZERRA, D.P.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. Antiproliferative Effects of Two Amides, Piperine and Piplartine, from *Piper Species*. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.60, p.539 – 543, 2005.

BEZERRA, D.P.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; ALENCAR, N.M.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; ALVES, A.P.; PESSOA, O.D.; CHAVES, J.H.; SILVEIRA, E.R.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the *Piper species*. **Journal of Applied Toxicology**, v.28, p.599 - 607, 2008.

BODIWALA, H.S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C.S.; SHARMA, S.S.; BHUTANI, K.K.; SINGH, I.P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, v.61, p.418 - 421, 2007.

BOEIRA, J.M.; VIANA, A.F.; PICADA, J.N.; HENRIQUES, J.A. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, v.500, p.39 – 48, 2002.

BRASIL. Resolução Nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, 2003.

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

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **Journal of chromatography B**, v.686, p.3 - 10, 1996.

BRIZEL, D.M. Pharmacologic approaches to radiation protection. **Journal of Clinical Oncology**, v.25, p.4084 – 4089, 2007.

BROWN, D.G.; SUN, X.M.; COHEN, G.M. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior internucleosomal fragmentation. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.3037 - 3041, 1993.

BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. **Methods in yeast genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the *in vivo* comet assay workgroup. **Mutation Research**, v.627, p.31 – 35, 2007.

BUTLER, M.S. The role of natural products in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2141 – 2153, 2004.

CAI, J.; YANG, J.; JONES, D.P. Mitochondrial control of apoptosis. The role of cytochrome c. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1366, p.139 – 149, 1998.

CAO, R.; PENG, W.; WANG, Z.; XU, A. beta-Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. **Current Medicinal Chemistry**, v.14, p.479 – 500, 2007.

CAPRON, M.A.; WIEMER, D.F. Piplaroxide, an ant-repellent piperidine epoxide from *Piper tuberculatum*. **Journal of Natural Products**, v.59, p.794 – 795, 1996.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v.689, p.175 - 180, 1997.

CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. **Cancer chemotherapy and biotherapy**; 2th edn., Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996.

CHEOK, M.H.; EVANS, W.E. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v.6, p.117 – 129, 2006.

CHEUNG, E.; WADHERA, P.; DORFF, T.; PINSKI, J. Diet and prostate cancer risk reduction. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v.8, p.43 – 50, 2008.

CHOY, W.N. Regulatory Genetic toxicology tests. In: Choy, W. N. (ed.), **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. Marcel Dekker, Inc, New York, p.93 - 113, 2001.

CIBAS, E.S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. **Diagnostic cytopathology**, v.13, p.166 – 171, 1995.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, p.829 – 837, 2004.

CLIFFORD, B.; BELJIN, M.; STARK, G.R.; TAYLOR, W.R. G₂ Arrest in response to topoisomerase ii inhibitors: the role of p53. **Cancer Research**, v.63, p.4074 - 4081, 2003.

CLINTON, S.K.; EMENHISER, C.; SCHWARTZ, S.J.; BOSTWICK, D.G.; WILLIAMS, A.W.; MOORE, B.J.; ERDMAN, J.W.JR. Cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.5, p.823 – 833, 1996.

CLINTON, S.K. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. **Nutrition Reviews**, v.56, p.35 – 51, 1998.

COLWELL, R.R. Fulfilling the promise of biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.20, p.215 – 228, 2002.

CONNORS, J.M. State-of-the-Art Therapeutics: Hodgkin's Lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, p.6400 – 6408, 2005.

CORY, S.; HUANG, D.C.; ADAMS, J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**, v.22, p.8590 – 8607, 2003.

COSTA, V.; FERREIRA, P.M. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v.22, p.217 - 246, 2001.

COSTA-LOTUFO, L.V.; SILVEIRA, E.R.; BARROS, M.C.; LIMA, M.A.; MORAES, M.E.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. Antiproliferative effects of abietane diterpenes from *Aegiphila lhotzkyana*. **Planta Medica**, v.70, p.180 – 182, 2004.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.9, p.2783 – 2797, 2000.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.72 – 79, 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; YANG, S.S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **Journal of Natural Products**, v.69, p.488 – 498, 2006.

CROKER, A.K.; ALLAN, A.L. Cancer Stem Cells: Implications for the progression and treatment of metastatic disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.12, p.374 - 390, 2008.

CZERNY, C.; EDER, E.; RUNGER, T.M. Genotoxicity and mutagenicity of the α,β -unsaturated carbonyl compound crotonaldehyde (butenal) on a plasmid shuttle vector. **Mutation Research**, v.407, p.125 – 134, 1998.

DADGAR, D.; BURNETT, P.A. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.14, p.23 - 31, 1995.

DE MESA, R.L.; DE CERAIN; SALSAMENDI, A.L.; ARIZNABARRETA, L.S.; AGABEYNZANO, M.J.C.; PATINO-GARCIA, A. Measurement and analysis of the chemotherapy-induced genetic instability in pediatric cancer patients. **Mutagenesis**, v.17, p.171 – 175, 2002.

DEVITA, V.T.JR.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 5th edn., Lippincott Williams & Wilkins, 1996.

DING, Q.; CHICHAK, K.; LOWN, J.W. Pyrroloquinoline and pyridoacridine alkaloids from marine sources. **Current Medicinal Chemistry**, v.6, p.1 – 27, 1999.

DIPIRO, J.T.; SPRUILL, W.J.; BLOUIN, R.A.; PRUEMER, J.M. **Concepts in Clinical Pharmacokinetics**. 3th edn., American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, p.200, 2002.

DRUMEA, K.; YANG, Z.F.; ROSMARIN, A. Retinoic acid signaling in myelopoiesis. **Current Opinion in Hematology**, v.15, p.37 – 41, 2008.

DUH, C.Y.; WU, Y.C.; WANG, S.K. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. **Journal of Natural Products**, v.53, p.1575 – 1577, 1990a.

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

EDER, E.; SCHECKENBACH, S.; DEININGER, C.; HOFFMAN, C. The possible role of α - β -unsaturated carbonyl compounds in mutagenesis and carcinogenesis. **Toxicology Letters**, v.67, p.87 – 103, 1993.

ELEGBEDE, J.A.; MALTZMAN, T.H.; ELSON, C.E.; GOULD, M.N. Effects of anticarcinogenic monoterpenes on phase II hepatic metabolizing enzymes. **Carcinogenesis**, v.14, p.1221 – 1223, 1993.

ERNST, E. Can allium vegetables prevent cancer? **Phytomedicine**, v.4, p.79 – 83, 1997.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The Comet Assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v.339, p.37 - 59, 1995.

FELIPE, C.F.B.; SOUSA-FILHO, J.T.; SOUZA, L.E.O.; SILVEIRA, J.A.; UCHOA, E.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; VIANA, G.S.B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v.14, p.605 – 612, 2007.

FENECH, M. *In vitro* micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods in Molecular Medicine**, v.111, p.3 - 32, 2005.

FINDLAY, J.W.A.; SMITH, W.C.; LEE, W.; NORDBLOM, G.D.; DESILVA, I.; DAS, B.S.; KHAN, M.N.; BOWSER, R.R. Validation of immunoassays for bioanalysis: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.21, p.1249 – 1273, 2000.

FRAZER, I.H.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Prevention of cancer through immunization: Prospects and challenges for the 21st century. **European Journal of Immunology**, v.37, p.S148 – 155, 2007.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. **DNA Repair and Mutagenesis**. American Society for Microbiology, Washington, 1995.

GANESAN, A. Natural products as a hunting ground for combinatorial chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.584 – 590, 2004.

GAPTER, L.A.; YUIN, O.Z.; NG, K.Y. S-Allylcysteine reduces breast tumor cell adhesion and invasion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.367, p.446 – 451, 2008.

GATEHOUSE, D.; HAWORTH, S.; CEBULA, T.; GOCKE, E.; KIER, L.; MATSUSHIMA, T.; MELCION, C.; NOHMI, T.; OHTA, T.; VENITT, S. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutation Research**, v.312, p.217 – 233, 1994.

GAW, A.; MURPHY, M.J.; COWAN, R.A.; O'REILLY, D.S.T.J.; STEWART, M.J.; SHEPHERD, J. **Clinical Biochemistry: An Illustrated Colour**. 3^a ed., Churchill Livingstone, 2004.

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

GIOVANNUCCI, E.; ASCHERIO, A.; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.87, p.1767 – 1776, 1995.

GOMES-CARNEIRO, M.R. **Avaliação do potencial mutagênico de monoterpenos presentes em óleos essenciais**. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, 1997.

GRAHAM, H.N. Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. **Preventive Medicine**, v.21, p.334 – 350, 1992.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à genética**. 7ª ed., Guanabara-Koogan, São Paulo, p.794, 2002.

GUERITTE, F.; FAHY, J. **The vinca alkaloids**. In: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J. (Eds.), *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 123 – 136, 2005.

GUIDANCE FOR INDUSTRY. **Bioanalytical Method Validation**, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001.

GUPTA, R. Tests for the genotoxicity of m-AMSA, etoposide, teniposide and ellipticine in *Neurospora crassa*. **Mutation Research**, v.240, p.47 – 58, 1990.

GUPTA, R.S.; BROMKE, A.; BRYANT, D.W.; GUPTA, R.; SINGH, B.; MCCALLA, D.R. Etoposide (VP16) and teniposide (VM26): novel anticancer drugs, strongly mutagenic in mammalian but not prokaryotic test systems. **Mutagenesis**, v.2, p.179 – 186, 1987.

HAJEK, R.; VORLICEK, J.; SLAVIK, M. Paclitaxel (Taxol®); A review of its antitumor activity in clinical studies. **Neoplasma**, v.43, p.141 – 154, 1996.

HANAHAN, D., WEINGERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57 – 70, 2000.

HARBOWY, M.E.; BALENTINE, D.A. Tea Chemistry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.16, p.415 – 480, 1997.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay). **Toxicology Letters**, v.90, p.183 - 188, 1997.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L.; McDOWALL, R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.17, p.193 - 218, 1998.

HASEGAWA, S.; MIYAKE, M. Biochemistry and biological functions of citrus limonoids. **Food Reviews International**, v.12, p.413 – 435, 1996.

HASLER, C.M. A new look at an ancient concept. **Chemistry & Industry**, v.2, p.84 – 89, 1998.

HAWTHORNE, D.C.; LEOPOLD, U. **Current topics in microbiology and immunology**. Springer Verlag, Berlin, 1974.

HAWTHORNE, D.C. Identification of nonsense codons in yeast. **Journal of Molecular Biology**, v.43, p.71 – 75, 1969.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vitro* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v.18, p.187 – 190, 1973.

HENRIQUES, J.AP.; VALSA, J.O.; GOMES, R.A. Utilização de testes de microrganismos para detecção de atividade mutagênicas e/ou potencialmente mutagênicas. In: PINTO, S.O C.(ed) **Genética molecular de microrganismos**. São Paulo, Manole, p.330-350, 1987.

HENSCHLER, D.; EDER, E. Structure-activity relationships of alpha, beta-unsaturated carbonylic compounds. **International Agency for Research on Cancer - Scientific Publications**, v.70, p.197 – 205, 1986.

HERR, H.W.; MORALES, A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. **Journal of Urology**, v.179, p.53 – 56, 2008.

HOROWITZ, S.; MAOR, R.; PRIEL, E. Characterization of DNA topoisomerase activity in two strains of *Mycoplasma fermentans* and in *Mycoplasma pirum*. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.6626 – 6632, 1997.

HUANG, Z.Y.; WU, Y.; HEDRICK, N.; GUTMANN, D.H. T-cadherin-mediated cell growth regulation involves G₂ phase arrest and requires p21(CIP1/WAF1) expression. **Molecular and Cellular Biology**, v.23, p.566 – 578, 2003.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p.94, 2007.

IWASHITA, M.; OKA, N.; OHKUBO, S.; SAITO, M.; NAKAHATA, N. Piperlongumine, a constituent of *Piper longum* L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A₂ receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v.570, p.38 – 42, 2007.

JANZOWSKI, C.; GLAAB, V.; MUELLER, C.; STRAESSER, U.; KAMP, H.G.; EISENBRAND, G. α,β -Unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells. **Mutagenesis**, v.18, p.465 - 470, 2003.

JUNG, A.; BRABLETZ, T.; KIRCHNER, T. The migrating cancer stem cells model--a conceptual explanation of malignant tumour progression. **Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings**, v.5, p.109 – 124, 2006.

KATZUNG, G.B. **Basic and Clinical Pharmacology**, 9th edn., McGraw-Hill Medical, United States of America, p.1088, 2003.

KHOSRAVI-SHAHI, P.; FERNÁNDEZ-PINEDA, I. Tumoral angiogenesis: review of the literature. **Cancer Investigation**, v.26, p.104 – 108, 2008.

KIMANANI, E.K. Bioanalytical calibration curves: proposal for statistical criteria. **Journal of pharmacological and biomedical analysis**, v.16, p.1117 - 1124, 1998.

KINGSTON, D.G.I. **Taxol and its analogs**. In: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J. (Eds.), *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 89 – 122, 2005.

KINGSTON, D.G.I. The Chemistry of Taxol. **Pharmacology & Therapeutics**, v.52, p.1 - 34, 1991.

KINGSTON, D.G.I. Recent advances in the chemistry of taxol. **Journal of Natural Products**, v.63, p.726 - 734, 2000.

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, p.102 - 114, 1996.

KLUZA, J.; BALDEYROU, B.; COLSON, P.; RASOANAIVO, P.; MAMBU, L.; FRAPPIER, F.; BAILLY, C. Cytotoxicity and DNA binding properties of the plant alkaloid burasaine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.20, p.383 – 391, 2003.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.; KUIJTEN, G.A.; KEEHNEN, R.M.; PALS, S.T.; VAN OERS, M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v.84, p.1415 - 1420, 1994.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease**, 7th edn., WB Saunders, China, p.1552, 2004.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180-bearing mice and EL4-bearing mice. **Gann**, v.73, p.85 – 90, 1982.

KUSUZAKI, K.; MURATA, H.; MATSUBARA, T.; SATONAKA, H.; WAKABAYASHI, T.; MATSUMINE, A.; UCHIDA, A. Review. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy. **In Vivo**, v.21, p.205 – 214, 2007.

LAGO, J.H.; CHAVES, M.H.; AYRES, M.C.; AGRIPINO, D.G.; YOUNG, M.C. Evaluation of antifungal and DNA-damaging activities of alkaloids from branches of *Porcelia macrocarpa*. **Planta Medica**, v.73, p.292 – 295, 2007.

LARSEN, A.K.; ESCARGUEIL, A.E.; SKLADANOWSKI, A. From DNA damage to G₂ arrest: the many roles of topoisomerase II. **Progress in Cell Cycle Research**, v.5, p.295 – 300, 2003.

LE-CURIEUX, F.; MARZIN, D.; ERB, F. Comparison of the three short-term assays: results of seven chemicals. Potential contribution to the control of water genotoxicity. **Mutation Research**, v.319, p.223 - 236, 1993.

LEE, K.H.; XIAO, Z. **Podophyllotoxins and analogs**. In: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J. (Eds.), *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 71 – 88, 2005.

LEVERKUS, M. Imiquimod: unexpected killer. **The Journal of investigative dermatology**, v.122, p.15 - 16, 2004.

LI, N.; SONG, Y.; ZHANG, W.; WANG, W.; CHEN, J.; WONG, A.W.; ROBERTS, A. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of magnolia bark extract. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.49, p.154 – 159, 2007.

LI, Y.; ELIE, M.; BLANER, W.S.; BRANDT-RAUF, P.; FORD, J. Lycopene, smoking and lung cancer. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, v.38, p.A758, 1997.

LORENZI, T.F. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 4^o ed., Medsi, p.722, 2006.

MA, J.; JONES, S.H.; MARSHALL, R.; JOHNSON, R.K.; HECHT, S.M. A DNA-damaging oxoaporphine alkaloid from *Piper caninum*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1162 – 1164, 2004.

MACGREGOR, J.T.; CASCIANO, D.; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**, v.455, p.3 - 20, 2000.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; TICE, R.R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v.189, p.103 – 112, 1987.

MACKLIS, J.D.; MADISON R.D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **Journal of Neuroscience Methods**, v.31, p.43 – 46, 1990.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v.146, p.3 - 15, 1995.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Câncer**, v.2, p.143 – 148, 2002.

MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; MACHO, A.; HAEFFNER, N.; HIRSCH, F.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v.184, p.1155 – 1160, 1996.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, **Mutation Research**, v.113, p.173 – 215, 1983.

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

MEHMET, H. Apoptosis: caspase Wnds a new place to hide. **Nature**, v.403, p.29 – 30, 2002.

