

DÉBORA BARBOSA VENDRAMINI COSTA

**“GONIOTALAMINA:
ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA”**

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DÉBORA BARBOSA VENDRAMINI COSTA

**“GONIOTALAMINA:
ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Débora Barbosa Vendramini Costa

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
Co-Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C823g	<p>Costa, Débora Barbosa Vendramini, 1984- Goniotalamina: atividade antitumoral e anti- inflamatória / Débora Barbosa Vendramini Costa. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: João Ernesto de Carvalho. Coorientador: Ronaldo Aloise Pilli. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Goniotalamina. 2. Estiril-lactonas. 3. Câncer. 4. Inflamação. 5. Tumor. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Pilli, Ronaldo Aloise. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Goniothalamín: antitumor and anti-inflammatory activities

Palavras-chave em Inglês:

Goniothalamín

Styryl-lactones

Cancer

Inflammation

Tumor

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

João Ernesto de Carvalho [Orientador]

Ângelo de Fátima

Luis Fernando Barbisan

Fátima Aparecida Böttcher Luiz

Carmen Silvia Passos Lima

Data da defesa: 05-07-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 05 de julho de 2012

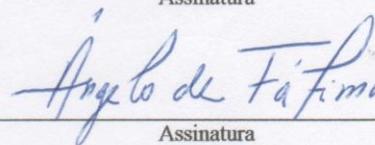
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)



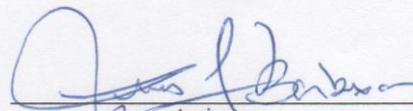
Assinatura

Prof. Dr. Ângelo de Fátima



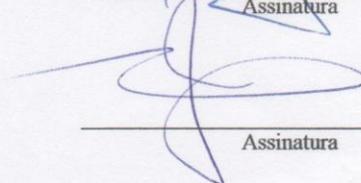
Assinatura

Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan



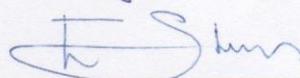
Assinatura

Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz



Assinatura

Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima



Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Assinatura

Profa. Dra. Márcia Aparecida Antônio

Assinatura

Dedico o fruto do meu trabalho à minha mãe, a pessoa mais guerreira e corajosa que conheço. Obrigada por confiar em mim.

"Cada dia traz sua alegria e sua pena, e também sua lição proveitosa."

(José Saramago)

*Ofereço também o resultado desses quatro anos de trabalho às
pessoas que me mantiveram firme para seguir, que confiaram e
acreditaram em mim incondicionalmente...*

Guilherme (Vá) e João:

Muito obrigada...

*"Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos
ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que simplesmente aparecem
em nossas vidas e nos marcam para sempre."*

(Cecília Meireles)

*"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará
ao seu tamanho original"*
(Albert Einstein)

"Temos de nos tornar a mudança que queremos ver"
(Mahatma Gandhi)

*"Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou
construir um castelo..."*
(Nemo Nox)

Agradecimentos

Agradeço...

À Luz suprema, que me concede sabedoria e paciência, curiosidade e autoconfiança.

À minha mãe, por todo cuidado, pela fortaleza e pela confiança. Ao meu irmão, por nossos momentos de irmão. Rafael: acredito na tua força!

Agradeço muito, muito, muito ao João Ernesto de Carvalho, meu orientador de tese e de vida. João: obrigada por ser meu amigo, meu parceiro, por representar tão bem o pai que não tenho. Obrigada pela paciência e pelos incentivos.

Ao Ronaldo Pilli, pela co-orientação, amizade e confiança em meu trabalho.

À Virginia Motilva, por ter me acolhido em seu laboratório na Universidad de Sevilla e por todas as oportunidades e ensinamentos. À Sofia, por toda a ajuda.

Ao Guilherme (Varvito), por todo o companheirismo, por todo o amor. Obrigada por estar sempre ao meu lado... e para você digo: *“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis” (Fernando Pessoa).*

À minha família: avós, tios, primos: obrigada pela torcida e confiança.

Ao Guilherme, por cuidar da gente, por cuidar da minha mãe... por ter acompanhado todos os meus grandes passos.

Ao Igor, meu bebê branco e peludo, que esteve ao meu lado nos momentos de escrita até de madrugada, deitado nos meus pés.

Aos amigos Jeba, Babu, Lag, Maca, Antonio Alcaide e Elena Forero, por estarem por perto mesmo estando distantes...Elenita, gracias por todo amiga...

À amiga Malu, pela amizade, pelos conselhos, pelos bons momentos.

Aos queridos José Carlos, Mariza, Flávio, Carol, Inaiá, Caian, Otto, Cristiane e Adinan: obrigada!

Às amigonas Gabi, Paula Monteiro e Giovanna Longato pela ajuda nos meus experimentos, por serem tão prestativas e amigas. Obrigada pela força e conselhos.

À Sirlene, por ser a mãezona de todos, por ter me ajudado em tudo e me ensinado tantas coisas.

À Ana Lúcia e Mary Ann: obrigada por todos os conselhos e contribuições. À Karin e Ana Possenti, pela amizade, pelos ensinamentos e por cuidarem do nosso laboratório.

Aos amigos da DFT, DFito e agregados: Beto, Michelle, Vanessa, Giovanna Fiorito, Lari Shiozawa, Vivi, Paula Paiva, Adriana, Tati, Thiago, Rosana, Rogério, Fabrício, Leila, Leilane, Pati, Rogério, Núbia, Ilza, Rodney, Karina e Ricardo...obrigada pela ajuda, companhia, pela alegria, pelas longas conversas de cozinha...agradeço ainda aos que por ali passaram Lari Rizzo, Cris Madjarof (amiguinha!), Érika, Sabrina, Silvana, Tati, enfim, a todos que me ajudaram em alguma fase desse processo...

Aos amigos do IQ, que estão por ali ou pelo mundo: Ilton, Vanessa, Lucas, Rosi, Júlio, Gilmar, Rodrigo, Bruno, Vânia, Carol, Roberto, Marjorie, e ainda Cilene (muito obrigada por me ensinar a preparar goniotalamina!), Manoel, Roberta, Valquírio... com vocês aprendi coisas que nunca imaginava aprender...*Keck?* Obrigada pela amizade, companhia, cafés e conversas divertidas.

Ao Dr. Edson Antunes, Dra. Glauca Mello e à equipe do Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP.

Aos amigos da Iris Ativa-Lina Penteadó, por todo apoio e amizade, por compartilharem comigo o melhor da vida, que é a dança.

Aos amigos de Sevilla, sempre tão alegres e prestativos: Javier, Elena Talero, Antonio Alcaide, Jose, Hanaa, Jesús, Mario, Jose Antonio, Ana Cárdeno, Angeles, Marina, Mawi, Carmina, Antonio Leon, Estefanía, Carmen Claro, Bea...os echo de menos chicos!

À queridíssima Liliam Panagio por sua eficiência, paciência e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

À FAPESP pela bolsa concedida para a realização desse trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com o trabalho e torceram por mim... Muito Obrigada!