MEI, H.; HSIEH, Y.; NARDO, C.; XU, X.; WANG, S.; KORFMACHER, K.; NG, W.A. Rapid commun. **Mass Spectrometry**, v.17, p.97 – 103, 2003.

MELAMED, M.R.; MULLANEY, P.F.; MENDELSON, M.L. **Flow cytometry and sorting**. John Wilwy & sons, 1979.

MERCHANT, S.H.; GONCHOROFF, N.J.; HUTCHISON, R.E. Apoptotic index by Annexin V flow cytometry: adjunct to morphologic and cytogenetic diagnosis os myelodisplastic syndromes. **Cytometry**, v.46, p.28 - 32, 2001.

MESSINA, M.; BARNES, S. The role of soy products in reducing risk of cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.83, p.541 – 546, 1991.

MESSINA, M.; BARNES, S.; SETCHELL, K.D.R. Phytoestrogens and breast cancer. **Lancet**, v.350, p.971 - 972, 1997.

MEYSKENS, F.L.JR.; SZABO, E. Diet and cancer: the disconnect between epidemiology and randomized clinical trials. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.14, p.1366 – 1369, 2005.

MILITAO, G.C.G.; DANTAS, I.N.F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M.J.C.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Induction of apoptosis by pterocarpan from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sciences**, v.78, p.2409 - 2417, 2006.

MORINAGA, Y.; SUGA, Y.; EHARA, S.; HARADA, K.; NIHEI, Y.; SUZUKI, M. Combination effect of AC-7700, a novel combretastatin A-4 derivative, and cisplatin against murine and human tumors *in vivo*. **Cancer Science**, v.94, p.200 – 204, 2003.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.455, p.29 – 60, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v.16, p.55 – 63, 1983.

MYERS, L.; ADAMS, N.; KIER, L.; RAO, T.K.; SHAW, B.; WILLIAMS, L. **Microcomputer software for data management and statistical analysis of the Ames/Salmonella test**. In: Krewski, D. and C. A. Franklin (Eds.), *Statistics in Toxicology*, Gordon and Breach, New York, p.265 – 279, 1991.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. **Journal of histochemistry and cytochemistry**, v.49, p.1183 – 1186, 2001.

NAKANOMYO, H.; HIRAOKA, M.; SHIRAYA, M. Mutagenicity tests of etoposide and teniposídeo. **Journal of Toxicological Sciences**, v.11, p.301 – 310, 1986.

NAKAYACHI, T.; YASUMOTO, E.; NAKANO, K.; MORSHED, S.R.M.; HASHIMOTO, K.; KIKUCHI, H.; NISHIKAWA, H.; KAWASE, M.; SAKAGAMI, H. Structure-activity relationships of α,β -unsaturated ketones as assessed by their cytotoxicity against oral tumor cells. **Anticancer Research**, v.24, p.737 – 742, 2004.

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

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v.17, p.215 – 134, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1022 – 1037, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461 – 477, 2007.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v.267, p.5421 - 5426, 2000.

OKAWA, Y.; MURATA, Y.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, M.E.; SUZUKI, S. Argumentation of host resistance to *Candida albicans* infection in ascite tumor-bearing mice. **Microbiology and Immunology**, v.36, p.517 – 521, 1992.

OLIVEIRA, E.D. **Mecanismo de ação vasorelaxante de piplartina, uma alcaloide isolada das raízes e do caule de *Piper tuberculatum* jacq. (piperaceae), em aorta de rato**. Dissertação de mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2000.

OPALKA, B.; DICKOPP, A.; KIRCH, H.C. Apoptotic genes in cancer therapy. **Cells Tissues Organs**, v.172, p.126 - 132, 2002.

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). **Guideline for testing of chemicals nº 474**. Genetic Toxicology: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 1997.

ORMEROD, M.G. The study of apoptotic cells by flow cytometry. **Leukemia**, v.12, p.1013 - 1025, 1998.

ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicology Letters**, v.149, p.19 - 23, 2004.

ORTHOLAND, J.Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.8, p.271 - 280, 2004.

PARK, B.S.; SON, D.J.; PARK, Y.H.; KIM, T.W.; LEE, S.E. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. **Phytomedicine**, v.14, p.853 – 855, 2007.

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**, v.46, p.597 – 673, 1997.

PARRY, E.M.; PARRY, J.M. The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Mutagenicity testing: A practical approach**, Venitt, S.; Parry, S. M (Eds.), ORL Press, Oxford, Washington, 1984.

PÉREZ, L.; DANISHEFSKY, S.J. Chemistry and biology in search of antimetastatic agents. **ACS Chemical Biology**, v.2, p.159 – 162, 2007.

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

PESSOA, C.; SILVEIRA, E.R.; LEMOS, T.L.; WETMORE, L.A.; MORAES, M.O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytotherapy research**, v.14, p.187 – 191, 2000.

PEZZUTO, J.M. Plant-derived anticancer agents. **Biochemical Pharmacology**, v.53, p.121 - 133, 1997.

PHILLIPSON, J.D.; ANDERSON, L.A. Ethnopharmacology and Western medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.25, p.61 – 72, 1989.

PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; CKLESS, K.; SALVADOR, M.; KHROMOV-BORISOV, N.N.; HENRIQUES, J.A.P. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacterial and yeast. **Mutation Research**, v.539, p.29 – 41, 2003.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p.45 - 61, 2002.

PITTLER, M.H.; ERNST, E. Clinical effectiveness of garlic (*Allium sativum*). **Molecular Nutrition & Food Research**, v.51, p.1382 – 1385, 2007.

PLASSCHAERT, S.L.A.; KAMPS, W.A.; VELLENGA, A.; VRIES, E.G.E.; DE-BONT, E.S.J.M. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia: a question of maturation? **Cancer Treatment Reviews**, v.30, p.37 – 51, 2004.

PLESCA, D.; CROSBY, M.E.; GUPTA, D.; ALMASAN, A. E2F4 function in G2: maintaining G2-arrest to prevent mitotic entry with damaged DNA. **Cell Cycle**, v.6, p.1147 – 1152, 2007.

POLI, P.; BUSCHINI, A.; CANDI, A.; ROSSI, C. Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochromo P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutagenesis**, v.14, p.233 - 238, 1999.

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

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

RABBITTS, T.H. Chromosomal translocation master genes, mouse models and experimental therapeutics. **Oncogene**, v.20, p.5763 – 5777, 2001.

RABBITTS, T.H.; APPERT, A.; CHUNG, G.; COLLINS, E.C.; DRYNAN, L.; FORSTER, A.; LOBATO, M.N.; MCCORMACK, M.P.; PANNELL, R.; SPANDIDOS, A.; STOCKS, M.R.; TANAKA, T.; TSE, E. Mouse models of human chromosomal translocations and approaches to cancer therapy. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v.27, p.249 – 259, 2001.

RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.P.R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Genética**, v.1, p.246, 1991.

RAFFOUL, J.J.; SARKAR, F.H.; HILLMAN, G.G. Radiosensitization of prostate cancer by soy isoflavones. **Current Cancer Drug Targets**, v.7, p.759 – 765, 2007.

RAHIER, N.J.; THOMAS, C.J.; HECHT, S.M. **Camptothecin and its analogs**. In: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J. (Eds.), *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 5 – 22, 2005.

RIVLIN, R.S. Nutrition and cancer prevention: New insights into the role of phytochemicals. Future directions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.492, p.255 – 262, 2001.

ROLLA, H.C. **Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimento do Rio Guaíba e lodo proveniente da indústria de papel e celulose**. Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 1995.

ROTHENBERG, M.L.; CARBONE, D.P.; JOHNSON, D.H. Improving the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities. **Nature Reviews**, v.3, p.303 - 309, 2003.

RUSTHOVEN, K.E.; RABEN, D.; BALLONOFF, A.; KANE, M.; SONG, J.I.; CHEN, C. Effect of Radiation Techniques in Treatment of Oropharynx Cancer. **Laryngoscope**, v.118, p.635 - 639, 2008.

SALVESEM, G.S.; DIXIT, V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, v.91, p.443 – 446, 1997.

SCHEUER, P.J.; LEFKOWITCH, J.H. Drugs and toxins. In: **Liver Biopsy Interpretation**, 6th edn., Scheuer PJ, Lefkowitz JH (eds). WB Saunders, London, p.134 – 150, 2000.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v.31, p.9 – 15, 1975.

SCHULLER, R.C.; VON-BORSTEL, R.C. Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration. **Mutation Research**, v.24, p.17 – 23, 1974.

SCHWARTSMANN, G.; RATAIN, M.J.; CRAGG, G.M.; WONG, J.E.; SAIJO, N.; PARKINSON, D.R.; FUJIWARA, Y.; PAZDUR, R.; NEWMAN, D.J.; DAGHER, R.; DI-LEONE, L. Anticancer drug discovery and development throughout the world. **Journal of Clinical Oncology**, v.20, p.47S - 59S, 2002.

SCHWARZ, S.; OBERMÜLLER-JEVIC, U.C.; HELLMIS, E.; KOCH, W.; JACOBI, G.; BIESALSKI, H.K. Lycopene inhibits disease progression in patients with benign prostate hyperplasia. **Journal of Nutrition**, v.138, p.49 – 53, 2008.

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

SELVENDIRAN, K.; SINGH, J.P.V.; SAKTHISEKARAN, D. *In vivo* effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v.19, p.107 – 111, 2006.

SEREN, S.; LIEBERMAN, R.; BAYRAKTAR, U.D.; HEATH, E.; SAHIN, K.; ANDIC, F.; KUCUK, O. Lycopene in cancer prevention and treatment. **American Journal of Therapeutics**, v.15, p.66 – 81, 2008.

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

SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; FINDLAY, J.W.A.; HILL, H.M.; HULSE, J.D.; MCGILVERAY, I.J.; MCKAY, G.; MILLER, K.J.; PATNAIK, R.N. POWELL, M.L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C.T.; YACOBI, A. Bioanalytical method validation – A revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, v.17, p.1551 – 1557, 2000.

SHAPIRO, H.M. **Practical flow cytometry**. Alan R. Liss, Inc., New York, 1985.

SHARGEL, L.; YU, A.B.C. **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**, 4th ed., Appleton & Lange, Stamford, p.768, 1999.

SHUKLA, Y.; KALRA, N. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. **Cancer Letter**, v.247, p.167 – 181, 2007.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; **Genética Toxicologia**. Porto Alegre, Alcance, p.422, 2003a.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v.26, p.407 - 416, 2003b.

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

SINGH, N.P.; MACCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184 - 191, 1988.

SINGH, N.P.; STEPHENS, R.E. Microgel eletrophoresis: sensitivity, mechanisms and DNA eletrostretching. **Mutation Research**, v.383, p.167 - 175, 1996.

SINGH, N.P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein cross links and apoptosis. **Mutation Research**, 455, 111 - 127, 2000.

SINGH, Y.N.; SINGH, N.N. Therapeutic potential of kava in the treatment of anxiety disorders. **Central Nervous System Drugs**, v.16, p.731 – 743, 2002.

SOREIDE, J.A.; EIRIKSSON, K.; SANDVIK, O.; VISTE, A.; HORN, A.; JOHNSEN, G.; GRONBECH, J.E. Surgical treatment of liver metastases from colorectal cancer. **Tidsskr nor Laegeforen**, v.128, p.50 – 53, 2008.

SOUZA, M.V.N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v.27, p.308 - 312, 2004.

SPANDIDOS, D.A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. **Journal of Buon**, v.12 Suppl 1, p.S9 – 12, 2007.

SPANDIDOS, D.A. Mechanism of carcinogenesis: The role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors. **Anticancer Research**, v.5, p.485 – 498, 1985.

SPENCE, R.A.J.; JONHSTON, P.G. **Oncology**, Oxford University Press, Oxford, p.536, 2001.

STEINMETZ, K.A.; KUSHI, H.; BOSTICK, R.M.; FOLSOM, A.R.; POTTER, J.D. Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v.139, p.1 – 15, 1994.

STEWART, H.L.; SNEU, K.C.; DUNHAM, L.J.; SCHLYEN, S.M. **Transplantable and Transmissible Tumors of Animals**. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, p.324 – 329, 1959.

STRASSER, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.5, p.189 - 200, 2005.

SUBRAMANIAN, B.; NAKEFF, A.; TENNEY, K.; CREWS, P.; GUNATILAKA, L.; VALERIOTE, F. A new paradigm for the development of anticancer agents from natural products. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v.5, p.195 – 204, 2006.

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

SYED, D.N.; KHAN, N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Chemoprevention of prostate cancer through dietary agents: progress and promise. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.16, p.2193 – 2203, 2007.

TAKIGUCHI, N.; SAITO, N.; NUNOMURA, M.; KOUUDA, K.; ODA, K.; FURUYAMA, N.; NAKAJIMA, N. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.47, p.11 – 14, 2001.

TERZIYSKA, A.; WALTSCHWA, L.; VENKOV, P. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. **Environmental Pollution**, v.109, p.43 - 52, 2000.

THOMAS, G. **Medicinal Chemistry: An Introduction**. John Wiley & Sons, Chichester, 2000.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206 – 221, 2000.

TICE, R.R.; ORMISTON, B.G.; BOUCHER, R.; LUKE, C.A.; PAQUETTE, D.S. Environmental biomonitoring with feral rodent species. In: Sandhu, S., Waters, M.D. (Eds) **Application of short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures**. Plenum Publishing Co, New York, p.175 - 180, 1998.

TICE, R.R. Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: Butterworth, B.E., Corkun, L.D., Guzmán-Rincón, J.(Eds) **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environment Change**. Plenum Press, New York, p.69 - 79, 1995.

TISHER, C.C.; BRENNER, B.M. **Renal pathology: with clinical and functional correlations**. JB Lippincott Company, Philadelphia, 1994.

TRIPATHI, Y.B.; TRIPATHI, P.; ARJMANDI, B.H. Nutraceuticals and cancer management. **Frontiers in Bioscience**, v.10, p.1607 – 1618, 2005.

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 Medica**, v.71, p.535 – 542, 2005.

VAN-DER-HEIJDEN, R.; JACOBS, D.I.; SNOEIJER, W.; HALLARD, D.; VERPOORTE, R. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, p.607 – 628, 2004.

VARLEY, H.; GOWENLOCK, A.M.; BELL, M. In: **Practical Clinical Biochemistry**, Vol 1, 5th edn., William Heinmann Medical Books, London, p.452, 1980.

VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H., REUTELINGSBERGER, C.A novel for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v.184, p.39 - 51, 1995.

VON-BORSTEL, R.C.; CAIN, K.T.; STEINBERG, C.M. Inheritance of spontaneous mutability in yeast. **Genetics**, v.69, p.17 – 27, 1971.

VON-BORSTEL, R.C.; HIGGINS, J.A. Janus carcinogens and mutagens. **Mutation Research**, v.402, p.321 – 329, 1998.

WELLING, P.G. **Pharmacokinetics: processes, mathematics, and applications**. 2nd edn., American Chemical Society, Washington, p.393, 1997.

WERMUTH, G.; GANELLIN, C.R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L.A.; Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v.70, p.1129 - 1143, 1998.

WERNERT, N. Immunohistochemistry of the prostate and prostate carcinomas. **Veroffentlichungen aus der Pathologie-Progress in Pathology**, v.135, p.1 - 163. 1991.

WESTERTERP-PLANTENGA, M.; DIEPVENS, K.; JOOSEN, A.M.; BÉRUBÉ-PARENT, S.; TREMBLAY, A. Metabolic effects of spices, teas, and caffeine. **Physiology & Behavior**, v.89, p.85 – 91, 2006.

WESTWELL, A.D.; STEVENS, M.F.G. Hitting the chemotherapy jackpot: strategy, productivity and chemistry. **Drug Discovery Today**, v.9, p.625 – 627, 2004.

WOJEWODZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. **Mutation Research**, v.518, p.9 – 20, 2002.

WOLFE, K.L.; LIU, R.H. Apple peels as a value-added food ingredient. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1676 – 1683, 2003.

World Health Organization. Cancer (WHO). Fact sheet n° 297. Feb 2006. [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>.

WU, A.H.; YU, M.C.; TSENG, C.C.; PIKE, M.C. Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. **British journal of cancer**, v.98, p.9 – 14, 2008.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, p.147 - 152, 2001.

ZIMMERMANN, F.K. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, v.31, p.71 - 86, 1975.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v.33, p.2278 - 2282, 1973.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S.C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, v.175, p.17 – 25, 2002.

Anexos



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 4009-8338 Fax (85) 4009-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 45/05, sobre o projeto intitulado “**Determinação do mecanismo de ação e estudo da relação estrutura-atividade da piplartina e seus análogos**”, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA em reunião realizada em 15 de dezembro de 2005.

Fortaleza, 16 de dezembro de 2005

Assinatura manuscrita em tinta preta, legível como "Gisela".

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

In vitro and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine

Daniel P. Bezerra,¹ Fernanda O. de Castro,¹ Ana Paula N. N. Alves,² Cláudia Pessoa,¹ Manoel Odorico de Moraes,¹ Edilberto R. Silveira,³ Mary Anne S. Lima,³ Francisca Juliana M. Elmiro,³ Nylane M. N. de Alencar,¹ Rodney O. Mesquita,¹ Michael W. Lima¹ and Letícia V. Costa-Lotufo^{1,*}

¹ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 3157, 60430-270 Fortaleza, Ceará, Brazil

² Departamento de Clínica Odontológica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

³ Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Received 2 February 2007; Revised 21 March 2007; Accepted 23 March 2007

ABSTRACT: It has been reported that piplartine and piperine, alkaloid/amide compounds from *Piper* species, show antitumor activities. In the present paper, the effects of the combination of 5-fluorouracil (5-FU) with piplartine or piperine was determined using *in vitro* and *in vivo* experimental models. Hematological and biochemical analyses, as well as histopathological and morphological analyses of the tumor and the organs, including liver, spleen and kidney, were performed in order to evaluate the toxicological aspects associated with different treatments. The incubation of tumor cell lines with 5-FU in the presence of piplartine or piperine produced an increase in growth inhibition, as observed by lower IC₅₀ values for 5-FU. These effects were also observed *in vivo*, where the combination with piplartine but not piperine with 5-FU led to a higher tumor growth inhibition. The results indicated that either piplartine- or 5-FU-treated animals showed a low inhibition rate when they were used individually at low doses of 28.67% and 47.71%, respectively, but when they were combined at the same dose, the inhibition rate increased significantly to 68.04%. The histopathological analysis showed that the livers and the kidneys of treated animals were only slightly and reversibly affected. Neither the enzymatic activity of transaminases nor the urea levels were significantly modified when compared with the control group. Hematological analysis showed leukopenia after 5-FU treatment, which was reversed by the combined use of piplartine and piperine. These findings indicate that piplartine may enhance the therapeutic effectiveness of chemotherapeutic drugs, and moreover, this combination could improve immunocompetence hampered by 5-FU. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: piplartine; piperine; 5-fluorouracil; antitumor activity; toxicity

Introduction

Natural products are the most consistent source of drug leads. Newer developments based on natural products include many anticancer agents, such as vindesine, vinorelbine, etoposide, docetaxel and topotecan (Cragg and Newman, 2005). Therefore, the use of natural products has been the single most successful strategy for the discovery of new medicines used in anticancer therapy.

Many naturally occurring plant-derived substances ingested in the human diet exhibit anticarcinogenic and

antimutagenic effects (Reen and Singh, 1991; Annu *et al.*, 1998). Many authors have emphasized that the phytochemicals isolated from spices, such as peppers, are potent biological agents with interesting anticancer properties (Lampe, 2003). Various amides bearing isobutyl, pyrrolidine, dihydropyridone and piperidine moieties have been isolated from Piperaceae species (Parmar *et al.*, 1997). These amides have generated interest as a result of their potent cytotoxic activity towards tumor cell lines (Tsai *et al.*, 2005).

Piperine is a major plant alkaloid/amide present in black and long peppers (*Piper nigrum* and *Piper longum*), which is one of the most common spices consumed by a large number of people worldwide. It is shown to possess diverse pharmacological activities (reviewed by Parmar *et al.*, 1997). Concerning anticancer related properties, piperine has been reported to inhibit lung metastasis (Pradeep and Kuttan, 2002), and to possess antitumor activities in different animal models (Sunila and Kuttan, 2004; Bezerra *et al.*, 2006).

* Correspondence to: L. V. Costa-Lotufo, Department of Physiology and Pharmacology, UFC, Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, 60430-270 Fortaleza, Ceará, Brazil.

E-mail: lvcosta@secrel.com.br

Contract/grant sponsor: CNPq.

Contract/grant sponsor: Instituto Claude Bernard.

Contract/grant sponsor: FUNCAP.

Contract/grant sponsor: Banco do Nordeste.

Contract/grant sponsor: FINEP.

Piplartine is also an alkaloid/amide present in *Piper* species. Biological activities described for this amide include antifungal, antiplatelet, cytotoxic and antitumor activities (Duh and Wu, 1990; Duh *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2005; Bezerra *et al.*, 2005; 2006; 2007).

The aim of this study was to investigate the effect of piplartine and piperine in combination with the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil (5-FU) using both *in vitro* and *in vivo* experimental models. In order to evaluate the toxicological aspects related to different treatments, hematological, biochemical, histopathological and morphological analyses of treated animals were performed.

Material and Methods

Drugs

Piplartine was purified from the roots of *Piper tuberculatum* as described by Bezerra *et al.* (2005). Briefly, 420.0 g of ground roots of *P. tuberculatum* was macerated with a mixture of petroleum/ethyl acetate 1:1 (1.5 l) for 24 h (3 \times). The solvent mixture was evaporated under reduced pressure to yield a yellowish solid (13.24 g), which provided piplartine (4.35 g) (Fig. 1) after crystallization from MeOH. Piplartine, obtained as a pure compound, was characterized particularly by 1D and 2D NMR analyses and m.p. 122.2–122.6 °C (Lit. 128–130 °C and 124 °C, Atal *et al.*, 1975; Braz-Filho *et al.*, 1981).

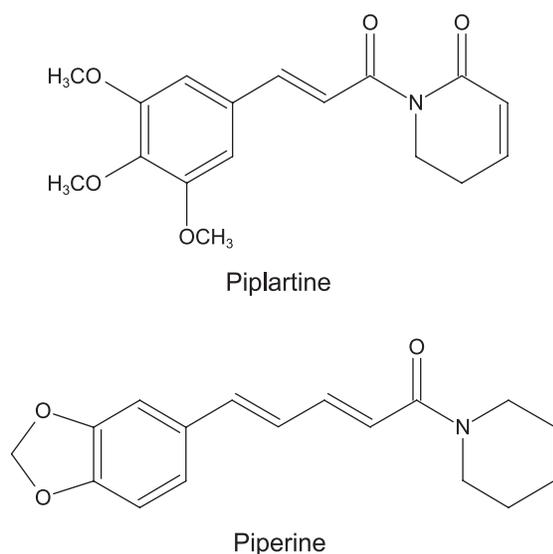


Figure 1. Chemical structure of piplartine {5,6-dihydro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propenyl]-2(1H)pyridinone} and piperine {1-5-(1,3)-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl]piperidine}

Piperine, from black pepper seeds, was purchased from Acros Organics (New Jersey, USA) (Fig. 1). 5-FU was purchased from Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).

Animals and Tumor Cells

In vitro cytotoxicity was determined in tumor cells using HL-60 (leukemia), MDA-MD-435 (breast), SF295 (central nervous system) and HCT-8 (colon) human cell lines obtained from the National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA. All cell lines were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 μ g ml⁻¹ streptomycin at 37 °C with 5% CO₂.

A total number of 140 Swiss mice (female, 25–30 g) obtained from the Central Animal House of the Federal University of Ceará, Brazil were used. Animals were housed in cages with free access to food and water. All animals were kept under a 12 h:12 h light-dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). Animals were treated according to the ethical principles of animal experimentation of COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), Brazil. The Animal Studies Committee of Federal University of Ceará approved the experimental protocol.

Sarcoma 180 tumor cells were maintained in the peritoneal cavities of the Swiss mice in the Laboratory of Experimental Oncology from the Federal University of Ceará since the mid 1980s.

Cell Proliferation Assays

For all experiments, cells were plated in 96-well plates (10⁵ cells/well for adherent cells or 0.5 \times 10⁵ cells/well for suspended cells in 100 μ l of medium). The cytotoxicity of 5-FU was accessed in the absence or presence of piplartine (5 μ M) or piperine (50 μ M). Piplartine and piperine concentrations were determined from previous experiments to avoid any cytotoxic activity related to amide treatments. The vehicle was used as a negative control. Tumor cell growth was assessed according to changes in the viable cell number as determined by the ability of living cells to reduce the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a purple formazan product (Mosmann, 1983). At the end of incubation (72 h), the plates were centrifuged and the medium was then replaced by fresh medium (200 μ l) containing 0.5 mg ml⁻¹ MTT. Three hours later, the MTT formazan product was dissolved in 150 μ l DMSO, and the absorbance was measured using a multiplate reader (Spectra Count, Packard, Ontario, Canada). The drug effect was quantified as the percentage of control absorbance of reduced dye at 595 nm.

Assay of Antitumor Activity and Toxicological Study

Ten-day-old Sarcoma 180 ascites tumor cells (2×10^6 cell/500 μ l) were implanted subcutaneously into the left hind groin of the mice. One day after inoculation, piplartine or piperine (50 mg kg⁻¹) alone or combined with 5-FU (10 mg kg⁻¹) was dissolved in 10% DMSO and administered intraperitoneally for 7 days in mice transplanted with sarcoma 180 tumor and in healthy mice. These doses were selected based on their rate inhibition obtained from previous work (Bezerra *et al.*, 2006). 5-FU (10 mg kg⁻¹) was used as a positive control. The negative control was injected with 10% DMSO or 0.9% NaCl. On day 8, the mice were killed. Tumors, livers, spleens and kidneys were extirpated, weighed and fixed in 10% formaldehyde. The tumor inhibition ratio (%) was calculated by the following formula: inhibition ratio (%) = $[(A-B)/A] \times 100$, where *A* is the mean tumor weight of the negative control, and *B* is that of the treated group. Body weights were measured at the start and at the last day of treatment. Peripheral blood was obtained by retro-orbital venous plexus sampling with a heparinized capillary tube from healthy mice or mice transplanted with sarcoma 180 tumor and used for hematological and biochemical analyses.

Biochemical and Hematological Parameters

Blood samples of the treated-animals were collected from the retro-orbital plexus under light ether anesthesia. Biochemical analyses were performed in serum samples obtained after centrifugation of total blood without anticoagulants, at 2500 rpm for 15 min. Standardized diagnostic kits from LABTEST® (Lagoa Santa, MG, Brazil) were used in the spectrophotometric determination of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and urea.

For the hematological analysis, an aliquot of blood per animal was placed in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and various hematological parameters (hemoglobin content, platelet count, total and differential count

of leukocytes) were carried out by standard manual procedures using light microscopy.

Histopathology and Morphological Observations

After being fixed with formaldehyde, tumors, livers, spleens and kidneys were grossly examined for size or color changes and hemorrhage. Subsequently, portions of the tumor, liver, spleen and kidney were cut into small pieces, followed by staining with hematoxylin and eosin of the histological sections. Histological analyses were performed by light microscopy. The occurrence and the extent of liver or kidney lesions attributed to drugs were recorded.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM. The differences between experimental groups were compared by ANOVA followed by Student Newman Keuls or Bonferroni tests ($P < 0.05$).

Results

Effects of 5-FU combined with Piplartine or Piperine on Tumor Cells *In Vitro*

Before determining the effects of 5-FU combined with piplartine or piperine, the IC₅₀ of piplartine and piperine were determined separately. The obtained IC₅₀ values were in the range 6.0–7.8 μ M and 77.1– > 87.56 μ M for piplartine and piperine, respectively (Bezerra *et al.*, 2005). To investigate the effects of 5-FU, the cytotoxicity was accessed in the absence or in the presence of piplartine (5 μ M) or piperine (50 μ M), considering that these concentrations do not account for more than 20% of the effect itself. Table 1 shows the IC₅₀ values attained for 5-FU in the absence and presence of piplartine or piperine. The 5-FU concentration required to cause 50% growth inhibition (IC₅₀) in HL-60, MDA-MB435, SF295

Table 1. *In vitro* cytotoxicity of 5-FU in the absence and presence of piplartine or piperine on tumor cell lines. Data are presented as IC₅₀ \pm SEM values from two independent experiments performed in quadruplicate ($n = 8$) for leukemia (HL-60), colon (HCT-8), brain (SF295) and breast (MDA-MB435) cancer cells

Cell line	–	5-Fluorouracil	
		Piperine (50 μ M)	Piplartine (5 μ M)
HCT-8	11.18 \pm 0.71	9.13 \pm 0.39	4.70 \pm 0.55 ^a
SF-295	2.33 \pm 0.51	2.40 \pm 0.30	0.49 \pm 0.11 ^a
HL-60	84.68 \pm 0.66	55.53 \pm 0.39 ^a	38.13 \pm 0.43 ^a
MDA-MB435	9.19 \pm 0.85	4.91 \pm 0.59 ^a	1.95 \pm 0.27 ^a

^a $P < 0.05$ compared with 5-FU alone by ANOVA followed by Student Newman-Keuls.

and HCT-8 cells was 84.68, 9.19, 2.33 and 11.18 μM , respectively.

Piplartine increased the efficacy of 5-FU in all cell lines tested as observed by the lower IC_{50} value. For example, when 5-FU was used in combination with 5 μM piplartine, the IC_{50} value diminished from 2.33 to 0.49 μM in SF-295 cells. On the other hand, piperine increased the cytotoxicity of 5-FU in only HL-60 and MDA-MB435 cells. Table 1 indicates that combined treatment with piperine (50 μM) reduced the IC_{50} of 5-FU from 84.68 to 55.53 μM in HL-60 and from 9.19 to 4.91 μM in MDA-MB435 cells.

Effects of 5-FU combined with Piplartine or Piperine on Sarcoma 180 Tumor in Mice transplanted *In Vivo*

The effects of 5-FU combined with piplartine or piperine on sarcoma 180-transplanted mice are shown in Table 2. Piplartine and piperine doses were determined by previous experiments using sarcoma 180 tumor cells as a model (Bezerra *et al.*, 2006). There was a significant reduction in tumor weight in animals treated with 5-FU, piperine or piplartine, as well as with 5-FU combined with piperine or piplartine ($P < 0.05$). On day 8, the mean tumor weight of the control mice was 1.90 ± 0.12 g, while in the drug-treated mice it was 1.43 ± 0.12 g with piplartine, 1.04 ± 0.15 g with piperine and 0.99 ± 0.10 g with 5-FU. When the animals were treated with 5-FU combined with piplartine or piperine, the mean tumor weights were 0.61 ± 0.10 g and 0.99 ± 0.11 g, respectively. There were statistically significant differ-

ences between the two alkaloids and among doses in relation to the control group, but only piplartine added to 5-FU was statistically different from 5-FU alone ($P < 0.05$). Tumor growth inhibition increased to 68.04% with 5-FU plus piplartine, but was not modified by the combination of 5-FU with piperine at the same concentration.

Histopathological analyses of the tumors extirpated from control mice showed groups of large, round and polygonal cells, with pleomorphic shapes, hyperchromatic nuclei and binucleation. Several degrees of cellular and nuclear pleomorphism were seen. Mitosis, muscle invasion and coagulation necrosis were also noticed. In the tumors extirpated from treated animals, extensive areas of coagulative necrosis were observed.

Thus, the results indicated that piplartine, piperine or 5-FU inhibited tumor growth when used individually, but when 5-FU was combined with piplartine at the same doses, tumor growth inhibition increased significantly. This indicated that piplartine may increase the antitumor activity of 5-FU.

Toxicological Aspects of 5-FU Treatment with and without Piplartine or Piperine

No significant changes in the renal (urea level) or liver (enzymatic activity of transaminases AST and ALT) parameters were seen in any animals treated with piplartine or piperine alone or in combination with 5-FU ($P > 0.05$) in mice transplanted with sarcoma 180 tumor or healthy mice (Table 3).