Resumo

A carcinogênese é um processo longo, multi-etapas, onde células normais progressivamente adquirem um fenótipo neoplásico. Sua origem é favorecida por fatores genéticos, exposição à carcinógenos químicos, infecções crônicas e incorporação de mutações em genes envolvidos com a regulação da homeostase celular. O crescente entendimento da biologia tumoral tem fornecido alvos moleculares para a triagem orientada de quimioterápicos e de agentes quimiopreventivos, geralmente de origem natural ou sintetizados com base em produtos naturais. A evolução da química orgânica permitiu que compostos naturais fossem sintetizados de forma econômica e aperfeiçoados quanto às suas propriedades físico-químicas, favorecendo sua disponibilidade. Esse trabalho teve como foco a goniotalamina, uma estiril-lactona naturalmente encontrada na forma enantiomérica (*R*) em plantas do gênero *Goniothalamus* (Annonaceae). Foram sintetizadas as formas (*R*), (*S*) e racêmica, que em painel de nove linhagens tumorais humanas levaram à inibição de crescimento e morte celular com elevada potência. Apesar da potência sobre a MCF-7 (carcinoma mamário responsivo ao estrogênio), estudos com estimulação estrogênica revelaram que a atividade da goniotalamina é independente da via hormonal. De qualquer maneira, a goniotalamina racêmica inibiu em 65% a proliferação da MCF-7 implantada em fibras semipermeáveis (*hollow fiber*) em camundongos. A citometria de fluxo revelou que o racemato de goniotalamina induz apoptose na linhagem tumoral de cólon HT-29 em baixa concentração (10 µg/mL), com participação das caspases 8 e 9, sugerindo ativação das vias extrínseca e intrínseca. Houve também indução de apoptose na linhagem de melanoma humano SK-MEL-2, mas esse efeito diminuiu quando essa linhagem foi transfectada com Bcl-X_L, inibidor apoptótico ligado à mitocôndria, sugerindo ativação principalmente da via apoptótica extrínseca, com ativação da via intrínseca para amplificação do sinal. A goniotalamina em suas três formas comprovou *in vivo* a atividade apresentada *in vitro*, pela inibição do desenvolvimento tumoral em modelo de tumor sólido e ascítico de Ehrlich, sem sinais de toxicidade nas doses efetivas. Esses resultados, aliados aos bons rendimentos na rota sintética, favoreceram a continuidade dos estudos com a forma racêmica. Considerando que aproximadamente 25% dos tumores estão relacionados com inflamações crônicas, a goniotalamina racêmica foi avaliada em modelos de edema de pata induzido por carragenina e por diversos mediadores (fosfolipase A₂, histamina/serotonina, prostaglandina E₂ e bradicinina), apresentando atividade anti-edematogênica em todos os modelos. Corroborando com esses resultados, a goniotalamina apresentou efeito antinociceptivo em modelos de algia induzidos por processos inflamatórios. A goniotalamina inibiu o desenvolvimento de colite induzida por TNBS e o tratamento oral (30 mg/kg, três vezes por semana/três meses) preveniu o desenvolvimento de inflamação e câncer em animais deficientes em interleucina 10, sem apresentar sinais de toxicidade. Tais dados foram revelados após análise de dano macroscópico e microscópico (histologia) do cólon, havendo diminuição da expressão relativa dos genes para TNFα e MMP9, importantes no processo inflamatório e de invasão e metástase. Além disso, a goniotalamina diminuiu a incidência de metástase pulmonar em modelo de melanoma metastático. Os resultados obtidos e o perfil multi-alvos apresentado pela goniotalamina sugerem sua avaliação em terapias combinatórias para tratamento de processos inflamatórios crônicos e de câncer.

Abstract

Carcinogenesis is a long process involving several steps, in which normal cells progressively acquire a neoplastic phenotype. Its origin is favored by genetic factors, exposure to chemical carcinogens, chronic infections and incorporation of mutations into genes involved in regulation of cellular homeostasis. The increasing understanding of tumor biology has provided molecular targets for screening of targeted chemotherapeutic and chemopreventive agents, usually from natural sources or synthesized based on natural products. The improvement of organic chemistry allowed the synthesis of natural products in an economic and refined way, with improvement on their physicochemical properties and availability. This work focuses on goniiothalamine, a styryl-lactone naturally found on its enantiomeric form (*R*), in plants of *Goniiothalamus* (Annonaceae) genus. The (*R*), (*S*) and racemic forms were synthesized and led to growth inhibition and cell death in a panel of nine human tumor cell lines, with high potency. Despite the potency against MCF-7 (breast carcinoma responsive to estrogen), estrogen stimulation studies revealed that the goniiothalamine activity is independent of the hormone pathway. Anyway, racemic goniiothalamine inhibited on 65% the proliferation of MCF-7 implanted into semi permeable fibers (*hollow fiber*) in mice. Flow cytometry analysis showed that low concentration of racemic goniiothalamine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) leads colon tumor cell line (HT-29) to apoptosis with involvement of caspase 8 and 9, suggesting the activation of the extrinsic and intrinsic pathways. Apoptosis was also induced in human melanoma cell line SK-MEL-2, but the activity was decreased in SK-MEL-2 transfected with Bcl-X_L, a mitochondrial related apoptotic inhibitor, suggesting mainly activation of the extrinsic apoptotic pathway, with activation of the intrinsic pathway to amplify the signal. Goniiothalamine on its three forms comproved *in vivo* the *in vitro* activity by inhibiting tumor development in models of Ehrlich solid and ascitic tumor in mice, without signals of toxicity at the effective doses. These results, combined with good yields in the synthetic rout favored the racemic form to continue the *in vivo* studies. Considering that about 25% of tumors are related to chronic inflammation, racemic goniiothalamine was evaluated in models of paw edema induced by carrageenan and various mediators (phospholipase A₂, histamine/serotonin, prostaglandinE₂ and bradykinin) displaying anti-edematogenic activity in all models. Corroborating these results, goniiothalamine showed antinociceptive effect in models of algisia induced by inflammatory processes. It also inhibited the development of TNBS-induced colitis and oral treatment (30mg/kg, three times/week, three months) prevented the development of inflammation and cancer in interleukin-10 deficient mice, without signals of toxicity. These data were revealed after macroscopic and microscopic (histology) colon damage analysis, with decreased expression of TNF α and MMP9, which are important in inflammation, invasion and metastasis process. Furthermore, goniiothalamine reduced the incidence of lung metastasis in a metastatic melanoma model. These results and the multitarget profile presented by goniiothalamine suggest its evaluation in combinatory therapies for treatment of chronic inflammation and cancer.

Índice de abreviaturas e acrônimos

(R)-GTN: enantiômero natural
(S)-GTN: enantiômero não-natural
5-FU: 5-Fluorouracil
5-HT: Serotonina
7-AAD: *7-Amino-actinomycin D*
786-0: linhagem celular humana de adenocarcinoma de rim
AA: Ácido Araquidônico
AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais
Akt: *Protein Kinase B (PKB)*
AMPK: *AMP-activated Protein Kinase*
Apaf-1: *Apoptotic Protease Activating Factor 1*
APC: *Adenomatous Polyposis Coli*
APC: Células Apresentadoras de Antígenos
ATP: Adenosina Trifosfato
Bad: *Bcl-2-associated death promoter*
Bak: *Bcl-2 homologous-Antagonist-killer*
Bax: *Bcl-2-associated X protein*
Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*
Bcl-X_L: *B-cell Lymphoma-extra Large*
BID: *BH3 Interacting Domain Death Agonist*
BINOL: *1,1'-Bi-2-naphthol*
C: controle de células
CCR: Câncer Colorretal
CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CIBEP: Cooperação de Investigação Brasil, Espanha e Portugal
CMF: Ciclofosfamida, Metrotexato, 5-Fluorouracil
c-Myc: *Myelocytomatosis viral oncogene*
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX: Ciclo-oxigenase
COX-2: Ciclo-oxigenase-2
cPLA₂: Fosfolipase A₂ Citosólica
CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CRM1: *Chromosome Region Maintenance Protein 1*
DFT: Divisão de Farmacologia e Toxicologia
DI: densidade de inoculação
DISC: *Death-inducing Signalling Complex*
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
dNTP: *Deoxyribonucleotide Triphosphates*

DO: Densidade Óptica
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*
EMT: *Epithelial to Mesenchymal Transition*
Erk: *Extracellular-signal-regulated kinases*
FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fas: *TNF receptor superfamily, member 6*
FDA: *Food and Drug Administration*
GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*
GI₅₀: *growth inhibition 50%* (concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular)
GSH: Glutathiona
GTN: Goniotalamina
HaCat: linhagem celular de queratinócitos normais humanos
Hbg: Hemoglobina
HE: Hematoxilina Eosina
HETAB: *Hexadecil-Trimetil Brometo de Amônia*
HT-29: *linhagem celular de adenocarcinoma colorretal*
HVL: *Van Hippel-Lindau disease*
IBD: *Inflammatory Bowel Disease*
IFN γ : Interferon-gamma
Ig: Imunoglobulina
IGFBP: *Insulin-like Growth Factor Binding Protein*
IL: Interleucina
INCA: Instituto Nacional do Câncer
iNOS: Óxido-nítrico sintase induzida
KO: *knockout*
K-ras: *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
LC₅₀ : *lethal concentration 50%* (concentração necessária para induzir morte em 50% das células)
LOX: Lipoxigenase
MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCF-7: linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama
MDM2: *Murine Double Minute*
MDR: *Multiple Drug Resistance*
MMP-9: *Matrix Metalloproteinase 9*
MPO: Mieloperoxidase
MSH: *Melanocyte-stimulating Hormone*
MTT: *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NCI: *National Cancer Institute*
NCI-ADR/RES: linhagem celular humana de adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas
NCI-H460: linhagem celular humana de adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células
NF- κ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NO: Óxido Nítrico
NOS: Óxido-nítrico sintase
NQO1: *NAD(P)H dehydrogenase, quinone*
OMS: Organização Mundial da Saúde
OVCAR-3: linhagem celular humana de adenocarcinoma de ovário
P2P-R: *Proliferation Potential Protein-Related (P2P-R) Gene*
p53: proteína 53 (53 kDa)
PAF: Fator de Agregação Plaquetária
PBS: tampão fosfato-salina
PC-3 linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PGE₂: Prostaglandina E₂
PI3K: *Phosphoinositide-3 Kinase*
PLA₂: Fosfolipase A₂
Pt: Plaquetas
rac-GTN: racemato de goniotalamina
Raf-1: *v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*
RBC: *Red Blood Cells*
RMN: ressonância magnética nuclear
RNA: Ácido Ribonucleico
ROS: *Reactive Oxygen Species*
RPMI: meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*
SFB: Soro Fetal Bovino
Sirt 1: Sirtuina 1
SNC: Sistema Nervoso Central
SPF: *Specific Pathogen Free*
SRB: Sulforrodamina B
SR-VAD-FMK: *Sulforhodamine Derivative of Valylalanyl aspartic Acid Fluoromethyl Ketone*
STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*
T: média das absorbâncias das células tratadas
T₀: média das absorbâncias das células controle
TAM: Tamoxifeno
TCA: Ácido Tricloroacético
TCF/LEF: *T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer binding factor*
TGI: *Total Growth Inhibition* (concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular)