The animals transplanted with sarcoma 180 tumor and treated only with saline showed a significant increase

Table 2. The percent inhibition of 5-FU combined with piplartine or piperine in mice transplanted with sarcoma 180 tumor or healthy mice

Drug	Dose (mg kg ⁻¹)	Liver (g 100 g ⁻¹ body weight)	Spleen (g 100 g ⁻¹ body weight)	Kidney (g 100 g ⁻¹ body weight)	Tumor (g)	Inhibition (%)
Healthy mice						
Saline	–	4.51 \pm 0.18	0.23 \pm 0.02	1.09 \pm 0.03	–	–
10% DMSO	–	4.29 \pm 0.20	0.40 \pm 0.08	1.11 \pm 0.05	–	–
5-FU	10	4.57 \pm 0.27	0.45 \pm 0.01	1.05 \pm 0.08	–	–
Piplartine	50	4.28 \pm 0.40	0.31 \pm 0.04	1.15 \pm 0.05	–	–
Piplartine + 5-FU	50 + 10	4.32 \pm 0.22	0.33 \pm 0.08	1.14 \pm 0.04	–	–
Piperine	50	4.73 \pm 0.22	0.20 \pm 0.02	1.13 \pm 0.03	–	–
Piperine + 5-FU	50 + 10	4.72 \pm 0.61	0.21 \pm 0.03	1.19 \pm 0.12	–	–
Mice transplanted with S180						
Saline	–	5.22 \pm 0.09	0.56 \pm 0.03	1.32 \pm 0.05	2.74 \pm 0.15	–
10% DMSO	–	5.05 \pm 0.12	0.62 \pm 0.08	1.15 \pm 0.09	1.90 \pm 0.12	–
5-FU	10	4.26 \pm 0.52	0.40 \pm 0.10 ^a	1.06 \pm 0.03	0.99 \pm 0.10 ^a	47.71
Piplartine	50	4.58 \pm 0.26	0.63 \pm 0.05	1.04 \pm 0.05	1.43 \pm 0.12 ^{a,c}	24.61
Piplartine + 5-FU	50 + 10	5.07 \pm 0.87	0.62 \pm 0.24	1.19 \pm 0.10	0.61 \pm 0.10 ^{a,b,c}	68.04
Piperine	50	4.40 \pm 0.24	0.48 \pm 0.06	1.02 \pm 0.04	1.04 \pm 0.15 ^a	45.00
Piperine + 5-FU	50 + 10	4.70 \pm 0.49	0.37 \pm 0.14 ^a	1.11 \pm 0.15	0.99 \pm 0.11 ^a	47.95

Data are presented as mean \pm SEM of ten animals.

^a $P < 0.05$ compared with 10% DMSO experimental group by ANOVA followed by Newman-Keuls.

^b $P < 0.05$ compared with piplartine experimental group by ANOVA followed by Newman-Keuls.

^c $P < 0.05$ compared with 5-FU experimental group by ANOVA followed by Newman-Keuls.

Table 3. Effect of 5-FU combined with piplartine or piperine on the biochemical parameters in peripheral blood from mice transplanted with sarcoma 180 tumor or healthy mice

Drug	Dose (mg kg ⁻¹)	AST (UI l ⁻¹)	ALT (UI l ⁻¹)	Urea (mg dl ⁻¹)
Healthy mice				
0.9% NaCl	–	82.3 ± 11.5	52.1 ± 9.3	34.1 ± 6.2
10% DMSO	–	108.0 ± 4.6	47.9 ± 12.7	29.8 ± 8.5
5-FU	10	115.9 ± 10.5	45.8 ± 11.3	29.2 ± 9.3
Piplartine	50	112.9 ± 9.3	41.8 ± 7.4	40.4 ± 5.2
Piplartine + 5-FU	50 + 10	99.0 ± 12.9	58.9 ± 9.2	37.5 ± 3.2
Piperine	50	106.4 ± 12.3	37.8 ± 6.9	36.8 ± 6.2
Piperine + 5-FU	50 + 10	108.0 ± 15.9	58.3 ± 9.4	31.9 ± 3.9
Mice transplanted with S180				
0.9% NaCl	–	113.9 ± 9.7	45.2 ± 15.9	28.5 ± 6.1
10% DMSO	–	106.4 ± 9.6	50.8 ± 10.7	31.6 ± 9.1
5-FU	10	119.6 ± 14.1	35.9 ± 14.3	27.5 ± 5.3
Piplartine	50	112.9 ± 9.3	41.8 ± 7.4	40.4 ± 5.2
Piplartine + 5-FU	50 + 10	99.0 ± 12.9	58.9 ± 9.2	37.5 ± 3.2
Piperine	50	106.4 ± 12.3	37.8 ± 6.9	36.8 ± 6.2
Piperine + 5-FU	50 + 10	108.0 ± 15.9	58.3 ± 9.4	31.9 ± 3.9

Data are presented as mean ± SEM of five animals.

($P < 0.05$) in the total number of circulating peripheral leukocytes compared with normal animals. Moreover, there was a significant difference ($P < 0.05$) in lymphocyte and neutrophil percentages in the peripheral blood of animals transplanted with sarcoma 180 tumor when compared with the normal group treated with saline (Table 4). When the normal animals or those transplanted with sarcoma 180 were treated with 5-FU, a marked reduction in leukocytes was seen in both groups. Furthermore, piplartine and piperine in combination with 5-FU, not only induced an increase in the number of total leukocytes, but also normalized the leukocyte proportions. In addition, piplartine and piperine alone were also able to normalize lymphocyte and neutrophil percentages in peripheral blood of sarcoma 180 inoculated animals. No significant changes in hematological parameters were seen in any animals treated with piplartine or piperine alone in healthy mice.

The organs removed from the treated animals were weighed. No significant changes in organ weights were seen in any animals treated with piplartine alone or in combination with 5-FU or piperine alone (Table 2). However, after treatment with 5-FU combined with piperine or 5-FU alone, the spleen weights were significantly reduced when compared with the control group ($P < 0.05$), but only in mice transplanted with sarcoma 180. No significant changes in the body weights were seen in any groups ($P > 0.05$) (data not shown).

Histopathological analyses of the kidneys from treated animals showed a discrete hydropic change in the proximal tubular epithelium and glomerular and tubular hemorrhage, but the glomerular structure was essentially preserved. Besides the toxic effects observed in the kidney, the liver histopathological analyses indicated that it was also a target organ for alkaloid amide toxicity. The

effects observed in the liver of 5-FU + piperine treated animals were more marked than in other groups. These effects included Kupffer cell hyperplasia, portal tracts and centrilobular venous congestion, focal infiltrate of chronic inflammatory cells, intense ballooning degeneration of hepatocytes, and sinusoidal hemorrhage. However, only with 5-FU combined with piperine were areas of microvesicular steatosis observed.

In addition, spleen histopathology in piplartine treated animals indicated marked white pulps, megakaryocytes throughout and visualization of lymphoid follicles. There was no significant change in the spleen in the other experimental groups when compared with the control group.

Discussion

In clinical cancer chemotherapy, anticancer drugs are often used in combination. The discovery of useful combination chemotherapy is expected to increase the response rate and the frequency of long-term survival (Morinaga *et al.*, 2003). In treatment with piplartine or piperine, it will be important to determine the effect of these amides on the antitumor activity and toxicological effects related to 5-FU treatment.

It has been reported that piplartine and piperine show *in vitro* and *in vivo* antitumor activity (Duh *et al.*, 1990; Duh and Wu, 1990; Sunila and Kuttan, 2004; Bezerra *et al.*, 2005, 2006, 2007). The present study investigated the *in vitro* and *in vivo* effect of piplartine or piperine in combination with 5-FU on antitumor activity using experimental models. The chemotherapeutic agent 5-FU was used as it is highly cited in other works facilitating comparison of the data. In addition, some parameters

Table 4. Effect of 5-FU combined with piplartine or piperine on the hematological parameter in peripheral blood from mice transplanted with sarcoma 180 tumor or healthy mice

Drug	Dose (mg kg ⁻¹)	Hemoglobin (g dl ⁻¹)	Platelet (10 ⁷ /cells µl ⁻¹)	Total leukocytes (10 ³ /cells µl ⁻¹)	Differential count of leukocytes (%)			
					Eosinophil	Lymphocyte	Neutrophil	Monocyte
Healthy mice								
Saline	–	14.15 ± 0.41	8.91 ± 0.47	5.66 ± 0.52	0.98	77.52	16.2	5.3
10% DMSO	–	13.25 ± 0.53	7.42 ± 0.59	4.25 ± 0.43	0.8	69.62	23.0	7.0
5-FU	10	12.49 ± 0.53	8.02 ± 0.39	3.04 ± 0.23 ^a	1.3	55.4 ^a	40.0 ^a	3.3
Piplartine	50	14.34 ± 0.83	6.98 ± 0.45	6.69 ± 0.44	1.3	78.5	12.9	7.3
5-FU + Piplartine	50 + 10	13.59 ± 0.21	7.42 ± 0.59	5.73 ± 0.77 ^c	0.79	65.9	26.9	6.4
Piperine	50	11.98 ± 0.73	8.62 ± 0.29	5.69 ± 0.66	1.6	70.4	18.7	9.3
5-FU + Piperine	50 + 10	12.69 ± 0.47	6.35 ± 0.49	4.98 ± 0.38 ^c	1.7	67.4	25.6	5.3
Mice transplanted with S180								
Saline	–	13.02 ± 0.32	7.1 ± 0.65	8.18 ± 0.53 ^a	1.0	56.8 ^a	39.5 ^a	2.7
10% DMSO	–	12.04 ± 0.53	8.6 ± 0.53	7.95 ± 0.78 ^a	1.0	53.9 ^a	42.3 ^a	2.8
5-FU	10	12.42 ± 0.49	9.2 ± 0.62	3.32 ± 0.42 ^{ab}	1.6	52.3 ^a	42.9 ^a	3.2
Piplartine	50	14.58 ± 0.72	9.5 ± 1.20	9.65 ± 1.05 ^a	0.9	69.2	26.4	3.5
5-FU + Piplartine	50 + 10	12.45 ± 0.69	9.4 ± 0.78	6.19 ± 0.98 ^{bc}	1.9	72.6 ^b	21.0 ^b	4.5
Piperine	50	13.48 ± 0.52	9.3 ± 1.43	6.74 ± 0.79 ^a	0.9	65.9	27.2	6.0
5-FU + Piperine	50 + 10	12.35 ± 0.49	8.4 ± 1.02	5.79 ± 0.43 ^{bc}	1.1	69.0 ^b	24.5 ^b	5.4

Data are presented as mean ± SEM of five animals.

^{a,b} $P < 0.05$ compared with saline in healthy mice and mice transplanted with sarcoma 180, respectively.^c $P < 0.05$ compared with 5-FU experimental group; ANOVA followed by Bonferroni.

were analysed in order to evaluate the toxicological aspects of drug treatment. The *in vivo* antitumor activity for piperine and piplartine was previously demonstrated (Sunila and Kuttan, 2004; Bezerra *et al.*, 2006). In order to explore the inhibitory effects of combination treatments in different tumor cells, the cell lines HL-60, MDA-MB435, SF295 and HCT-8 were tested with 5-FU in the absence and presence of piplartine (5 µM) or piperine (50 µM). The results showed that the incubation of tumor cell lines with 5-FU in the presence of piplartine or piperine produced an increase in growth inhibition, as observed by lower IC₅₀ values. Piplartine produced stronger effects in all cell lines tested. Piperine, in contrast, only increased 5-FU cytotoxicity in HL-60 and MDA-MB435 cells, respectively.

In previous work, the direct cytotoxicity of these amides was assessed on the brine shrimp lethality assay, sea urchin egg development, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay using tumor cell lines and lytic activity on mouse erythrocytes (Bezerra *et al.*, 2005). The results obtained demonstrated that both compounds displayed significant cytotoxic effects, piplartine being more strongly active than piperine when considering tumor cells and sea urchin eggs, which could justify the higher efficacy of piplartine in the increase of 5-FU cytotoxicity, even at a concentration 10 times lower than piperine.

The combination of piplartine, but not piperine, with 5-FU also increased the *in vivo* antitumor activity against sarcoma 180 tumor in mice. These data suggest that piplartine has different mechanisms from piperine, which result in a stronger antitumor activity in combination with 5-FU both *in vitro* and *in vivo*. Despite stronger *in vitro* cytotoxic effects observed with piplartine treatment compared with piperine, both amides showed similar antitumor activity *in vivo* using the sarcoma 180 model (Bezerra *et al.*, 2006).

According to some authors, the antitumor activity of piperine is related to its immunomodulatory properties, which involves the activation of cellular and humoral immune responses (Sunila and Kuttan, 2004). In fact, piperine possesses only weak cytotoxic activity (Pradeep and Kuttan, 2002; Sunila and Kuttan, 2004; Bezerra *et al.*, 2005), which indicates that its antitumor activity is not related to direct antiproliferative effects on tumor cells. In a previous study, it was shown that piperine did not change the rate of sarcoma 180 cell proliferation, as observed by the number of Ki67 positive cells (Bezerra *et al.*, 2006), which reinforces the fact that piperine activity is not related to a reduction in the tumor proliferation rate. However, its immunomodulatory activity still remains controversial, since Dogra *et al.* (2004) demonstrated that piperine at a dose of 4.5 mg kg⁻¹ had a consistent immunosuppressive effect, suppressing the weight and cell population of spleens in treated animals. In addition, in a previous work, a reduction of spleen weight

was observed in piperine-treated animals, but only at 100 mg kg⁻¹ (Bezerra *et al.*, 2006).

Piplartine, on the other hand, could be considered a strong cytotoxic alkaloid. These findings suggest that the presence of two α,β -unsaturated carbonyl moieties is an important structural requirement for cytotoxic activity (Duh *et al.*, 1990; Duh and Wu, 1990; Bezerra *et al.*, 2005).

The liver is the detoxification organ of mammals and the kidney the most important excretory organ, and both are susceptible to cancer drugs. Hepatic dysfunction induced by mithramycin and renal toxicity induced by docetaxel are such examples (Katzung, 2003). In the present study, it was shown that amide treatment alone or in combination with 5-FU did not change the enzymatic activity of transaminases.

However, histopathological analyses suggested that the liver is the main organ affected by 5-FU plus piperine treatment. Ballooning degeneration of hepatocytes accompanied by microvesicular steatosis in some areas was observed in the group treated with piperine in combination with 5-FU, suggesting intrinsic hepatotoxicity. However, regeneration of hepatic tissues occurs in many diseases, except in the most deleterious. This occurs even when hepatocellular necrosis is present, but the conjunctive tissue is preserved and regeneration is almost complete (Scheuer and Lefkowitz, 2000; Kumar *et al.*, 2004). Thus, the hepatic alterations observed after treatment with 5-FU combined with piperine could be considered reversible (Scheuer and Lefkowitz, 2000; Kumar *et al.*, 2004; McGee *et al.*, 1992).

Renal parameters were also evaluated in the present investigation. The histopathological analysis suggested that the kidney is also a toxicological target for these amides. This result corroborated a previous study that showed a reversible renal toxicity induced by piplartine (Bezerra *et al.*, 2006). However, blood urea was not raised after amide treatment alone or when combined with 5-FU. The kidney eliminates waste products of metabolism from the body. In renal failure, therefore, other waste products accumulate, particularly nitrogenous substances such as non-protein nitrogen, urea and uric acid. It has been reported that the non-protein nitrogen level is elevated in those conditions when blood urea is also increased (Varley *et al.*, 1980). On the other hand, blood urea is increased only after a long time after the renal alteration, which may explain why the amide treatment did not induce any blood urea alteration.

Apart from hepatotoxic and nephrotoxic effects, anti-cancer drugs also produce delayed hematopoietic depression, as observed in treatment with methotrexate and 5-FU (Katzung, 2003). In fact, most chemotherapeutic drugs, including 5-FU, are immunosuppressive because they kill many normal cells as well as tumor cells (Takiguchi *et al.*, 2001) and have negative side effects. One of the risks of radiation and chemotherapy in the

treatment of cancer patients is the development of leukopenia, which substantially increases the risk of infections. Leukopenia was observed with sole 5-FU treatment, which was prevented by the association with piplartine, but not piperine, indicating a protective effect of piplartine against delayed hematopoietic depression induced by 5-FU. The combination of piplartine and 5-FU did not lead to substantial changes in biochemical, hematological and histopathological parameters. It is possible that this combination augments the antitumor activity without augmenting side effects, and, moreover, it could even attenuate 5-FU toxicity. Moreover, colony-stimulating factor (CSF) produced by tumor cells in sarcoma 180, increases the number of circulating peripheral polymorphonuclear cells (PMN) (Okawa *et al.*, 1992). The results demonstrated that sarcoma 180 tumor significantly modifies these leukocyte parameters. Piplartine and piperine not only appear to contain the tumor, but also normalize the leukocyte proportions, compensating the effects of the disease.

In addition, the spleen weights of animals treated with 5-FU was significantly lower than in the control group, which also indicated an immunosuppressive side effect of 5-FU. Nevertheless, when the mice transplanted with tumor sarcoma 180 were treated with combined 5-FU and piplartine, but not 5-FU and piperine, their spleen weights were not decreased when compared with the control group.

Finally, the combination of 5-FU with piplartine did not severely change the biochemical, hematological or histopathological parameters examined. These findings suggest that piplartine not only possesses *in vitro* and *in vivo* antitumor effects, but can also increase the antitumor activity of chemotherapeutic drugs. It is possible that this combination augments the antitumor activity of 5-FU and also decreases side effects.

Acknowledgements—We wish to thank CNPq, Instituto Claude Bernard, FUNCAP, Banco do Nordeste and FINEP for the financial support in the form of grants and fellowship awards. We thank Silvana França dos Santos, Luciana França and Maria de Fátima Teixeira for technical assistance. Dr A. Leyva provided English language editing of the manuscript.