Th1: *T helper cells*

TNBS: *2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*

TNF- α : *Tumor necrose factor- α*

TRAIL: *TNF-related Apoptosis-inducing Ligand*

U251: *linhagem celular humana de glioblastoma*

UACC-62: *linhagem celular humana de melanoma*

UNICAMP: *Universidade Estadual de Campinas*

Vero: *linhagem celular de fibroblasto normal de rim de macaco verde*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

WBC: *White Blood Cells*

WT: *Wild Type*

Índice de Figuras

Figura 1	Os <i>hallmarks</i> do câncer	6
Figura 2	<i>Hallmarks</i> emergentes e características que favorecem o desenvolvimento tumoral	7
Figura 3	Fatores de risco ambientais para o surgimento de câncer através do estabelecimento de processo inflamatório	10
Figura 4	Estrutura química de alguns compostos isolados de produtos naturais empregados em testes clínicos	14
Figura 5	Estrutura da (<i>R</i>)-goniotalamina, forma enantiomérica natural	20
Figura 6	(4 <i>R</i>) ou (4 <i>S</i>) 1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno	29
Figura 7	(4 <i>R</i>) ou (4 <i>S</i>)-prop-2-enoato de 1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno	30
Figura 8	(<i>R</i>) e (<i>S</i>)-goniotalamina (GTN)	31
Figura 9	1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno	32
Figura 10	Placa de 96 compartimentos utilizada nos testes de atividade antiproliferativa	36
Figura 11	Fibras de polivinilideno (<i>Hollow Fiber</i>) contendo células tumorais humanas de mama (MCF-7), implantadas no peritônio de camundongo Balb-C	44
Figura 12	Avaliação do volume da pata em hidroplestímetro e comparação das patas sadia e com tumor após eutanásia dos animais no 15º dia.	45
Figura 13	Atividade antiproliferativa da (<i>R</i>)-goniotalamina	64
Figura 14	Atividade antiproliferativa da (<i>S</i>)-goniotalamina	65
Figura 15	Atividade antiproliferativa da <i>rac</i> -goniotalamina	65
Figura 16	Influência de (<i>R</i>)-GTN sobre o crescimento da linhagem MCF-7, na presença e ausência do 17β-estradiol	68
Figura 17	Influência de (<i>S</i>)-GTN sobre o crescimento da linhagem MCF-7, na presença e ausência do 17β-estradiol	69
Figura 18	Influência do tamoxifeno sobre o crescimento da linhagem MCF--7, na presença e ausência do 17β-estradiol	70
Figura 19	Atividade antiproliferativa da goniotalamina sobre a linhagem MCF7 implantada no abdômen de camundongos, em modelo de <i>Hollow Fiber</i>	74
Figura 20	Efeito da <i>rac</i> -goniotalamina sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich	76
Figura 21	Efeito da <i>rac</i> -goniotalamina sobre o peso relativo tumoral	76
Figura 22	Efeito da (<i>R</i>) e (<i>S</i>)-goniotalamina sobre o desenvolvimento do tumor	77

	sólido de Ehrlich	
Figura 23	Efeito da (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)-goniotalamina sobre o peso relativo tumoral	78
Figura 24	Tumor ascítico de Ehrlich: quantidade de células/mL de lavado peritoneal nos diferentes tratamentos	80
Figura 25	Efeitos da <i>rac</i> -goniotalamina sobre alguns parâmetros hematológicos	81
Figura 26	Efeito da <i>rac</i> -goniotalamina, <i>rac</i> -goniotalamina + 5-fluorouracil e do Piroxicam (AINEs) sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich	83
Figura 27	Atividade da goniotalamina e do Piroxicam em modelo de edema de pata induzido por carragenina	88
Figura 28	Atividade da goniotalamina e da doxorubicina em modelo de edema de pata induzido por carragenina	89
Figura 29	Atividade da goniotalamina em modelo de edema de pata induzido por Fosfolipase A ₂	91
Figura 30	Atividade da goniotalamina em modelo de edema de pata induzido pelo composto 48/80 (liberação de serotonina e histamina)	94
Figura 31	Atividade da goniotalamina em modelo de edema de pata induzido por Bradicinina	96
Figura 32	Atividade da goniotalamina em edema de pata induzido por PGE ₂	98
Figura 33	Atividade da goniotalamina em modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético	100
Figura 34	Atividade da goniotalamina em modelo de nocicepção induzida por formalina	102
Figura 35	Dano macroscópico nos cólons expostos ao TNBS, após tratamento com goniotalamina	106
Figura 36	Atividade da goniotalamina sobre a ativação e migração de neutrófilos, avaliada através dos níveis de MPO	107
Figura 37	Dano macroscópico nos cólons expostos ao TNBS, após tratamento com goniotalamina	109
Figura 38	Atividade da goniotalamina sobre a ativação e migração de neutrófilos, avaliada através dos níveis de MPO	109
Figura 39	Ocorrência de óbitos nos diferentes grupos durante o experimento de colite aguda induzida por TNBS	111
Figura 40	Massa corporal dos animais ao longo de 12 semanas de experimento	114
Figura 41	Relação peso/comprimento do cólon no modelo de colite espontânea	115
Figura 42	Prolapso retal em animal do grupo <i>KO</i> controle no modelo de colite	115

	espontânea	
Figura 43	Análise do dano macroscópico do cólon extraído de animais dos grupos <i>KO</i> controle e <i>KO</i> tratado, após 12 semanas de experimento	117
Figura 44	Fotomicrografias dos cortes histológicos obtidos dos cólons de animais dos grupos WT controle, WT tratado, <i>KO</i> controle, <i>KO</i> tratado. Coloração hematoxilina e eosina, Giemsa.	120
Figura 45	Expressão gênica relativa para citocinas e proteínas envolvidas no processo inflamatório e na progressão tumoral	122
Figura 46	Avaliação do tipo de morte celular induzido pela goniotalamina em células HT-29, após 24 horas de tratamento	131
Figura 47	Avaliação do tipo de morte celular induzido pela goniotalamina em células HT-29, após tempos crescentes de tratamento	132
Figura 48	Avaliação da ativação de caspase 8 pela goniotalamina em células HT-29, após tempos crescentes de tratamento	133
Figura 49	Avaliação da ativação de caspase 9 pela goniotalamina em células HT-29, após tempos crescentes de tratamento	135
Figura 50	Possível mecanismo de ação da goniotalamina para indução de apoptose	136
Figura 51	Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> da <i>rac</i> -GTN sobre a linhagem B16-F10	137
Figura 52	Fotografia de metástase pulmonar da linhagem B16-F10, com produção de melanina	138
Figura 53	Concentração de melanina em relação à massa pulmonar	139
Figura 54	Avaliação da ativação de caspases pela goniotalamina em células SK-MEL-2, transfectadas ou não com Bcl-X _L , após 12 horas de tratamento	141
Figura 55	Avaliação da ativação de caspases pela goniotalamina em células SK-MEL-2, transfectadas ou não com Bcl-X _L , após 24 horas de tratamento	142
Figura 56	Hipótese para a indução de apoptose pela goniotalamina nas linhagens SK-MEL-2 e SK-MEL-2/Bcl-X _L	144

Índice de Tabelas

Tabela 1	Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	17
Tabela 2	Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> e suas DI	33
Tabela 3	Oligonucleotídeos iniciadores murino-específicos (<i>primers</i>) utilizados para a amplificação de genes alvos	56
Tabela 4	Valores de TGI e LC ₅₀ em μM , para (<i>R</i>)-, (<i>S</i>)- e <i>rac</i> -GTN, concentrações necessárias para inibir totalmente o crescimento celular e levar à morte de 50% das células, respectivamente.	66
Tabela 5	Classificação dos danos macroscópicos segundo <i>score</i> proposto por Berg <i>et al</i> , (1996).	116
Tabela 6	Avaliação histológica das alterações inflamatórias (escala 0-3) e displásicas (escala 0-1) nos animais <i>wild type</i> (WT) e IL-10 <i>-/-</i> (<i>KO</i>) com ou sem tratamento (<i>rac</i> -GTN 30 mg/kg v.o.), segundo Berg <i>et al</i> , 1996.	118

Índice de Esquemas

Esquema 1	Significado dos quadrantes presentes nos gráficos gerados a partir dos experimentos para avaliação de morte celular por citometria de fluxo	40
Esquema 2	Rota de síntese para a (<i>R</i>)-goniotalamina (1) ou (<i>R</i>)-GTN.	61
Esquema 3	Rota de síntese para a <i>rac</i> - goniotalamina (7) ou <i>rac</i> -GTN.	62
Esquema 4	Hipótese da ação da goniotalamina no modelo de colite induzida por TNBS.	111
Esquema 5	Algumas cascatas que levam à produção de TNF α e possíveis alvos da goniotalamina.	125
Esquema 6	Possível ação da goniotalamina sobre o stress oxidativo e ativação de sirtuina-1.	129

Sumário

Introdução	5
1 - Câncer	5
2 - A busca por agentes anticâncer e os produtos naturais	13
3 - A Goniotalamina	19
Objetivos	25
1 - Objetivo Geral	25
2 - Objetivos específicos	25
Metodologia	29
1 – Síntese da goniotalamina	29
1.1 - Síntese de (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)- Goniotalamina	29
1.2 – Síntese do racemato de goniotalamina (<i>rac</i> -GTN)	31
2 – Ensaio <i>in vitro</i>	33
2.1 – Células	33
2.2 – Cultivo celular	33
2.3 - Atividade antiproliferativa em cultura de células	35
2.4 – Influência da goniotalamina no crescimento da linhagem MCF-7 sob estímulo estrogênico (<i>E-screen</i>)	38
2.5 – Citometria de Fluxo	38
3 – Ensaio <i>in vivo</i>	42
3.1 – Animais	42
3.2 Avaliação da Toxicidade <i>in vivo</i>	42
3.3 - Atividade antiproliferativa da goniotalamina em camundongos implantados com a linhagem MCF-7 encapsulada em fibras semipermeáveis (<i>Hollow fiber</i>)	43
3.4 – Tumor sólido de Ehrlich	44
3.5 – Melanoma B16-F10	47
3.6 – Atividade da goniotalamina em modelos de inflamação	48
4 – Análise dos resultados	57
Resultados e discussão	61
1 - Síntese assimétrica e racêmica e atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> da goniotalamina	61
1.1 – Síntese assimétrica da goniotalamina	61
1.2 – Síntese racêmica da goniotalamina	62
1.3 – Atividades antiproliferativa da goniotalamina em cultura de células	63
1.4 – Influência da goniotalamina no crescimento celular da linhagem MCF-7 sob estímulo estrogênico (<i>E-screen</i>)	67
2 - Toxicidade aguda <i>in vivo</i>	72
3 - Atividade antiproliferativa da goniotalamina em camundongos implantados com a linhagem MCF-7 encapsulada em fibras semipermeáveis (<i>Hollow fiber</i>)	73
4 – Tumor sólido e ascítico de Ehrlich	75
5 – Atividade da goniotalamina em modelos de inflamação	85
5.1 – Edema de pata induzido por Carragenina	86

5.2 – Edema de pata induzido por Fosfolipase A ₂	90
5.3 – Edema de pata induzido pelo composto 48/80 (liberação de histamina e serotonina)	93
5.4 – Edema de pata induzido por Bradicinina.....	95
5.5 – Edema de pata induzido por PGE ₂	98
5.6 – Contorção abdominal induzida por ácido acético.....	99
5.7 – Nocicepção induzida pela Formalina.....	101
Observações gerais acerca da atividade anti-inflamatória da goniotalamina	103
Relação câncer-inflamação	104
5.8 - Colite aguda e subaguda induzida por TNBS.....	106
5.9 – Colite espontânea em camundongo <i>knockout</i> para IL-10.....	112
6 – Avaliação do tipo de morte celular induzido pela goniotalamina sobre a linhagem HT-29.....	130
6.1 Anexina.....	130
6.2 Caspase 8 e caspase 9	132
7 – Avaliação da atividade da goniotalamina em modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de melanoma	137
7.1 Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> sobre a linhagem de melanoma murino B16-F10	137
7.2 Avaliação da atividade sobre o desenvolvimento metastático do melanoma B16-F10	138
7.3 Avaliação do tipo de morte celular induzido pela goniotalamina sobre a linhagem SK-MEL-2 e SK-MEL-2 transfectada com Bcl-X _L	140
Observações gerais acerca da atividade pró-apoptótica da goniotalamina.....	145
8 - Considerações finais	146
Conclusões	149
Referências Bibliográficas	153
Anexos	167
Anexo 1	169
Anexo 2.....	173
Anexo 3.....	179

Introdução

Introdução

1 - Câncer

Câncer é o termo utilizado para discriminar doenças caracterizadas pela divisão e crescimento desordenado de células, que são capazes de invadir outros tecidos e órgãos, espalhando-se para outras partes do corpo através de vasos sanguíneos e linfáticos. Câncer não é uma doença, mas um conjunto de doenças, havendo mais de 100 tipos diferentes de câncer (NCI-EUA, 2012; INCA, 2012).

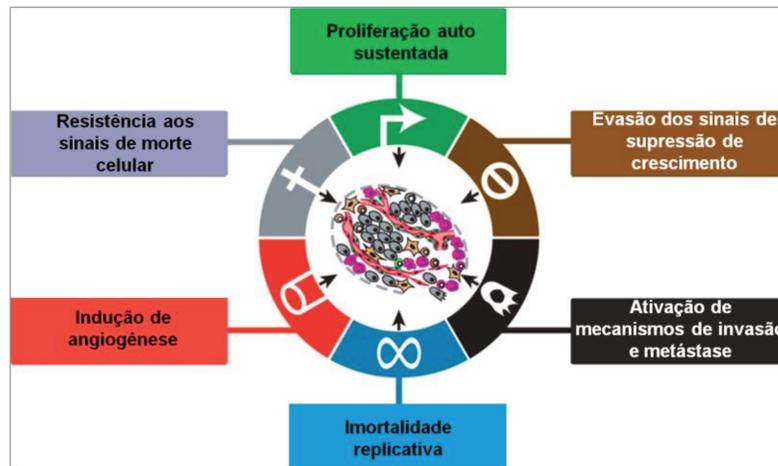
No Brasil, estima-se que para o ano de 2013 serão aproximadamente 518.510 novos casos, sendo que os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, estômago, cólon e reto para o sexo masculino e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, glândula tireoide, cólon e reto para o sexo feminino. Estendendo-se as previsões para o mundo todo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no ano de 2030 tenhamos 27 milhões de casos incidentes de câncer (INCA 2012).

O surgimento de um câncer é um processo complexo que em geral leva décadas, onde células normais progressivamente adquirem um fenótipo neoplásico através do processo de carcinogênese. Esse é um processo multi-etapas, que pode ser racionalizado pela necessidade das células neoplásicas (ou tumorais) incipientes em adquirir características que favoreçam o desenvolvimento tumoral, podendo atingir a malignidade (Hanahan & Weinberg, 2011). Tais necessidades podem ser traduzidas como respostas às barreiras ambientais à proliferação e ao crescimento, as chamadas pressões seletivas do ambiente, que governam a então “evolução somática”, direcionada por uma sequência de mutações randômicas e alterações epigenéticas no DNA, afetando genes que controlam a proliferação e sobrevivência e fornecendo as características do fenótipo maligno (Gatenby & Gillie, 2008). Dentre as barreiras ambientais a serem transpostas estão a perda do

contato célula-célula, promoção inadequada do crescimento, senescência, hipóxia, acidose, isquemia, dentre outras e cada barreira é vencida pela estratégia resultante das modificações genéticas consequentes dessas pressões seletivas. Dessa forma, existe um vasto consenso de que o câncer é uma doença genética e que o acúmulo de alterações genéticas é a base do surgimento e evolução do tumor (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012; Weinberg, 2008).

Cada modificação genética adquirida confere às células tumorais um tipo de vantagem, constituindo os *hallmarks* (características) do câncer: capacidades adquiridas pelas células tumorais durante o desenvolvimento tumoral que favorecem sua manutenção, como a proliferação auto-sustentada, evasão de sinais supressores de crescimento, resistência à morte celular, replicação ilimitada, indução de angiogênese e ativação de invasão e metástase (Hanahan & Weinberg, 2000) (Figura 1).