References

- Annu K, Neelima T, Usha Z, Bedi KL. 1998. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. *Mol. Cell Biochem.* **189**: 113–118.
- Atal CK, Dhar KL, Singh J. 1975. The chemistry of Indian *Piper* species. *Lloydia* **38**: 256–264.
- Bezerra DP, Castro FO, Alves APNN, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MAS, Elmiro FJM, Costa-Lotufo LV. 2006. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **39**: 801–807.
- Bezerra DP, Militão GCG, Castro FO, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MAS, Elmiro FJM, Costa-Lotufo LV. 2007. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicol. in Vitro* **21**: 1–8.

- Bezerra DP, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MAS, Elmiro FJM, Costa-Lotuf LV. 2005. Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from *Piper* species. *Z. Naturforsch.* **60**: 539–543.
- Braz-Filho R, Souza MP, Mattos MEO. 1981. Piplartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **20**: 345–346.
- Cragg MG, Newman J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* **100**: 72–79.
- Dogra RKS, Khanna S, Shanker R. 2004. Immunotoxicological effects of piperine in mice. *Toxicology* **196**: 229–236.
- Duh CY, Wu YC. 1990. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. *J. Nat. Prod.* **53**: 1575–1577.
- Duh CY, Wu YC, Wang SK. 1990. Cytotoxic pyridone alkaloids from *Piper aborescens*. *Phytochemistry* **29**: 2689–2691.
- Katzung GB. 2003. *Basic and Clinical Pharmacology*, 9th edn. McGraw-Hill Medical: USA, 1088.
- Kumar V, Abbas A, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. 2004. *Pathology Basis of Disease*, 7th edn. WB Saunders: China, 1552.
- Lampe JW. 2003. Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 579S–583S.
- McGee JOD, Isaacson PA, Wright NA. 1992. *Oxford Textbook of Pathology: Pathology of Systems*. Oxford University Press: New York; 1708.
- Morinaga Y, Suga Y, Ehara S, Harada K, Nihei Y, Suzuki M. 2003. Combination effect of AC-7700, a novel combretastatin A-4 derivative, and cisplatin against murine and human tumors *in vivo*. *Cancer Sci.* **94**: 200–204.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **16**: 55–63.
- Okawa Y, Murata Y, Kobayashi M, Suzuki ME, Suzuki S. 1992. Argumentation of host resistance to *Candida albicans* infection in ascite tumor-bearing mice. *Microbiol. Immunol.* **36**: 517–521.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OM, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* **46**: 597–673.
- Pradeep CR, Kuttan G. 2002. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. *Clin. Exp. Metastasis* **19**: 703–708.
- Reen RK, Singh J. 1991. *In vitro* and *in vivo* inhibition of pulmonary cytochrome P450 activities by piperine. *J. Exp. Biol.* **29**: 568–573.
- Scheuer PJ, Lefkowitz JH. 2000. Drugs and toxins. In *Liver Biopsy Interpretation*, 6th edn, Scheuer PJ, Lefkowitz JH (eds). WB Saunders: London; 134–150.
- Silva RV, Navickiene HMD, Kato MJ, Bolzani VS, Méda CI, Young MCM, Furlan M. 2002. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **59**: 521–527.
- Sunila ES, Kuttan G. 2004. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *J. Ethnopharmacol.* **90**: 339–346.
- Takiguchi N, Saito N, Nunomura M, Kouda K, Oda K, Furuyama N, Nakajima N. 2001. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **47**: 11–14.
- Tsai IL, Lee FP, Wu CC, Duh CY, Ishikawa T, Chen JJ, Chen YC, Seki H, Chen IS. 2005. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. *Planta Med.* **71**: 535–542.
- Varley H, Gowenlock AM, Bell M. 1980. In *Practical Clinical Biochemistry*, Vol 1, 5th edn. William Heinmann Medical Books: London; 452.

Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells

Daniel Pereira Bezerra^{a,1}, Dinara Jaqueline Moura^{b,1}, Renato Moreira Rosa^b,
Marne Carvalho de Vasconcellos^a, Ana Catarina Romano e Silva^b,
Manoel Odorico de Moraes^a, Edilberto Rocha Silveira^c, Mary Anne Sousa Lima^c,
João Antonio Pegas Henriques^{b,d}, Leticia Veras Costa-Lotuf^a, Jenifer Saffi^{b,d,*}

^a Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil

Received 17 November 2007; received in revised form 31 January 2008; accepted 4 February 2008

Available online 12 February 2008

Abstract

The genus *Piper* belongs to the Piperaceae family, and includes species of commercial and medicinal importance. Chemical studies on *Piper* species resulted in the isolation of several biologically active molecules, including alkaloid amides, such as piplartine. This molecule, isolated from *Piper tuberculatum*, has significant cytotoxic activity against tumor cell lines, and presents antifungal, anti-platelet aggregation, anxiolytic, and antidepressant effects. In order to understand the biological properties of piplartine, this study investigated the genotoxicity and the induction of apoptosis by piplartine in V79 cells and its mutagenic and recombinogenic potential in *Saccharomyces cerevisiae*. Piplartine induced dose-dependent cytotoxicity in *S. cerevisiae* cultures in either stationary—or exponential growth phase. In addition, piplartine was not mutagenic when cells were treated during exponential-growth phase and kept in buffer solution, but it increased the frequencies of point, frameshift, and forward mutations when cells were treated in medium during growth. Piplartine treatment induced DNA strand breaks in V79 cells, as detected by neutral and alkaline comet assay. In cell cycle analysis, piplartine induced G2/M cell cycle arrest, probably as a consequence of the DNA damage induced and repair. Moreover, piplartine treatment induced apoptosis in a dose-dependent manner, as observed by a decrease in mitochondrial membrane potential and an increase in internucleosomal DNA fragmentation. These data suggest that the DNA damage caused by piplartine induces G2/M cell cycle arrest, followed by apoptosis. Moreover, we suggest that cells surviving piplartine-induced DNA damage can accumulate mutations, since this alkaloid was mutagenic and recombinogenic in *S. cerevisiae* assays.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Piplartine; Genotoxicity; Mutagenesis; Recombinogenesis; Apoptosis

1. Introduction

Focus on plant research has recently increased all over the world, and a large body of evidence has been collected to show the immense potential of medicinal plants used in traditional medicine. Several medicinal plants have been identified

and studied using modern scientific approaches, revealing their potential use in pharmacology [1,2].

The genus *Piper* belongs to the Piperaceae family and includes more than 1000 species widely distributed throughout the tropical and subtropical regions of the world. Members of the *Piper* genus are of commercial, economical and medicinal importance. Economically, the plants of this family are employed in the production of pepper in worldwide spice markets [3]. *Piper* species also are important medicinal plants used in Chinese medicine, in the Indian ayurvedic system and in folk medicine practices of Latin America and West Indies. They are applied to treat asthma, bronchitis, fever,

* Corresponding author at: Laboratório de Genética Toxicológica, Avenida Farroupilha 8001, Prédio 01 Sala 122; Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas, RS, Brazil. Tel.: +55 51 34774000x2774; fax: +55 51 34779214.

E-mail address: jenifer.saffi@ulbra.br (J. Saffi).

¹ These authors contributed equally to this work.

hemorrhoidal afflictions, gastrointestinal diseases, and rheumatism, and the preparations obtained from these plants have shown anti-inflammatory, insecticidal, anti-hypertensive, anti-diabetics, immunomodulatory and antimutagenic effects [3–6].

Chemical studies on *Piper* species resulted in the isolation of several biologically active natural products, such as pyrones, lignanes, neolignanes, terpenes, propenylphenols, chalcones, flavones, benzopyranes, chromenes, lactones, and amides [3]. The amide alkaloids, known as alkamydes, are characteristic metabolites of this family, and are classified as isobutyl, pirolydine, pirydonil, and piperidines with various biological effects [7–9]. Indeed, the pharmacology of these alkaloids revealed interesting molecules with hormone-modulating [10], anticancer [11–15], anti-hypertensive [16], antioxidant [9,17], anti-lipidemic [18], enzyme-inhibiting [19], anxiolytic and antidepressant [8], as well as anti-inflammatory effects [20,21]. However, it was shown that some alkaloids potentiate benzo(a)pyrene-induced DNA damage [22], have neurotoxic properties [23], and generate oxidative stress by changing thiol cellular status [24].

Piplartine (5,6-dihydro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propenyl]-2(1H)pyridinone) (Fig. 1) is an amide alkaloid component of *Piper* species. This secondary metabolite has significant cytotoxic activity against tumor cell lines, especially human leukemia cell lines, such as HL-60, K562, Jurkat, and Molt-4, as well as antifungal, anti-platelet aggregation, anxiolytic and antidepressant properties [8,25–27].

In order to further understand the biological properties of piplartine, this study aimed at investigating the genotoxic potential and the induction of apoptosis in cultured mammalian cells by this molecule, employing a permanent cell line derived from Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cell line), as well as its mutagenic and recombinogenic potential in the simple eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. This information is very important for the evaluation of the safety of this compound for possible future pharmacological applications, and to explore the possible mechanisms underlying its antiproliferative effects.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Yeast extract, yeast nitrogen base, bacto-peptone, and bacto-agar were obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). Dulbecco's modified

Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, L-glutamine, and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Acridine orange (AO), ethidium bromide (EB), rhodamine 123, propidium iodide, methyl methanesulphonate (MMS), 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO), amino acids (L-histidine, L-threonine, L-methionine, L-tryptophan, L-leucine, L-lysine) and nitrogen bases (adenine and uracil) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Low-melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Canavanine and cycloheximide were purchased from Calbiochem (CA, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Piplartine isolation and identification

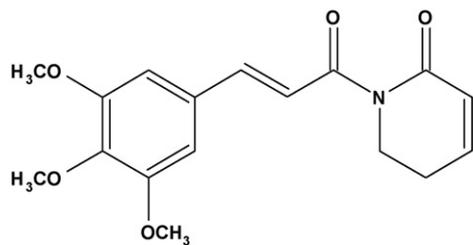
The roots of *Piper tuberculatum* were harvested in September, 2004, from a wild population in the Pici Campus of Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. A voucher specimen (# 34736) was deposited at Prisco Bezerra herbarium (EAC), Biology Department, Universidade Federal do Ceará. A total weight of 420.0 g of ground roots of *P. tuberculatum* were macerated with a mixture of petroleum ether/ethyl acetate 1:1 (1.5 L) for 24 h (3×). The solvent mixture was evaporated under reduced pressure to yield a yellowish solid (13.24 g), which gave the first crop of piplartine (4.35 g, Fig. 1) after crystallization with hot methanol. Piplartine was characterized by 1D and 2D NMR (nuclear magnetic resonance) analyses and melting point determination [28].

2.3. Strains and media for yeast assays

The relevant genotypes of *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. Media, solutions and buffers were prepared as previously described [29]. The complete medium (YPD), containing 0.5% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose was used for routine growth. Minimal medium (MM) contained 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose and 2% bacto-agar. The synthetic complete medium (SC) consisted of MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracil, and 2 mg tryptophan per 100 mL MM. For plates, the medium was solidified with 2% bacto-agar. For determination of forward mutagenesis in strain N123, plates lacking arginine were supplemented with 60 µg/mL canavanine (SC+can). For mutagenesis in strain XV185-14c, the omission media, lacking lysine (SC-lys), histidine (C-his) or homoserine (SC-hom), were supplemented with 0.1 mg lysine, histidine, or methionine, respectively, per 100 mL omission medium. For recombinogenesis, leucine was omitted from the synthetic medium (SC-leu), or supplemented with 200 µg cycloheximide (SC-cyh) per 100 mL SC.

2.4. Yeast growth

Stationary-phase cultures were obtained by inoculating an isolated colony into liquid YPD medium, and incubation at 30 °C for 48 h with aeration by shaking. Cultures were grown to $1-2 \times 10^8$ cell/mL. Exponential phase cultures ($1-2 \times 10^7$ cell/mL) were obtained by inoculating 5×10^5 cells/mL of the stationary-phase YPD culture in fresh YPD medium at 30 °C for 3–4 h. Cells were harvested and washed twice with saline solution (%). Cell concentration and percentage of budding cells in each culture were determined in a Neubauer chamber by microscope counts.



Piplartine

Fig. 1. Chemical structure of piplartine {5,6-dihydro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propenyl]-2(1H)-pyridinone}.

Table 1
Saccharomyces cerevisiae strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
XV185-14c	<i>Matα ade2-2 arg 4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10</i>	R.C. Von Borstel
N123	<i>MATα his1-7</i>	J.A.P. Henriques
XS2316	<i>MATα ADE6/lade6 leu1-1/leu1-12 trp5-48/TRP5; CYH2/cyh2 MET13/met13 LYS5/lys5-1 his1-1/his1-1</i>	I. Machida; S. Nakaia

2.5. Survival assays

The relative sensitivity of *S. cerevisiae* strain XV185-14c to piplartine was assayed by suspending 2×10^8 cells/mL of stationary- or exponential-phase cultures in 1 mL phosphate-buffered saline solution (PBS; Na_2HPO_4 , and NaH_2PO_4 ; 20 mM; pH 7.4), containing different piplartine concentrations, and incubation with aeration by rotary shaking at 30 °C for 3 h. In order to determine colony-forming ability, suitable aliquots were plated on YPD. Plates were incubated at 30 °C for 3–5 days before the surviving colonies were counted. Assays were repeated at least three times, and plating was carried out in triplicate for each dose.

2.6. Detection of piplartine-induced reverse, frameshift, and forward mutation in yeast

XV-185-14c and N123 haploid strains were used to test piplartine mutagenicity. A suspension of 2×10^8 cells/mL of stationary or exponential phase was incubated with different piplartine concentrations in PBS at 30 °C for 3 h. To test the relative piplartine sensitivities during growth 5×10^6 cells/mL from an exponential growing was treated in YPD medium with aeration by rotary shaking at 30 °C for 3 h. Survival was determined in SC (2–3 days, 30 °C), and mutation induction (HIS, LYS, HOM revertants, or CAN mutants) in appropriate supplementation media (4–5 days, 30 °C). While *his1-7* is a non-suppressible missense allele, and reversions result from mutations at the locus itself [30], *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele, which can be reverted either by locus-specific or forward mutation in a suppressor gene [31,32]. True reversions and forward (suppressor) mutations at *lys1-1* locus was differentiated according to [33], with reduced adenine content of SC-Lys medium showing true reversions as red colonies, and suppressor mutations as white colonies [34]. The *hom3-10* mutant allele of XV185-14c haploid strain was used to detect putative frameshift mutagenesis. It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to its response to several diagnostic mutagens [32]. Forward mutation was measured by canavanine resistance assay (*CAN1* → *can1*). Wild-type yeast strains express arginine transporter, which also internalize canavanine, a toxic analogue of arginine, leading to cell death. Changes in *CAN1* gene that impair Can1p function may increase cell survival in the presence of canavanine. Assays were repeated at least three times, and plating was performed in triplicate for each dose.

2.7. Detection of induced mitotic recombination in yeast

Suspensions of cells in exponential growth phase (2×10^7 cells/ml) were incubated in PBS at 30 °C for 3 h with different piplartine concentrations. When testing piplartine during growth phase, 5×10^6 cells/ml were treated in YPD as described in Section 2.6. After treatments, cells were diluted in saline solution, plated on three different media (SC, SC-leu, and SC + cyh), and incubated at 30 °C for 3–10 days. Colonies grown on SC medium yielded cell survival data, and colonies grown on SC-leu and SC+cyh were scored for intragenic recombination (gene conversion) and intergenic recombination (crossing-over), respectively.

In order to measure the exact frequency of reciprocal crossing-over, it was necessary to eliminate the possibility that some cycloheximide-resistant colonies had resulted from reversion at the *CYH2* locus, as well as from chromosome VII monosomy. For this purpose, cycloheximide-resistant colonies were replica-plated on a series of plates with SC-lys, SC-met, and SC-ade media in order to screen *cyh2* markers. Assays were repeated at least three times, and plates were performed in triplicate for each dose.

2.8. V79 cell culture and treatment

Chinese hamster lung fibroblast cells (V79 cells) were cultured under standard conditions in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated-FBS, 0.2 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were kept in tissue-culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere, containing 5% CO_2 in air, and were harvested by treatment with 0.15% trypsin–0.08% EDTA in phosphate-buffered saline solution (PBS).

2.9. Cytotoxicity evaluation by colony-forming ability (clonal survival)

Exponentially growing V79 cells were treated according to the experimental protocol, after which they were trypsinized, and 500 cells/60 mm dish were seeded in triplicate in order to determine their colony-forming ability. An aliquot of piplartine stock solution was thawed, diluted, and used for the treatment of attached cells (3 h). After 5–10 days incubation, colonies were fixed with methanol and acetic acid (3:1), stained with crystal violet (1%), counted, and their survival was calculated as a percentage relative to the control treatment.

2.10. Comet assay

Alkaline Comet assay was performed as described by Singh et al. [20,35], with minor changes. Cells were seeded (3×10^6 cells) in 5 mL complete medium in a 25-cm² flask, and grown for 1 day up to 60–70% confluence before treatment with the test substance. Piplartine added to FBS-free medium to obtain the different concentrations proposed, and the cells were treated at 37 °C for 3 h in humidified atmosphere, containing 5% CO_2 . At the end of the treatment, cells were washed with ice-cold PBS, and trypsinized with 100 µL trypsin (0.15%). Immediately thereafter, 20 µL of cell suspension ($\sim 10^6$ cells/mL) were dissolved in 0.75% low melting point agarose [36], and spread on regular pre-coated agarose-point (1%) microscope slides. Cells were ice-cold lysed (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, and 10 mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% DMSO) at 4 °C for at least 1 h in order to remove cellular proteins and membranes, with DNA remaining as “nucleoids”. Slides were then placed in a horizontal electrophoresis box, containing freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH ~ 13.0) at 4 °C for 20 min in order to allow DNA unwinding. A 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) electric current was applied for 20 min to perform DNA electrophoresis. The assay at pH 8.5 was carried out following essentially the same procedure as the alkaline version except for the pH value. In the neutral version, electrophoresis was run in buffer consisting of 100 mM Tris and 300 mM sodium acetate at pH 8.5 [37]. Electrophoresis was conducted for 60 min, after a 60 min equilibrium period in neutral electrophoresis buffer, at 12 mA and 14 V (0.5 V/cm). All the above steps were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver nitrate as described by Nadin et al. [38], and analyzed using an optic microscope. One hundred cells (50 cells from each of two replicate slides of each organ or tissue) were selected, and analyzed for DNA migration. When selecting cells, edges and cells around air bubbles were disconsidered [39]. Cells were visually scored according to tail length into five classes: (1) class 0: undamaged, with no tail; (2) class 1: with tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with tail as long as 1–2× the diameter of the head; (4) class 3: with tail longer than 2× the diameter of the head; and (5) class 4: comets with no heads. International guidelines and recommendations for the comet assay visual scoring of comets consider as a valid evaluation method [35,39,40]. A value (damage index) was assigned to each comet according to its class. Damage index (DI) is an arbitrary score calculated for cells in different damage classes, which are visually scored by measuring DNA migration length and the amount of DNA in the tail. Damage frequency (DF) is the proportion of cells presenting tails after electrophoresis, and this was also considered in our analyses. DI ranges from 0 (no tail: 100 cells × 0) to 400 (with maximum migration: 100 cells × 4) [35,39]. Damage frequency (%) was calculated based on number of cells with tails as compared with those with no tail. Results are expressed as mean and standard deviation of three independent experiments.

2.11. Flow cytometry and morphological analyses of treated V79 cells

V79 cells (2×10^5 cells/mL) were seeded on 6-well tissue culture plates, and grown for 1 day before treatment with the tested substances. Piplartine was added at the concentrations of 5 and 10 µg/mL. The negative control was treated with DMSO and with doxorubicin (1.0 µg/mL) as positive control. Cells were incubated at 37 °C for 3 h in humidified atmosphere containing 5% CO_2 , after which the following analyses were performed.

2.12. Cell cycle distribution and internucleosomal DNA fragmentation analysis

Cell cycle distribution determination and internucleosomal DNA fragmentation analysis followed the procedure described by [41]. Briefly, V79 cells were incubated at 37 °C for 3 h in the dark, in a lysis solution containing 0.1% citrate, 0.1% triton X-100, and 50 (g/mL propidium iodide. Cell fluorescence was determined by flow cytometry in a Guava® EasyCyte™ Mini System cytometer (Guava Technologies Inc. Industrial Blvd. Hayward, CA, USA), using the CytoSoft 4.1 software. Five thousand events were evaluated per experiment, and cellular debris was omitted from the analysis.

2.13. Measurement of mitochondrial transmembrane potential

Mitochondrial transmembrane potential was determined by rhodamine 123 dye retention using flow cytometry, as previously described. Cells were washed with PBS, incubated with rhodamine 123 (5 µg/mL) at 37 °C for 15 min in the dark and washed twice. Cells were incubated again in PBS at 37 °C for 30 min in the dark, and fluorescence was measured. Five thousand events were evaluated per experiment, and cellular debris was omitted from the analysis.

2.14. Morphological analysis with hematoxylin–eosin staining

Morphological changes of untreated or piplartine-treated V79 cells were examined under light microscopy. In order to evaluate nuclear morphology, cultured cells were harvested, transferred to cytospin slides, fixed with methanol for 30 s and stained with hematoxylin–eosin [26].

2.15. Morphological analysis with fluorescence microscope

After incubation, treated and untreated V79 cells were harvested and re-suspended in 25 µL PBS. Then, 1 µL acridine orange/ethidium bromide (AO/EB, 100 µg/mL) aqueous solution was added, and cells types were observed under fluorescence microscope. Three hundred cells were counted per sample and were classified as viable cells, apoptotic cells, or necrotic cells [26].

2.16. Statistical analysis

All experiments were independently repeated at least three times, with triplicate samples for each treatment. Results are expressed as mean ± S.D. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and means compared using the test of Tukey test, with $P < 0.05$ considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Cytotoxic and mutagenic effects in yeast

Piplartine induced dose-dependent cytotoxic effects both in stationary and exponential phase cultures of the haploid yeast *S. cerevisiae*. However, this effect was more pronounced in exponentially growing cells (Fig. 2). Therefore, we chose sub-cytotoxic concentrations of this alkaloid (ranging from 10 to 100 µg/ml) in the experiments carried out to verify its mutagenic effect on the studied strains of *S. cerevisiae*. Piplartine did not induce mutagenic effects on *S. cerevisiae* N123 and XV185-14c strains in stationary phase (data not shown). When cells were treated in exponential phase, mutant frequencies of piplartine for the *his1* locus were significant only at higher concentrations, while the mutant frequencies for *lys1*, *hom3* loci and forward mutation were not significant in the same doses

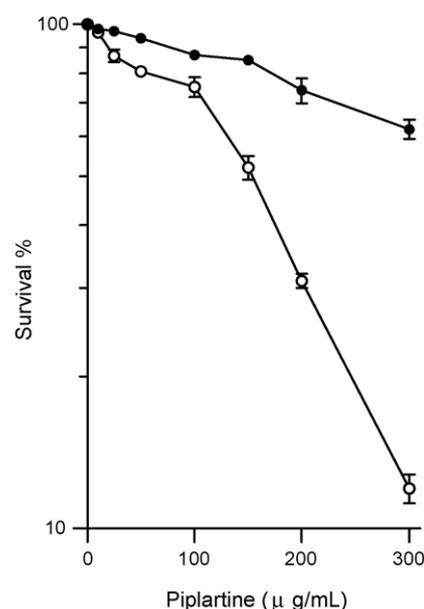


Fig. 2. Sensitivity to piplartine of XV185-14c haploid strain treated during stationary-growth phase (solid circle) and exponential-growth phase (open circle) in PBS after 3 h of treatment.

(Tables 2 and 3, upper panel). However, in cultures treated during growth phase in YPD medium, mutation frequencies at *hom3* and *lys1* loci were significant at higher concentrations, and mutation frequency at *his1* locus was significant at almost every applied concentration (Table 3, lower panel). Under the same conditions, higher concentrations of piplartine induced for-

Table 2

Induction of forward mutation (*can1*) in haploid N123 strain of *S. cerevisiae* after piplartine treatment

Agent	Treatment (µg/mL)	Survival (%)	Can/10 ⁷ survivors ^a
Exponential cells treated in PBS			
NC ^b	0	100 (321) ^d	3.03 ± 0.22 ^e
4NQO ^c	0.5	55.09 (177)	17.36 ± 1.41***
Piplartine	10	94.70 (304)	3.61 ± 0.27
	25	90.87 (292)	3.95 ± 0.16
	50	81.21 (261)	4.72 ± 0.2
	100	69.70 (224)	6.1 ± 0.28
	25	90.87 (292)	3.95 ± 0.16
Cells treated during growth in YPD			
NC ^b	0	100 (250)	4.01 ± 0.35
4NQO ^c	0.5	48.06 (120)	26.68 ± 0.44***
Piplartine	10	83.55 (208)	5.27 ± 0.50
	25	72.61 (181)	7.16 ± 0.77*
	50	69.57 (173)	9.22 ± 1.06**
	100	60.18 (150)	13.94 ± 1.63***

*Significant difference as compared to negative control group at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ /one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test.

^a Locus-specific revertants.

^b Negative control (solvent).

^c Positive control.

^d Number of colonies.

^e Mean and standard deviation of three independent experiments.

Table 3
Induction of point mutation (*his1-7*), ochre allele (*lys1-1*), and frameshift (*hom3-10*) mutation in haploid XV185-14c strain of *S. cerevisiae* after piplartine treatment

Agent	Treatment ($\mu\text{g/mL}$)	Survival (%)	His/ 10^7 survivors ^a	Lys/ 10^7 survivors ^b	Hom3/ 10^7 survivors ^a
Exponential cells treated in PBS					
NC ^c		100 (124) ^e	12.39 \pm 1.63 ^f	1.87 \pm 0.46 ^f	2.16 \pm 0.57 ^f
4NQO ^d	0.5	58.51 (72)	114.25 \pm 1.92***	41.17 \pm 4.85***	21.07 \pm 1.37***
Piplartine	10	96.54 (120)	11.09 \pm 0.34	1.52 \pm 0.15	1.67 \pm 0.10
	25	86.74 (102)	13.92 \pm 0.65	2.16 \pm 0.51	2.16 \pm 0.51
	50	80.78 (100)	14.98 \pm 1.47	2.93 \pm 0.99	1.98 \pm 1.00
	100	75.20 (93)	16.06 \pm 1.77*	3.57 \pm 1.19	3.58 \pm 0.70
Cells treated during growth in YPD					
NC ^c		100 (382)	9.88 \pm 1.27	7.33 \pm 0.10	4.27 \pm 0.76
4NQO ^d	0.5	45.23 (172)	56.92 \pm 3.54***	50.36 \pm 5.12***	22.10 \pm 2.01***
Piplartine	10	89.95 (343)	22.67 \pm 1.88**	11.61 \pm 2.36	5.03 \pm 0.51
	25	84.78 (323)	22.07 \pm 0.91**	13.78 \pm 1.33*	5.46 \pm 0.5
	50	58.09 (222)	26.51 \pm 1.31***	18.15 \pm 0.63**	8.41 \pm 1.06**
	100	47.17 (180)	30.56 \pm 1.65***	20.93 \pm 1.71**	10.0 \pm 0.95**

*Significant difference as compared to negative control group at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ /one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test.

^a Locus-specific revertants.

^b Locus non-specific revertants (forward mutation).

^c Negative control.

^d Positive control.

^e Number of colonies.

^f Mean and standard deviation of three independent experiments.

ward mutation in the evaluated yeast strains (Table 2, lower panel).

3.2. Recombinogenic effects on yeast

The recombinogenic effect of piplartine on exponential-growth diploid cultures maintained under either growth or non-growth conditions were investigated (Table 4). Piplartine induced statistically significant recombinogenic events on cells in PBS only at higher concentrations (upper to 25 $\mu\text{g/mL}$). A

significant crossing-over and gene conversion induced by piplartine was observed both in PBS and in growing cultures at all concentrations.

3.3. Cytotoxicity in V79 cells

Dose-dependent changes in the viability of piplartine-treated cells were evaluated based on their effects on cell growth. Results presented in Fig. 3 indicated that, in concentrations up to 20 $\mu\text{g/mL}$, this alkamide exerts cytotoxic effect in a

Table 4
Induction of crossing-over (*+cyh2*) and gene conversion (*leu1-1/leu1-12*) in diploid XS2316 strain of *S. cerevisiae* after piplartine treatment

Agent	Treatment ($\mu\text{g/mL}$)	Survival	Crossing-over/ 10^5 survivors	Gene conversion/ 10^5 survivors
Exponential cells treated in PBS				
NC ^a		100 (473) ^c	11.31 \pm 1.58 ^d	2.66 \pm 0.55 ^d
4NQO ^b	0.5	45.44 (215)	86.73 \pm 1.82***	44.19 \pm 2.82***
Piplartine	10	83.23 (394)	14.67 \pm 2.02	4.35 \pm 0.52
	25	79.81 (378)	19.39 \pm 1.38*	5.38 \pm 0.03*
	50	76.12 (361)	25.30 \pm 0.47**	6.15 \pm 0.74*
	100	63.01 (298)	30.29 \pm 1.82***	6.63 \pm 0.58**
Cells treated during growth in YPD				
NC ^a		100 (782)	30.08 \pm 1.71	3.79 \pm 0.12
4NQO ^b	0.5	44.43 (347)	101.74 \pm 5.89***	32.01 \pm 2.21***
Piplartine	10	87.85 (687)	46.95 \pm 1.52**	5.77 \pm 0.30*
	25	83.71 (655)	51.51 \pm 2.01**	6.38 \pm 0.19*
	50	79.84 (624)	52.72 \pm 1.57**	6.99 \pm 0.30**
	100	66.55 (520)	60.76 \pm 5.63***	9.48 \pm 0.36**

*Significant difference as compared to negative control group at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ /one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test.

^a Negative control.

^b Positive control.

^c Numbers of scored colonies.

^d Mean and standard deviation of three independent experiments.

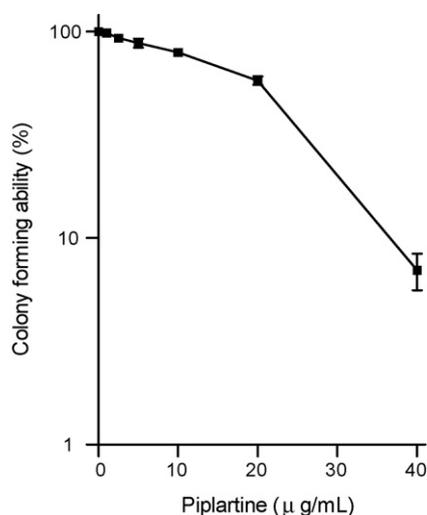


Fig. 3. Clonogenic survival of V79 cells after exposure to piplartine for 3 h.

dose-responsive manner. Piplartine reduced relative survival at 40 µg/mL to 7%.

3.4. DNA damaging effects in V79 cells

For quantification purposes and to support the observations above, single-cell electrophoresis (comet assay) was used. In this assay, fragmented DNA migrate through permeabilized nuclear membranes, as well as through plasmatic membranes, producing a “tail” from the nuclear head. Single-strand and double-strand break (DSB) induction in V79 cell line using both the alkaline and the neutral versions of the comet assay was analyzed. Table 5 shows the effects of piplartine on DI and DF, as measured by DNA damage in V79 cells, according to the comet

Table 5
Induction of DNA strand breaks by piplartine in V79 cells as evaluated by the Comet assay

Agent	Treatment (µg/mL)	Damage index ^c	Damage frequency (%) ^c
Alkaline conditions (pH ~ 13.0)			
NC ^a		26.75 ± 3.68	23.66 ± 4.04
MMS ^b	40	225.5 ± 9.20***	93.33 ± 3.78***
Piplartine	1.0	39.75 ± 6.70	26.00 ± 3.91
	2.5	92.75 ± 6.13**	48.25 ± 6.18**
	5.0	134.0 ± 6.97***	63.25 ± 2.06***
	10.0	181.0 ± 8.16***	77.00 ± 5.59***
Neutral conditions (pH ~ 8.0)			
NC ^a		10.75 ± 7.54	7.5 ± 0.57
MMS ^b	4.41	95.46 ± 2.93***	50.0 ± 2.30***
Piplartine	1.0	22.75 ± 2.62**	20.01 ± 5.71**
	2.5	38.75 ± 2.5***	27.25 ± 2.62***
	5.0	64.00 ± 3.16***	38.00 ± 3.36***
	10.0	101.5 ± 9.67***	55.25 ± 2.50***

*Significant difference as compared to negative control group at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ /One-way ANOVA Tukey's multiple comparison test.

^a Negative control (solvent).

^b Positive control.

^c Means value and standard deviation obtained from an average of 100 cells per experiment—total of three experiments per dose for each substance.

assay. Piplartine clearly resulted in a significant increase in DI and DF means as compared to the control groups, to the alkaline version at concentrations up to 2.5 µg/mL and to neutral version at all concentrations. In addition, this increase in damage score occurred in a dose-related manner. Therefore, it is possible to infer that piplartine mainly induces DNA DSBs, as significant double-strand breaks were quantitatively evident in V79 cells (Table 5, lower panel).