Figura 1 - Os *hallmarks* do câncer

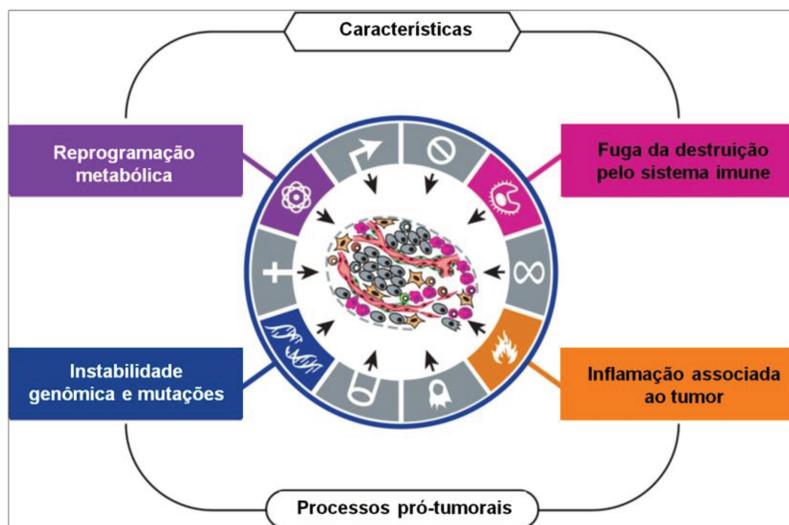


Os *hallmarks* do câncer. A figura mostra as seis características adquiridas pelas células tumorais que favorecem o desenvolvimento tumoral, sendo: proliferação auto sustentada, evasão dos sinais de supressão de crescimento, ativação de invasão e metástase, imortalidade replicativa, indução de angiogênese e resistência aos sinais de morte celular. Adaptado de Hanahan D & Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-74.

Aliadas a tais características estão as chamadas “*enabling characteristics*” - instabilidade genômica (que gera a diversidade genética que acelera a aquisição dos

hallmarks) e a inflamação associada ao tumor (que favorece e alimenta as características adquiridas), além de características emergentes (“*emerging hallmarks*”) – reprogramação do metabolismo celular e evasão da destruição pelo sistema imune (Hanahan & Weinberg, 2011) (Figura 2).

Figura 2 – *Hallmarks* emergentes e características que favorecem o desenvolvimento tumoral



Hallmarks emergentes e características que favorecem o desenvolvimento tumoral. Surgem dois novos *hallmarks* adquiridos pelas células tumorais: reprogramação do metabolismo celular e fuga da destruição pelo sistema imune. Surgem também duas características que favorecem o desenvolvimento tumoral: instabilidade genômica e mutações e inflamação associada ao tumor. Adaptado de Hanahan D & Weinberg RA. (2011). *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell*, 144: 646-74.

Inicialmente, o estudo do câncer seguia um caminho reducionista: o sistema complexo era dividido em seções menores que foram estudadas individualmente, desmontando tecidos em células e componentes celulares em moléculas, o que gerou muito progresso no entendimento dos processos celulares e moleculares; o câncer era tratado como um processo celular autônomo, onde a maioria de seus atributos poderia ser entendida em termos dos genes que suas células carregavam (Weinberg, 2008). Porém, cada vez mais se dá importância ao ambiente tumoral, pois sozinhas as células tumorais não

desenvolvem a doença; ao contrário, elas recrutam e corrompem células normais a contribuírem nesse processo (Hanahan & Coussens, 2012).

Tumores sólidos são estruturas complexas e heterogêneas, compostos pelas células tumorais embebidas em uma matriz extracelular e em uma rede vascular, rodeadas por um estroma dinâmico composto por células não malignas, como fibroblastos, células do sistema imune e células endoteliais (Trédan *et al*, 2007; Egeblad *et al*, 2010; Kessembrock *et al*, 2010; Gordon *et al*, 2011; Hanahan & Coussens, 2012). De fato, dinamismo é uma característica das células normais que rodeiam o tumor, onde são participantes ativas, contribuindo com o desenvolvimento do processo carcinogênico. Dessa forma está claro que as características tumorais não podem ser traçadas diretamente de células tumorais individuais e seus genes: o câncer é uma doença de comunicações e circuitos, onde células mutadas, que se expandem clonicamente, trazem vantagens adquiridas e coordenam seu ambiente através de sinais e conexões, liga e desliga, em um circuito orientado para a expansão e sobrevivência (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

Quanto à etiologia do câncer, além dos erros naturais que ocorrem durante a divisão e proliferação celular, a hereditariedade e o ambiente (ambiente físico e estilo de vida): na realidade, a grande maioria dos cânceres é causada por fatores ou agentes externos ao corpo; e em minoria, estão os cânceres causados por diferenças no comportamento reprodutivo e aos efeitos resultantes do meio hormonal (Weinberg, 2008). Dentre os fatores ambientais mais importantes estão o tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, hábitos sexuais, medicamentos, fatores ocupacionais e exposição prolongada ao sol (INCA, 2012). O aumento da expectativa de vida tem relação direta com a incidência de câncer: quanto mais o indivíduo vive, mais tempo ele se expõe aos fatores ambientais que o predispõe ao desenvolvimento tumoral.

Alguns fatores ambientais muitas vezes atuam como carcinógenos, ou seja, eles induzem algum tipo de estresse tecidual/celular que levará a uma instabilidade, seja oxidativa, metabólica ou genômica. Ao induzir esse estresse, há também o disparo para o

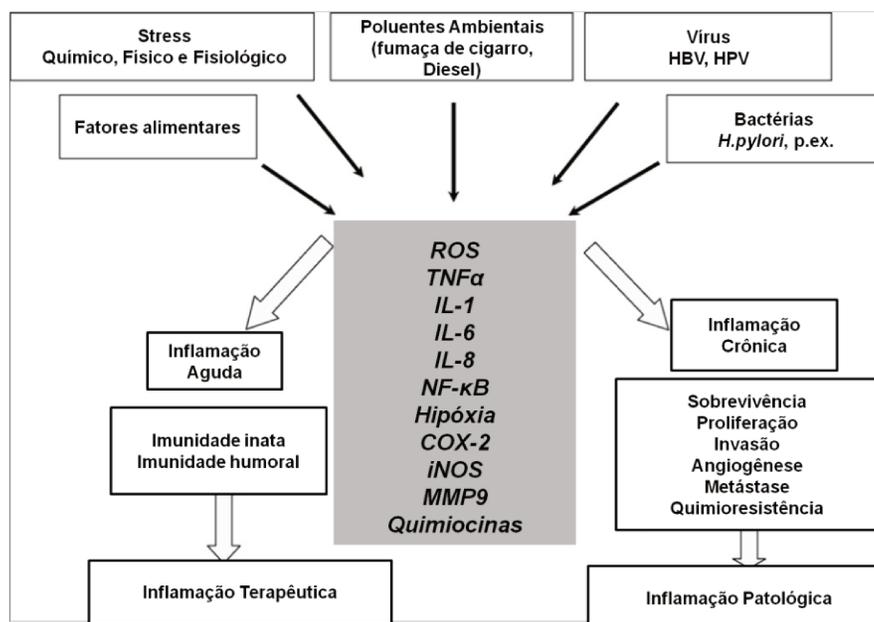
processo de carcinogênese, que é dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão tumoral (Karin & Greten, 2005).

A iniciação envolve mudanças irreversíveis ao DNA, por carcinógenos químicos ou físicos, levando a ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor. No estágio de promoção, o estímulo por certos agentes leva as células mutadas a se expandirem por sinalizarem para a proliferação celular ou redução dos processos de morte celular (Coussens, 2002; Karin & Greten, 2005). Exemplos de promotores tumorais são estrógeno, progesterona, agentes infecciosos como o vírus para hepatite B e C, *Helicobacter pylori*, tabaco e inflamações crônicas (Weinberg, 2008). Finalmente, aumento em tamanho, invasão de tecidos adjacentes e metástase caracterizam o estágio de progressão tumoral, quando o tumor pode acumular outras mutações, exacerbando assim seu fenótipo maligno (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

Estudos acerca da relação câncer-inflamação cresceram muito nos últimos anos, apesar dessa relação não ser novidade, já que em 1863 Rudolf Virchow relatava a presença de um infiltrado leucocitário no tecido neoplásico, o que foi interpretado como prova da origem de um tumor a partir de regiões inflamadas (Balkwill & Mantovani, 2001). Atualmente, dados epidemiológicos indicam que mais de 25% dos tipos de câncer estão relacionados a infecções crônicas e outros tipos de inflamação (Schetter *et al*, 2010).