3.5. Cell cycle profile evaluation and determination of apoptosis induction

The results of the effect of piplartine on cell cycle distribution showed that total number of G1 cells decreased, and G2/M cell number increased, indicating cell cycle arrest during this phase (Table 6). The percentage of G2/M cells was 22.85% in the control treatment, and this percentage increased with piplartine treatment, achieving 28.51% at 5 µg/mL and 26.97% at 10 µg/mL. These results indicate that piplartine treatment causes G2/M arrest in V79 cells. In addition, the percentage of cells presenting internucleosomal DNA fragmentation also increased after piplartine treatment (Fig. 4A), suggesting that cells arrested in G2/M had undergone apoptosis.

Fig. 4B shows that the treatment of V79 cells with piplartine caused mitochondrial membrane potential loss, as flow cytometry analysis determined that piplartine treatment induced significant increase in cells with depolarized mitochondria as compared to control cells, as measured by rhodamine-123 incorporation. These data confirm that piplartine induces apoptosis in V79 cells.

Morphological examination of treated and untreated V79 cells revealed drug-mediated changes. At both studied concentrations, piplartine induced chromatin condensation and morphological changes consistent with apoptosis when evaluated under light microscopy (Fig. 5C and D). Morphology of treated cells was also analyzed using AO/EB staining for fluorescent microscopy, and the percentages of viable, apoptotic and necrotic cells were calculated. Uniformly green live cells with normal morphology were observed in V79 control groups, with more than 90% of cells counted. After treatment of V79 cells with piplartine for 3 h, an increasing number of apoptotic cells was observed (Fig. 6).

4. Discussion

Alkaloids are considered an important class of natural products capable of interacting with DNA and other cellular components, leading to a wide spectrum of DNA lesions, including lethal cell damage, DNA strand breaks, and chromosomal aberrations [3,42–51]. The present study clearly indicates that piplartine, an amide alkaloid present in the roots of *P. tuberculatum*, possesses DNA damaging potential in V79 cells, using two versions of comet assay, as well as mutagenic and recombinogenic effects on yeast.

The cytotoxic effects of piplartine on *S. cerevisiae* depend on the growth phase and the drug concentration. Piplartine induced mild cytotoxic effect on cultures of cell during stationary-growth

Table 6
Effect of piplartine on cell cycle distribution in V79 cells as determined by flow cytometry

Drug	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cell cycle phase (%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Negative Control ^a	–	48.97 \pm 1.18 ^c	21.97 \pm 0.81 ^c	22.85 \pm 0.91 ^c
Doxorubicin ^b	1.0	47.64 \pm 1.52	23.32 \pm 0.45	13.51 \pm 1.10*
Piplartine	5.0	38.94 \pm 1.68*	23.74 \pm 1.24	28.51 \pm 0.94*
	10.0	38.31 \pm 3.34*	22.85 \pm 1.59	26.97 \pm 0.36*

*Significant difference as compared to negative control group at $P < 0.05$ /one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test.

^a Negative control (solvent).

^b Positive control.

^c Data are presented as mean values \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate. Five thousand events were analyzed in each experiment.

phase (Fig. 2a). In contrast, this compound promoted cytotoxic effect both on haploid (Fig. 2, Tables 2 and 3) and on diploid (Table 4) cells in exponential-growth phase cultures at the highest employed concentrations (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) either in PBS or under culture conditions. In addition, piplartine

was weakly mutagenic when cells were treated during exponential-growth phase in PBS (Tables 2 and 3, upper panel), but it increased the frequencies of point, frameshift, and forward mutations when cells were treated in medium during growth (Tables 2 and 3, lower panel). Hence, piplartine toxicity may be linked, at least in part, to its ability to directly interact with DNA, because these cytotoxic and mutagenic effects are verified mainly during growth, when the DNA is more accessible. In addition, it is possible that piplartine can be metabolized into one or more genotoxic compounds by metabolic activation, since cells in exponential growth phase are metabolically active. Consistent with this hypothesis, piplartine induced recombinational events, mainly crossing over (Table 4), probably as consequence of DNA breaks. Similarly, alkaloids from *Porcelia macrocarpa* branches can cause DNA damage in *S. cerevisiae* [49]. The beta carbolinic alkaloids harman and harmine also show cytotoxic, mutagenic, and recombinogenic effect in yeast strains [43,48]. Oxoaporphine, a *Piper caninum* alkaloid, induced DNA damage in the yeast *S. cerevisiae* lacking DNA repair pathway by homologous recombination [3].

Piplartine treatment induced DNA damage in V79 cells, as detected by neutral and alkaline comet assay. We found that DNA DSB, as detected by neutral comet assay, was significantly higher in V79 cells following exposure to this substance (Table 5). Several alkaloids have direct impact on DNA in mammalian cells, mainly by intercalant effects [3,50–54]. Similarly, it was recently shown that sanguinarine, which is present in argemone oil, causes DNA damage in whole blood cells *in vitro* [50]. Cryptolepine has DNA damaging properties, as verified by comet assay, and it is mutagenic at high concentrations in V79 mammalian cells [51].

In our cell cycle profile analysis, piplartine induced G₂/M cell cycle arrest (Table 6), probably as a consequence of DNA double strand breaks generation and repair. DNA damage response checkpoints were identified at the G₁/S and G₂/M boundaries, as well during S phase and potentially in mitosis; however, G₂/M arrest is characteristic of agents that induce DSB [55,56]. Therefore, cell cycle distribution profile results support the conclusions obtained in the comet assay, and could indicate that the cytotoxic effect is linked to apoptotic cell death. Similarly, cryptolepine, swainsonine, ellipticine, and tetrandine induce G₂/M phase block in cancer cultured cells [57–60]. In con-

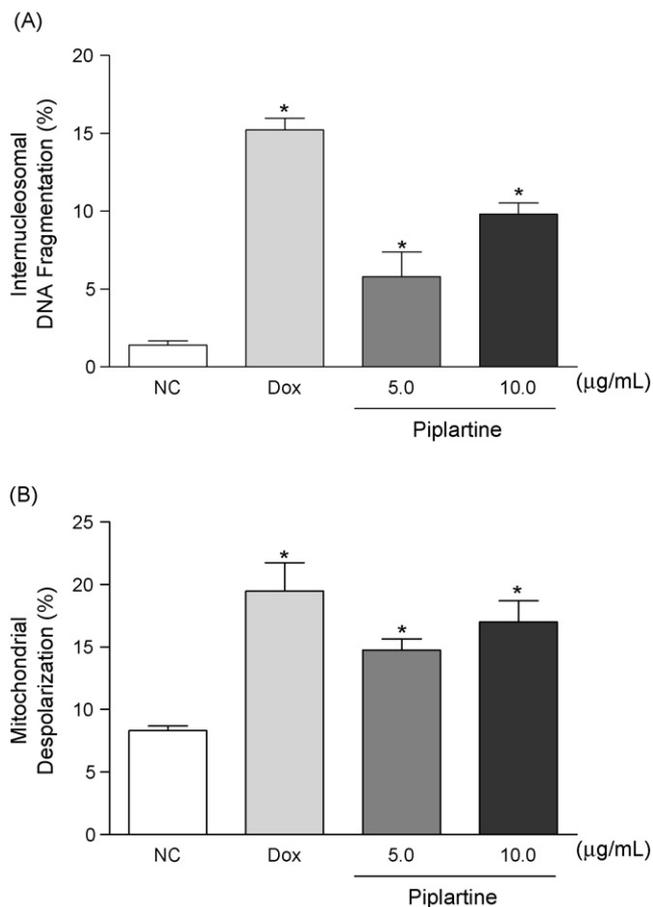


Fig. 4. Effect of piplartine on V79 cells after 3h of incubation as measured by flow cytometry. Panel A, internucleosomal DNA fragmentation was determined using propidium iodide. Panel B, effect of piplartine in V79 cell mitochondrial transmembrane potential as determined by flow cytometry using rhodamine 123. Negative control (NC) was treated with solvent. Doxorubicin (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as positive control (DOX). Data are presented as mean values \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate. Five thousand events were analyzed in each experiment. * $P < 0.05$ as compared to the control by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

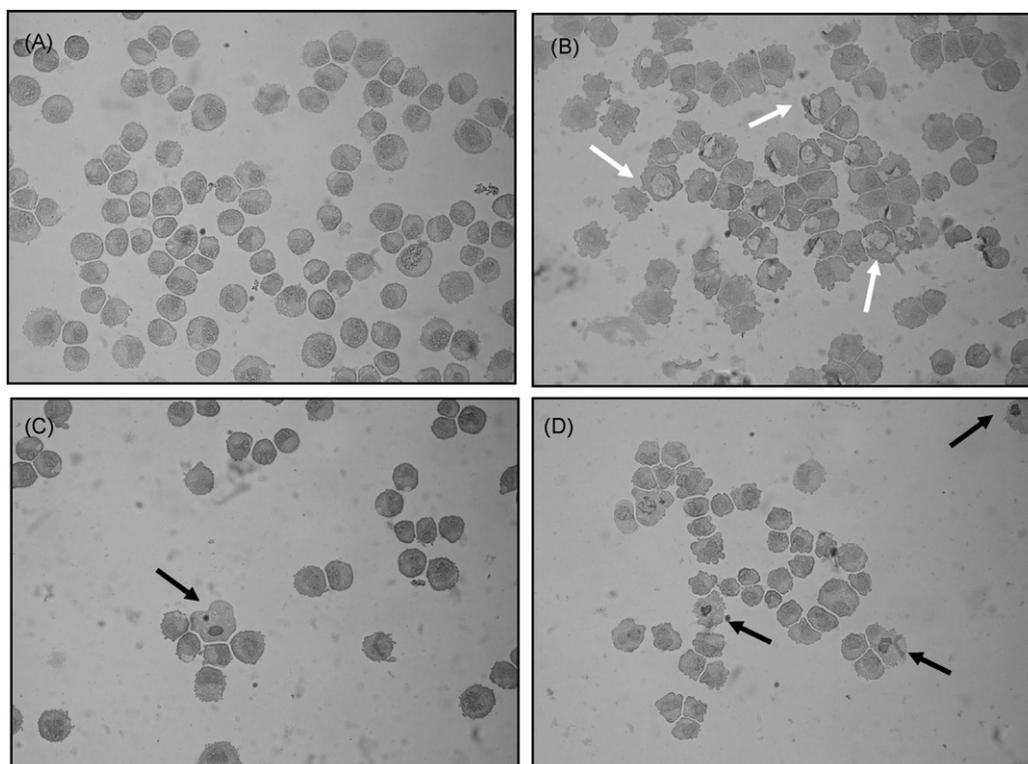


Fig. 5. Microscopic analysis of hematoxylin/eosin-stained V79 cells. Cells were untreated (A); treated with doxorubicin (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (B) positive control), treated with piplartine at 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C) or at 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D), and analyzed under light microscopy (400 \times). White arrows indicate vacuolization, and black arrows indicate chromatin condensation.

trast, sanguinarine- and berberine-treated cells extend G0/G1 cell cycle arrest [61,62].

The extension of DNA damage induced by piplartine may trigger repair mechanisms and subsequent cell death or mutagenic/recombinogenic events if cell repair fails [63,64]. This is supported by our results, which showed piplartine to be cytotoxic and genotoxic to V79 cells, and mutagenic/recombinogenic to yeast. Thus, it is possible that its cytotoxicity to several cancer cell lines *in vitro* [25,26] is partially due to its DNA damaging effects, since DNA damage is a potent stimulus to apoptotic cell death [65,66]. This lead us to evaluate the nature

of cell death involved in the piplartine cytotoxicity to V79 cells.

Cell apoptosis is important to destroy undesired cells during the development and homeostasis of multicellular organisms, and it is characterized by distinct morphological changes, such as plasma membrane blebbing, cell shrinkage, mitochondria depolarization, chromatin condensation, and DNA fragmentation [67,68]. Indeed, apoptosis induction is a powerful tool in anticancer therapy [68,69]. Several methodologies were developed to evaluate the nature and molecular mechanisms of cell death [70,71]. In the present study, apoptosis induction in piplartine-treated V79 cells was evaluated by chromatin condensation using differential morphological analysis with hematoxylin–eosin and AO/EB staining, internucleosomal DNA fragmentation detection, and mitochondrial dysfunction evaluation employing flow cytometry analysis.

The detection of the mitochondria membrane potential event provided an early indication of apoptosis initiation, because, when the disruption of mitochondria potential is dissipated, the cell would enter the irreversible apoptotic process [73,74]. The results of the present experiment demonstrated that the treatment with piplartine increased mitochondria membrane potential loss in a dose-dependent manner (Fig. 4), indicating that this alkalamide induces cell death by apoptosis in V79 cells. In addition, several alkaloids, such as berberine, swainsonine, AMD-5, piperine, and solanine, induce changes in mitochondrial membrane permeability as an event that triggers apoptosis [59,61,62,73,75–77].

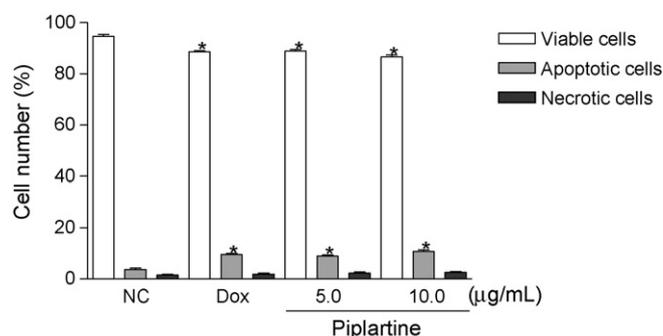


Fig. 6. Effect of piplartine on DNA nuclear fragmentation in V79 cells after 3 h incubation and staining with acridine orange and ethidium bromide (AO/EB). Negative control (NC) was treated with solvent. Doxorubicin (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as positive control (DOX). Data are expressed as mean values \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ as compared to control by One way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

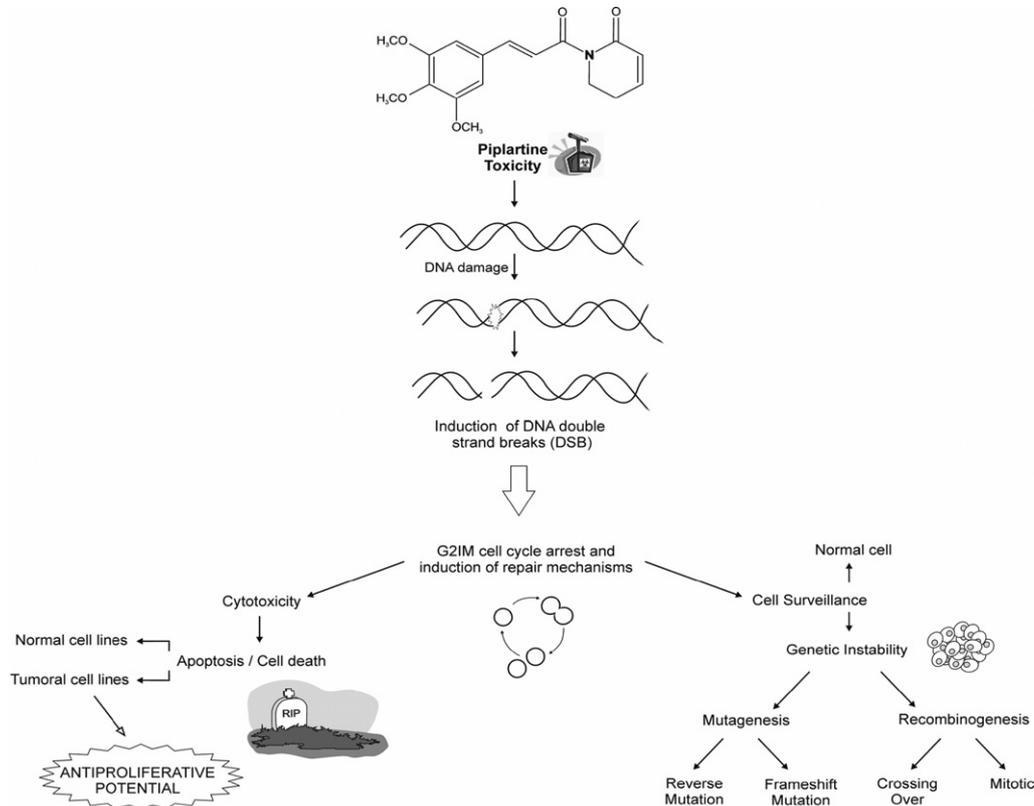


Fig. 7. Summarized model of piplartine effects.