A inflamação é parte da resposta do organismo aos estímulos internos e externos; é uma forma de “contra-ataque”: quando a homeostase tecidual é perturbada, macrófagos e mastócitos imediatamente liberam mediadores solúveis, tais como citocinas, quimiocinas e histamina, que induzem a mobilização e infiltração de leucócitos até o sítio da injúria, caracterizando o processo inflamatório (Visser *et al*, 2006). Quando essa resposta é mantida por um curto período de tempo, possui benefícios terapêuticos; porém, quando se torna crônica, pode desencadear uma doença. De fato, inflamações crônicas estão envolvidas em diversas patologias como doenças cardiovasculares, diabetes, artrite reumatoide, Alzheimer, doenças pulmonares, desordens auto-imunes e câncer (Aggarwal *et al*, 2006; Medzhitov, 2010). Como consequência do estresse oxidativo gerado, a inflamação crônica leva a uma excessiva remodelação tecidual e modificações ao DNA e proteínas, aumentando os riscos para o desenvolvimento do câncer (Visser *et al*, 2006) (Figura 3).

Figura 3 – Fatores de risco ambientais para o surgimento de câncer através do estabelecimento de processo inflamatório



Fatores de risco ambientais para o surgimento de câncer através do estabelecimento de processo inflamatório. Diversos estímulos do ambiente levam a liberação de mediadores pró-inflamatórios e ativação de fatores de transcrição que vão gerar uma resposta inflamatória aguda, terapêutica. Se essa resposta não for resolvida, ela se tornará crônica e patológica, favorecendo o desenvolvimento tumoral. Adaptado de Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol*, 72: 1605-21.

Além das doenças inflamatórias serem fatores de risco para o desenvolvimento do câncer, existe outras evidências da relação câncer-inflamação mesmo em tumores não originários de processos inflamatórios crônicos. Hanahan & Weinberg, em sua revisão sobre os *hallmarks* do câncer, incluem a inflamação como um *hallmark* facilitador, que contribui com o desenvolvimento tumoral, pois esse processo supre o microambiente tumoral com moléculas bioativas como fatores de crescimento, de sobrevivência, pró-angiogênicos, enzimas que modificam a matriz extracelular, entre outros (Hanahan & Weinberg, 2011). Outra evidência acerca dessa relação é o fato de que o uso prolongado de AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais) tem sido associado à redução de risco para o desenvolvimento de vários tipos de câncer, havendo inclusive diversas triagens clínicas

randomizadas que mostram esse efeito preventivo ou protetor em casos de câncer de cólon, mama, próstata e pulmão (Sandler *et al*, 2003; Schetter *et al*, 2010; Wang & Dubois, 2010).

Um dos tipos de câncer mais influenciados pelo ambiente inflamatório é o câncer colorretal (CCR), sendo o terceiro tipo mais comum em homens e mulheres e a terceira causa de mortalidade por câncer nos Estados Unidos (Cheung *et al*, 2010). No Brasil a estimativa para este tipo de câncer é de 30.000 novos casos em 2012 (INCA, 2012). Dentre os fatores de risco para o CCR estão as doenças inflamatórias intestinais do cólon, como a retocolite ulcerativa crônica e a Doença de Crohn, as quais compartilham diversas características inflamatórias incluindo ativação imune, infiltração leucocitária no tecido colônico e aumento da densidade vascular (Cromer *et al*, 2011).

A relação câncer-inflamação tem duas vias: uma extrínseca, onde as condições inflamatórias facilitam o desenvolvimento do câncer e uma intrínseca, onde as próprias células tumorais estimulam o início do processo inflamatório, estabelecendo assim um microambiente favorável ao desenvolvimento tumoral. É por essa razão que, independente da origem do tumor, sempre existem células inflamatórias ao seu redor (Colotta *et al*, 2009; Schetter *et al*, 2010).

Todos esses processos orquestrados pelas células tumorais em seu microambiente representam uma barreira para o sistema imune, ou seja, as células tumorais não são alvos passivos do sistema imune hospedeiro. Ao contrário, as células imunes ali presentes não apenas deixam de exercer suas funções antitumorais, mas também passam a promover o desenvolvimento tumoral (Whiteside, 2008). O estroma tumoral é constituído de fibroblastos/miofibroblastos, células epiteliais, células do sistema imune, do sistema vascular, da musculatura lisa, além dos componentes da matriz extracelular. Todas elas originalmente não são malignas, mas devido às características do meio onde se encontram, adquirem um fenótipo anormal que proporciona funções alteradas, levando ao crescimento e proliferação exacerbada do tumor (Li *et al*, 2007). Dessa forma, o ambiente tumoral oferece múltiplos alvos para a terapia anticâncer, entre eles a inflamação associada ao tumor (Li *et al*, 2007).

Considerando que o microambiente é um componente determinante na formação e manutenção tumoral, o entendimento de seu papel na tumorigênese poderá auxiliar na

transposição desses conhecimentos para a clínica. Dessa forma, o co-tratamento com drogas que modifiquem o ambiente tumoral pode promover uma resposta adjuvante com os quimioterápicos que atuam em alvos específicos (Bissel & Hines, 2011).

A maioria dos agentes antineoplásicos utilizados atualmente possui poder antiproliferativo, ou seja, atua sobre a divisão celular. Com isso, tendem a afetar não somente as células tumorais, mas também outras células de proliferação rápida, acarretando em efeitos tóxicos para células normais, tais como: mielossupressão (toxicidade da medula óssea), cicatrização deficiente de feridas, queda de cabelos, lesão do epitélio gastrointestinal, esterilidade, teratogênese (Rang *et al*, 2004). Portanto, é importante que o foco da quimioterapia não se detenha às células tumorais e a seus mecanismos de divisão e proliferação, mas que englobe outros contextos.

Recentemente diversos estudos propõem terapias combinatórias que enfocam não apenas o tumor propriamente dito, mas também o papel do microambiente em vários tipos de câncer. Algumas dessas terapias já foram aprovadas pelo FDA (US Food and Drug Administration) para o tratamento de diversos cânceres, como inibidores de angiogênese (Avastin®) e o anti-inflamatório Celebra®, inibidor de COX-2, utilizado em estudos clínicos de fase II como adjuvante no tratamento de câncer de próstata e pâncreas, por suprimir o crescimento de vasos (Bissel & Hines, 2011). Cada vez mais o conceito de terapia multi-alvo se destaca, para atingir tanto o tumor propriamente dito quanto seu ambiente.

A história da quimioterapia já viveu vários capítulos. Nos anos 1890 foram descobertos os raios-x e as radiações ionizantes, permitindo o uso da radioterapia no tratamento do câncer. Em 1940 se observou que mostardas nitrogenadas, utilizadas como armas de guerra, levavam à regressão de linfoma não-Hodgkin por reagirem quimicamente com o DNA. Nesta mesma época também foi descoberta a ação dos antifolatos e na sequência houve o surgimento do Programa Nacional de Quimioterapia do Instituto Nacional do Câncer (NCI) nos Estados Unidos em 1955. Em 1959 o FDA aprova o agente alquilante ciclofosfamida e em 1970 ocorre a cura de linfomas com terapias combinatórias. Em 1975 uma combinação de ciclofosfamida, metotrexato e fluoracila (CMF) se mostra efetiva no tratamento adjuvante para câncer de mama, descoberta seguida pela aprovação

da cisplatina no tratamento de câncer de ovário e de outros tumores sólidos. Em 1989 o NCI introduz a triagem usando 60 linhagens celulares derivadas de diferentes tipos de tumores humanos e em 1992 o FDA aprova o taxol. Em 2001 surge o Glivec®, seguido do Avastin®, agentes anti-angiogênicos para o tratamento de câncer de cólon (Chabner & Roberts Jr., 2005; DeVita & Chu, 2008).

Como frutos dessa história, os principais agentes antineoplásicos podem ser divididos nas seguintes categorias: agentes alquilantes (ciclofosfamida, cisplatina), antimetabólitos (metotrexato, 5-fluorouracil), antibióticos citotóxicos (doxorrubicina, bleomicina) e derivados vegetais (alcalóides da vinca, taxanos, etoposida, campotecinas) (Rang *et al.*, 2004).

2 - A busca por agentes anticâncer e os produtos naturais

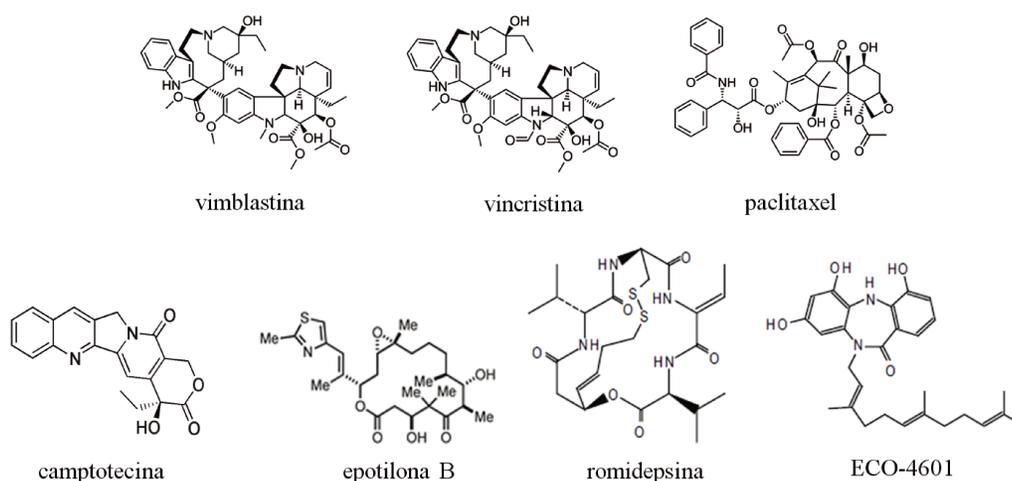
A natureza tem sido fonte de produtos medicinais há milênios, acompanhando a história da humanidade. Com o aperfeiçoamento dos métodos de isolamento, identificação e síntese, durante o último século muitas drogas foram desenvolvidas a partir de fontes naturais, particularmente de espécies vegetais (Cragg & Newman, 2009).

É difícil datar o início do uso de drogas no tratamento do câncer, pois ervas e outras preparações eram usadas para esse fim desde a antiguidade (Baguley, 2002). Hartwell, em sua revisão em 1982, lista mais de 3000 plantas usadas no tratamento do câncer (apud Cragg & Newman, 2009). Como consequência, mais de 60% dos agentes anticâncer utilizados hoje são provenientes de produtos naturais, incluindo plantas, microorganismos e organismos marinhos (Cragg & Newman, 2005).

Os agentes anticâncer provenientes de produtos naturais mais utilizados na clínica pertencem a quatro classes principais, incluindo derivados sintéticos ou semi-sintéticos: alcalóides da *Vinca* – vinblastina e vincristina (*Catharanthus roseus* G.Don.), epipodofilotoxinas de *Podophyllum peltatum* L., taxanos de *Taxus brevifolia* Nutt e camptotecinas de *Camptotheca acuminata* Decne (Balunas *et al.*, 2006). Em geral essas substâncias atuam em eventos relacionados ao DNA e à divisão celular, impedindo a formação do fuso mitótico e sua polimerização (vinblastina, vincristina, taxanos), inibindo a

ação das topoisomerasas e então o processo de replicação do DNA (camptotecinas, etoposídeos) (Rang *et al*, 2004). Hoje, outras classes de produtos naturais, tais como bastétias, já se encontram em fase de testes clínicos, como a epotilona B de *Sorangium cellulosum*, a romidepsina da *Chromobacterium violaceum* e a dibenzodiazepina ECO-4601, da *Micromonospora* sp (Gordaliza, 2007) (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura química de alguns compostos isolados de produtos naturais empregados em testes clínicos



Esses exemplos demonstram que os produtos naturais constituem uma das principais fontes de drogas efetivas no tratamento do câncer e muitas vezes os compostos não são utilizados tal e qual como são isolados, mas inspiram o desenvolvimento de novos agentes potenciais (Cragg & Newman, 2005). O desenvolvimento da quimioterapia e química analítica na primeira metade do século 20 permitiu que compostos fossem isolados de uma variedade de plantas, animais e microorganismos (Baguley, 2002). O advento da química orgânica sintética permitiu que compostos isolados de produtos naturais fossem sintetizados em larga escala ou utilizados como protótipos para a síntese de derivados a fim de aperfeiçoar propriedades físico-químicas, refletindo em melhor solubilidade, distribuição e farmacocinética (Denny, 2002; Gordaliza, 2007).

Um dos motivos que faz dos produtos naturais fontes ricas de compostos com potencial terapêutico é que grande parte deles são metabólitos secundários produzidos por organismos para defesa contra predação e também para comunicação, sendo muitas vezes tóxicos e, portanto, com potenciais antiproliferativos ou irritativos (Cragg *et al*, 2009). Outra característica desses metabólitos secundários é que em geral são evolutivamente selecionados para se ligarem a macromoléculas, representando, portanto, estruturas privilegiadas, que são excelentes moldes (*templates*) para a síntese de novas moléculas (Denny, 2002). Nesse sentido, estudos de estrutura-atividade são realizados para aperfeiçoar a produção dessas novas moléculas (Cragg *et al*, 2009).

Um dos pioneiros na busca de drogas anticâncer de origem natural é o NCI-USA (National Cancer Institute-USA), que em 1955 iniciou seus trabalhos de triagem, em modelos experimentais de leucemias murinas (L1210 e P388). Após 1975 a triagem passou a ser realizada em dois estágios: no primeiro as drogas eram selecionadas através de modelo de leucemia murina (P388) e no segundo passavam por modelos utilizando animais imunodeficientes, com implante de células tumorais humanas. Nessa segunda etapa eram utilizadas de quatro a oito linhagens humanas. Durante o período 1955 – 1985 foram avaliadas cerca de 600 mil substâncias que resultaram na maioria das drogas que hoje são utilizadas na quimioterapia do câncer (Chabner & Roberts, 2005; Shoemaker, 2006).

A análise dos resultados obtidos pelos métodos de triagem utilizados até 1985 revelou que as maiorias das drogas desenvolvidas até o momento eram úteis em tumores de crescimento rápido, como as leucemias e linfomas. Realmente o sucesso da quimioterapia é maior quando os tumores pertencem ao sistema hematopoiético, enquanto que para os tumores sólidos as alternativas são escassas. Dessa forma ficou evidente a necessidade de modelos para a triagem de drogas para tumores sólidos utilizando células originárias de câncer humano *in vitro* como forma de triagem inicial (Skehan *et al*, 1990; Cragg & Newman, 1999).

Com o aprimoramento da metodologia de cultura de células foi possível o cultivo de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, que possibilitaram o desenvolvimento da metodologia para triagem *in vitro*. Com esse objetivo, o NCI desenvolveu um painel de células que atualmente conta com 60 linhagens provenientes de

nove tipos de tumores humanos: leucemia, cólon, mama, rim, cérebro, melanoma, ovário, pulmão e próstata (Shoemaker, 2006). Dessa forma pode-se avaliar um número elevado de drogas em diferentes tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de compostos com maior especificidade (Baguley *et al*, 2002). Desde o surgimento desse programa, o NCI testou cerca de 100.000 compostos puros e 50.000 extratos vegetais (Holbeck *et al*, 2010).

Baseado nessa metodologia de *screening*, a Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA-Unicamp possui um painel com 10 linhagens tumorais humanas de diferentes origens teciduais, cedidas pelo NCI (Tabela 1). O objetivo do *screening in vitro* é a busca por compostos que sejam capazes de inibir a proliferação de células tumorais *in vitro*, direcionando os compostos ativos para estudos em modelos experimentais de câncer em animais de laboratório (*in vivo*).

A atividade antiproliferativa sobre células tumorais observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente numa atividade *in vivo*, pois a complexidade da biologia dos tumores criada pelas relações com o estroma dita que a resposta a drogas ativas em cultura pura de células tumorais se proliferando *in vitro* muitas vezes falha em prever sua resposta em tumores em crescimento *in vivo* (Weinberg, 2008). Esse último modelo permite a obtenção de informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica dos compostos testados. Portanto, um estudo combinado desses dois modelos é muito indicado para melhor conclusão a respeito do potencial anticâncer de uma nova substância (Smith *et al*, 2005).

Tabela 1 - Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* (adaptado de Monteiro, 2012).