A mitochondrial stimulus precedes the pathways that activate endonucleases, leading to DNA fragmentation [78,79]. Consistent with this finding, in piplartine-treated V79 cells, apoptotic fragmentation DNA was observed under light and fluorescence microscopy. When the integrity of cell plasma membrane was assessed, there were no signs of damage or lysis, which are clear indications of necrosis (data not shown), as necrotic cells exhibit plasma membrane lysis before any significant changes in nuclear morphology occur [80]. Finally, piplartine treatment clearly generated internucleosomal DNA fragmentation (Fig. 4), evidenced as sub-G1 peak in flow cytometry, reinforcing that cell death was caused by apoptosis.

In this study, we showed that the alkaloid piplartine is cytotoxic and genotoxic to mammalian V79 cells by DSB generation. These DNA lesions cause G2/M cell cycle arrest and induced apoptosis, as verified by morphological analysis and mitochondrial membrane potential determination. In addition, we believe that the cells that survive piplartine-induced DNA damage can accumulate mutations, since this alkaloid was mutagenic and recombinogenic, as observed in *S. cerevisiae* assays. A summarized model of piplartine effects is shown in Fig. 7. It indicates a possible mechanism of the antiproliferative effect of piplartine. Further studies are needed to identify the molecular mechanism underlying piplartine induced-apoptosis in several cell lines.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”, “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)” and GENOTOX, Genotoxicity Laboratory, Instituto Royal-Biotechnology Center, UFRGS. Dinara Moura has a doctoral grant from CNPq and Daniel Bezerra, Renato Rosa and Marne Vasconcellos have a doctoral grant from CAPES.

References

- [1] L.C. Tapsell, I. Hemphill, L. Cobiac, C.S. Patch, D.R. Sullivan, M. Fenech, S. Roodenrys, J.B. Keogh, P.M. Clifton, P.G. Williams, V.A. Fazio, K.E. Inge, Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future, *Med. J. Aust.* 185 (2006) S4–S24.
- [2] V. Triggiani, F. Resta, E. Guastamacchia, C. Sabba, B. Licchelli, S. Ghiyasaldin, E. Tafaro, Role of antioxidants, essential fatty acids, carnitine, vitamins, phytochemicals and trace elements in the treatment of diabetes mellitus and its chronic complications, *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 6 (2006) 77–93.
- [3] J. Ma, S.H. Jones, R. Marshall, R.K. Johnson, S.M. Hecht, A DNA-damaging oxoaporphine alkaloid from *Piper caninum*, *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 1162–1164.
- [4] L.S. Arambewela, L.D. Arawawala, W.D. Ratnasooriya, Antidiabetic activities of aqueous and ethanolic extracts of *Piper betle* leaves in rats, *J. Ethnopharmacol.* 102 (2005) 239–245.
- [5] E.S. Sunila, G. Kuttan, Piper longum inhibits VEGF and proinflammatory cytokines and tumor-induced angiogenesis in C57BL/6 mice, *Int. Immunopharmacol.* 6 (2006) 733–741.

- [6] S. Ganguly, S. Mula, S. Chattopadhyay, M. Chatterjee, An ethanol extract of *Piper betle* Linn. mediates its anti-inflammatory activity via down-regulation of nitric oxide, *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (2007) 711–718.
- [7] C.D. Dodson, L.A. Dyer, J. Searcy, Z. Wrigh, D.K. Letourneau, Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*, *Phytochemistry* 53 (2000) 51–54.
- [8] F. Cicero Bezerra Felipe, J. Trajano Sousa Filho, L.E. de Oliveira Souza, J. Alexandre Silveira, D. Esdras de Andrade Uchoa, E. Rocha Silveira, O. Deusdenia Loiola Pessoa, G.S. de Barros Viana, Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice, *Phytomedicine* (2007).
- [9] I.L. Tsai, F.P. Lee, C.C. Wu, C.Y. Duh, T. Ishikawa, J.J. Chen, Y.C. Chen, H. Seki, I.S. Chen, New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*, *Planta Med.* 71 (2005) 535–542.
- [10] S. Panda, A. Kar, Piperine lowers the serum concentrations of thyroid hormones, glucose and hepatic 5'D activity in adult male mice, *Horm. Metab. Res.* 35 (2003) 523–526.
- [11] C.R. Pradeep, G. Kuttan, Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice, *Clin. Exp. Metastasis* 19 (2002) 703–708.
- [12] K. Selvendiran, S.M. Banu, D. Sakthisekaran, Oral supplementation of piperine leads to altered phase II enzymes and reduced DNA damage and DNA-protein cross links in Benzo(a)pyrene induced experimental lung carcinogenesis, *Mol. Cell. Biochem.* 268 (2005) 141–147.
- [13] K. Selvendiran, R. Padmavathi, V. Magesh, D. Sakthisekaran, Preliminary study on inhibition of genotoxicity by piperine in mice, *Fitoterapia* 76 (2005) 296–300.
- [14] K. Selvendiran, J. Prince Vijeya Singh, D. Sakthisekaran, In vivo effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 19 (2006) 107–111.
- [15] K. Selvendiran, C. Thirunavukkarasu, J.P. Singh, R. Padmavathi, D. Sakthisekaran, Chemopreventive effect of piperine on mitochondrial TCA cycle and phase-I and glutathione-metabolizing enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice, *Mol. Cell. Biochem.* 271 (2005) 101–106.
- [16] C. de Mattos Duarte, H. Verli, J.X. de Araujo-Junior, I.A. de Medeiros, E.J. Barreiro, C.A. Fraga, New optimized piperamide analogues with potent in vivo hypotensive properties, *Eur. J. Pharm. Sci.* 23 (2004) 363–369.
- [17] R.S. Vijayakumar, N. Nalini, Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent from *Piper nigrum* on erythrocyte antioxidant status in high fat diet and antithyroid drug induced hyperlipidemic rats, *Cell Biochem. Funct.* 24 (2006) 491–498.
- [18] R.S. Vijayakumar, N. Nalini, Piperine, an active principle from *Piper nigrum*, modulates hormonal and apo lipoprotein profiles in hyperlipidemic rats, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 17 (2006) 71–86.
- [19] S.W. Lee, M.C. Rho, H.R. Park, J.H. Choi, J.Y. Kang, J.W. Lee, K. Kim, H.S. Lee, Y.K. Kim, Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by alkaloids isolated from the fruits of *Piper longum* and *Piper nigrum*, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9759–9763.
- [20] Y.N. Singh, N.N. Singh, Therapeutic potential of kava in the treatment of anxiety disorders, *CNS Drugs* 16 (2002) 731–743.
- [21] J.R. Stohr, P.G. Xiao, R. Bauer, Constituents of Chinese *Piper* species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro, *J. Ethnopharmacol.* 75 (2001) 133–139.
- [22] C.Y. Chu, J.P. Chang, C.J. Wang, Modulatory effect of piperine on benzo[a]pyrene cytotoxicity and DNA adduct formation in V-79 lung fibroblast cells, *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 373–377.
- [23] S. Unchern, K. Nagata, H. Saito, J. Fukuda, Piperine, a pungent alkaloid, is cytotoxic to cultured neurons from the embryonic rat brain, *Biol. Pharm. Bull.* 17 (1994) 403–406.
- [24] A. Khajuria, R.K. John, U. Zutshi, Piperine mediated alterations in lipid peroxidation and cellular thiol status of rat intestinal mucosa and epithelial cells, *Phytomedicine* 6 (1999) 351–355.
- [25] D.P. Bezerra, F.O. Castro, A.P. Alves, C. Pessoa, M.O. Moraes, E.R. Silveira, M.A. Lima, F.J. Elmiro, L.V. Costa-Lotufo, In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39 (2006) 801–807.
- [26] D.P. Bezerra, G.C. Militao, F.O. de Castro, C. Pessoa, M.O. de Moraes, E.R. Silveira, M.A. Lima, F.J. Elmiro, L.V. Costa-Lotufo, Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways, *Toxicol. In Vitro* 21 (2007) 1–8.
- [27] H.M. Navickiene, S. Bolzani Vda, M.J. Kato, A.M. Pereira, B.W. Bertoni, S.C. Franca, M. Furlan, Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography, *Phytochem. Anal.* 14 (2003) 281–284.
- [28] C.K. Atal, K.L. Dhar, J. Singh, The chemistry of Indian *Piper* species, *Lloydia* 38 (1975) 256–264.
- [29] D. Burke, D. Dawson, T. Stearns, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [30] S. Snow, Absence of suppressible alleles at the his 1 locus of yeast, *Mol. Gen. Genet.* 164 (1971) 341–342.
- [31] D.C. Hawthorne, R.K. Mortimer, Suppressors in yeast, *Genetics* 48 (1963) 617–620.
- [32] R.C. Von Borstel, K.T. Cain, C.M. Steinberg, Inheritance of spontaneous mutability in yeast, *Genetics* 69 (1971) 17–27.
- [33] D.C. Hawthorne, Identification of nonsense codons in yeast, *J. Mol. Biol.* 43 (1969) 71–75.
- [34] R.C. Schuller, R.C. Von Borstel, Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration, *Mutat. Res.* 24 (1974) 17–23.
- [35] A. Hartmann, G. Speit, The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay), *Toxicol. Lett.* 90 (1997) 183–188.
- [36] A. Hartmann, A. Elhajouji, E. Kiskinis, F. Poetter, H. Martus, A. Fjallman, W. Friauff, W. Suter, Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test, *Food Chem. Toxicol.* 39 (2001) 843–858.
- [37] M. Wojewodzka, I. Buraczewska, M. Kruszewski, A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody, *Mutat. Res.* 518 (2002) 9–20.
- [38] S.B. Nadin, L.M. Vargas-Roig, D.R. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183–1186.
- [39] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [40] B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S.Y. Brendler-Schwaab, A.R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T.S. Kumaravel, M. Nakajima, Y.F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez, A. Hartmann, Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup, *Mutat. Res.* 627 (2007) 31–35.
- [41] I. Nicoletti, G. Magliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J. Immunol. Methods* 139 (1991) 271–279.
- [42] J.M. Boeira, J. da Silva, B. Erdtmann, J.A. Henriques, Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro, *Pharmacol. Toxicol.* 89 (2001) 287–294.
- [43] J.M. Boeira, A.F. Viana, J.N. Picada, J.A. Henriques, Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.* 500 (2002) 39–48.
- [44] M.M. Cohen, Y. Shiloh, Genetic toxicology of lysergic acid diethylamide (LSD-25), *Mutat. Res.* 47 (1977) 183–209.
- [45] S. Ohmori, Y. Morimoto, Dihydroetorphine: a potent analgesic: pharmacology, toxicology, pharmacokinetics, and clinical effects, *CNS Drug Rev.* 8 (2002) 391–404.
- [46] Y. Pommier, Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 789–802.
- [47] J.N. Picada, R. Roesler, J.A. Henriques, Genotoxic, neurotoxic and neuroprotective activities of apomorphine and its oxidized derivative 8-oxo-apomorphine, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38 (2005) 477–486.

- [48] R. Cao, W. Peng, Z. Wang, A. Xu, Beta-carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 479–500.
- [49] J.H. Lago, M.H. Chaves, M.C. Ayres, D.G. Agripino, M.C. Young, Evaluation of antifungal and DNA-damaging activities of alkaloids from branches of *Porcelia macrocarpa*, *Planta Med.* 73 (2007) 292–295.
- [50] K.M. Ansari, A. Dhawan, S.K. Khanna, M. Das, In vivo DNA damaging potential of sanguinarine alkaloid, isolated from argemone oil, using alkaline Comet assay in mice, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 147–153.
- [51] C. Ansah, A. Khan, N.J. Gooderham, In vitro genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine, *Toxicology* 208 (2005) 141–147.
- [52] Q. Ding, K. Chichak, J.W. Lown, Pyrroloquinoline and pyridoacridine alkaloids from marine sources, *Curr. Med. Chem.* 6 (1999) 1–27.
- [53] R. van Der Heijden, D.I. Jacobs, W. Snoeijer, D. Hallard, R. Verpoorte, The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 607–628.
- [54] J. Kluzka, B. Baldeyrou, P. Colson, P. Rasoanaivo, L. Mambu, F. Frappier, C. Bailly, Cytotoxicity and DNA binding properties of the plant alkaloid burasaine, *Eur. J. Pharm. Sci.* 20 (2003) 383–391.
- [55] P.A. Jeggo, M. Lobrich, Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability, *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 1192–1198.
- [56] J. Bartek, J. Lukas, DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 (2007) 238–245.
- [57] P.L. Kuo, Y.L. Hsu, Y.C. Kuo, C.H. Chang, C.C. Lin, The anti-proliferative inhibition of ellipticine in human breast mda-mb-231 cancer cells is through cell cycle arrest and apoptosis induction, *Anticancer Drugs* 16 (2005) 789–795.
- [58] L.T. Ng, L.C. Chiang, Y.T. Lin, C.C. Lin, Antiproliferative and apoptotic effects of tetrandrine on different human hepatoma cell lines, *Am. J. Chin. Med.* 34 (2006) 125–135.
- [59] J.Y. Sun, M.Z. Zhu, S.W. Wang, S. Miao, Y.H. Xie, J.B. Wang, Inhibition of the growth of human gastric carcinoma in vivo and in vitro by swainsonine, *Phytomedicine* 14 (2007) 353–359.
- [60] H. Zhu, N.J. Gooderham, Mechanisms of induction of cell cycle arrest and cell death by cryptolepine in human lung adenocarcinoma a549 cells, *Toxicol. Sci.* 91 (2006) 132–139.
- [61] J. Malikova, A. Zdarilova, A. Hlobilkova, Effects of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* 150 (2006) 5–12.
- [62] S. Jantova, L. Cipak, S. Letasiova, Berberine induces apoptosis through a mitochondrial/caspase pathway in human promonocytic U937 cells, *Toxicol. In Vitro* 21 (2007) 25–31.
- [63] J.H. Houtgraaf, J. Versmissen, W.J. van der Giessen, A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells, *Cardiovasc. Revasc. Med.* 7 (2006) 165–172.
- [64] B.X. Hoang, S.A. Levine, P. Pham, D.G. Shaw, Hypothesis of the cause and development of neoplasms, *Eur. J. Cancer Prev.* 16 (2007) 55–61.
- [65] W.P. Roos, B. Kaina, DNA damage-induced cell death by apoptosis, *Trends Mol. Med.* 12 (2006) 440–450.
- [66] N. Zhou, H. Xiao, T.K. Li, E.K.A. Nur, L.F. Liu, DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 29532–29537.
- [67] K. Vermeulen, D.R. Van Bockstaele, Z.N. Berneman, Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer, *Ann. Hematol.* 84 (2005) 627–639.
- [68] E.G. Levin, Cancer therapy through control of cell migration, *Curr. Cancer Drug Targets* 5 (2005) 505–518.
- [69] R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, The role of apoptosis in cancer cell survival and therapeutic outcome, *Cancer Biol. Ther.* 5 (2006) 1429–1442.
- [70] I. Vermes, C. Haanen, C. Reutelingsperger, Flow cytometry of apoptotic cell death, *J. Immunol. Methods* 243 (2000) 167–190.
- [71] R. Mirakian, K. Nye, F.F. Palazzo, A.W. Goode, L.J. Hammond, Methods for detecting apoptosis in thyroid diseases, *J. Immunol. Methods* 265 (2002) 161–175.
- [72] S.Y. Gao, Q.J. Wang, Y.B. Ji, Effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in HepG2 cells and [Ca²⁺]_i in the cells, *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 3359–3367.
- [73] C.L. Hsu, G.C. Yen, Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 1730–1736.
- [74] C.S. Lee, E.S. Han, Y.K. Kim, Piperine inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial dysfunction and cell death in PC12 cells, *Eur. J. Pharmacol.* 537 (2006) 37–44.
- [75] M.A. Altinoz, A. Bilir, R.F. Del Maestro, S. Tuna, E. Ozcan, G. Gedikoglu, Noscapine, Noscapine and diltiazem augment taxol and radiation-induced S-phase arrest and clonogenic death of C6 glioma in vitro, *Surg. Neurol.* 65 (2006) 478–484 (discussion 485).
- [76] C. Griffin, N. Sharda, D. Sood, J. Nair, J. McNulty, S. Pandey, Selective cytotoxicity of Pancratiastatin-related natural Amaryllidaceae alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds, *Cancer Cell Int.* 7 (2007) 10.
- [77] A. Yoshida, Y. Pommier, T. Ueda, Endonuclease activation and chromosomal DNA fragmentation during apoptosis in leukemia cells, *Int. J. Hematol.* 84 (2006) 31–37.
- [78] M. Zhang, Y. Li, H. Zhang, S. Xue, BAPTA blocks DNA fragmentation and chromatin condensation downstream of caspase-3 and DFF activation in HT-induced apoptosis in HL-60 cells, *Apoptosis* 6 (2001) 291–297.
- [79] J.A. Collins, C.A. Schandi, K.K. Young, J. Vesely, M.C. Willingham, Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis, *J. Histochem. Cytochem.* 45 (1997) 923–934.