Sigla	Nome	Características
U251 ^a	glioblastoma	Expressa GFAP e vimentina ¹ .
MCF-7 ^a	adenocarcinoma de mama	Produz proteínas insulina <i>like</i> (liga fatores de crescimento) e superexpressa gene P2P-R; TNF- α inibe seu crescimento.
NCI-ADR/ RES ^b	adenocarcinoma de ovário resistente a multidroga	Perdeu o receptor de estrógeno; expressa elevados níveis do gene resistência multidroga (MDR1) traduzindo para glicoproteína-P que confere essa capacidade; proto-oncogene Raf-1 pode estar envolvido na regulação da resistência às drogas.
NIH: OVCAR-3 ^b	adenocarcinoma de ovário	Possui receptores de estrógeno, andrógeno e progesterona e poucos cromossomos normais; adequada para estudos de câncer ovariano e avaliação da terapia hormonal; produção elevada da enzima 24-OHase e baixa de 1- α OHase.
PC-3 ^b	adenocarcinoma de próstata	Baixa atividade de fosfatase ácida e 5- α redutase; sem cromossomo Y normal detectado; é uma das 3 linhagens clássicas de tumores prostáticos.
786-O ^b	adenocarcinoma de rim	Produz peptídeo semelhante em forma e ação ao hormônio paratireoidiano; mutações no gene HVL e da prolina oxidase propiciam a formação do tumor.
K-562* ^c	leucemia mielóide crônica	Células altamente indiferenciadas (blastos multipotentes) que podem se diferenciar em progenitores das séries eritrocítica, granulocítica e monocítica; há o gene fusionado Bcr-abl impedindo sua apoptose.
UACC-62** ^a	Melanoma	Originária de melanócitos.
HT-29 ^d	adenocarcinoma colorretal	Possui microvilos, microfilamentos, mitocôndrias vacuolizadas e densas, expressão elevada de receptores de uroquinase e antígenos p53, mutações pró-tumorais no gene APC (<i>adenomatous polyposis coli</i>) e COX-2.
NCI-H460 ^d	Adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células	Expressa elevados níveis de COX-2 que se associam ao fenótipo invasivo e metastático; com características de células endócrinas pulmonares altamente diferenciadas; é deficiente em fator-1 de ativação da protease do citocromo c apoptótico.

Tecido de Origem: ^aEctoderme; ^bMesoderme; ^cMesênquima; ^dEndoderme. Todas as células crescem aderidas, exceto a K-562*, que fica em suspensão. Todas as linhagens apresentam morfologia epitelial, à exceção da K-562* (morfologia linfoblástica) e UACC-62** (morfologia fibroblástica). ¹Disponível online no site do CLS: http://www.cell-lines-service.de/content/e143/e148/e3845/index_eng.html Consultado dia 19/03/2012.

Diversos modelos *in vivo* de estudo do câncer são realizados atualmente, através do inoculo de células tumorais em animais de laboratório, dentre elas a linhagem de melanoma murino B16-F10, que provoca metástase no pulmão quando injetada diretamente na corrente sanguínea do animal ou se desenvolve na forma sólida quando inoculada no subcutâneo (Yao *et al*, 2007; Teng *et al*, 2011). Amplamente utilizado, o tumor de Ehrlich, tumor murino, transplantável, originado de um adenocarcinoma mamário, é de crescimento rápido, capaz de se desenvolver tanto na forma ascítica quanto na forma sólida (Segura *et al*, 2000; Oloris *et al*, 2002; Nascimento *et al*, 2006; Gomes *et al*, 2008). A vantagem de utilizar tumores transplantáveis está no desenvolvimento rápido e assim na redução no tempo de estudo. Além disso, o tumor de Ehrlich gera uma resposta inflamatória importante; segundo Fecchio *et al* (1990), a presença de células tumorais de Ehrlich promove um aumento nos níveis de prostaglandina E₂, sugerindo uma relação entre câncer e inflamação.

Os dois exemplos citados tratam de tumores murinos, mas existem outros modelos que se baseiam no implante de células tumorais humanas no animal. Uma dessas metodologias que é amplamente realizada no NCI é o modelo de *Hollow fiber* (fibras vasadas), que consiste no implante de fibras de polivinilideno no peritônio e subcutâneo do animal, contendo células tumorais humanas. Esse modelo tem feito a ponte entre a triagem *in vitro* e os testes em modelo xenográfico, por ser rápido e permitir a análise do desenvolvimento de células tumorais humanas em animais imunocompetentes, predizendo assim quais compostos ativos *in vitro* têm mais chances de terem sucesso *in vivo*, além de fornecer dados acerca da biodisponibilidade dos compostos (Hollingshead *et al*, 1995; Mi *et al*, 2009).

Outro modelo utilizado é o tumor xenográfico: implante de células tumorais humanas em animais imunodeficientes, porém é deficiente no sentido de que não há interferência do sistema imune hospedeiro, não traduzindo as condições reais de desenvolvimento tumoral. Uma alternativa para o modelo xenográfico seria o uso de animais modificados geneticamente, que desenvolvam o tumor espontaneamente ou que respondam à indução de câncer por carcinógenos químicos, irradiação ou hormônios, pois assim há a resposta imune do hospedeiro. Um modelo animal ideal deveria ter mecanismos

moleculares semelhantes aos apresentados em tumores humanos, patologia similar, apresentar progressão neoplásica incluindo mudanças metastáticas, que houvesse resposta imune do hospedeiro e que as respostas terapêuticas se aproximassem com a dos pacientes humanos (HogenEsch & Nikitin, 2012).

Aliada à avaliação de eficácia em modelos *in vivo* está a avaliação acerca da toxicidade e mecanismos de ação dos novos compostos. Assim, em tempos de “*target therapy*”, quando se procura alvos conhecidos nos diferentes tipos de tumores, a análise dos tipos de morte celular produzidas, as modificações histopatológicas e a maneira como o composto orchestra sua resposta nos diferentes modelos utilizados são de extrema importância (DeVita & Chu, 2008; HogenEsch & Nikitin, 2012).

Além disso, a toxicidade apresentada pela maioria das drogas disponíveis na quimioterapia do câncer é um dos maiores desafios para o desenvolvimento de novos quimioterápicos, que visam índices terapêuticos maiores e maior seletividade para as linhagens tumorais (Weinberg, 2008). Dessa forma, se faz extremamente necessária a busca de drogas que apresentem poucos efeitos adversos, com melhores índices terapêuticos.

Na busca de novos agentes anticâncer a interdisciplinaridade é essencial, a fim de que as diferentes questões e necessidades existentes nesse processo sejam atendidas. É a fitoquímica e a química orgânica e medicinal produzindo compostos, são os testes biológicos direcionando a busca e produção de compostos, são as análises dos mecanismos de ação complementando e dando respostas, delineando hipóteses. É posteriormente a medicina translacional, fazendo a ponte entre a bancada e o paciente. Há muito trabalho a ser feito e ainda muito que se descobrir.

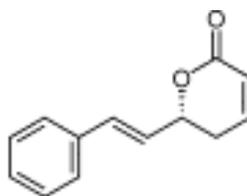
3 - A Goniotalamina

A consolidação das metodologias *in vitro* e *in vivo* pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA possibilitou, além da interação com as outras divisões do Centro, a realização de trabalhos em colaboração com outras unidades da Unicamp e com outras Instituições de Pesquisas Nacionais e Internacionais. Em uma dessas parcerias, a estabelecida com o Prof. Dr. Ronaldo A. Pilli, (Instituto de Química-Unicamp) avaliou-se a

influencia da configuração absoluta do centro estereogênico presente na goniotalamina, um dos compostos presentes em espécies do gênero *Goniothalamus*. Essa substância é alvo de estudo em nosso grupo desde 2004, quando se propôs que a atividade citotóxica desses compostos está possivelmente associada à sua ação como acceptor de Michael frente a biomoléculas com sítios nucleofílicos como resíduos de lisina, serina, treonina, tirosina ou cisteína. Com a finalidade de avançar nos estudos com a goniotalamina em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer, bem como propor hipóteses acerca de seu mecanismo de ação, a goniotalamina foi o foco desse trabalho de doutorado.

Estiril-lactonas são compostos de baixo peso molecular que compreendem um grupo de metabólitos secundários comumente isolados de plantas do gênero *Goniothalamus* (Annonaceae), amplamente investigados por suas atividades farmacológicas, especialmente propriedades citotóxicas e antitumorais (Inayat-Hussain *et al*, 2003; Wiart, 2007; de Fátima *et al*, 2008;). A estiril-lactona estruturalmente mais simples é a goniotalamina (GTN) (Figura 5), cuja forma natural tem configuração (*R*), sendo considerada o precursor biogênico de outras lactonas de estruturas semelhantes, como o goniodiol, goniotirol, howiinol A (Dumitrescu *et al*, 2010).

Figura 5 - Estrutura da (*R*)- goniotalamina, forma enantiomérica natural



O enantiômero natural (*R*)-GTN, isolado pela primeira vez em 1967, foi avaliado para uma variedade de atividades biológicas, como antimicrobiana, larvicida, anti-inflamatória e antifúngica (Dumitrescu *et al*, 2010). Além disso, (*R*)-GTN apresenta atividade antiproliferativa contra diversas linhagens tumorais, incluindo uterina cervical (HeLa), gástrica (HGC-27), renal (786-0), carcinomas mamários (MCF-7, T47D e MDA-MB-231), leucemias (HL-60, Jurkat e CEM-SS) e carcinoma hepatocelular (Pihie *et al*,

1998; Inayat-Hussain *et al*, 1999 e 2003; de Fátima *et al*, 2005 e 2008; Rajab *et al*, 2005; Chen *et al*, 2005).

Quanto aos mecanismos de ação, alguns estudos revelam que a lactona é o grupo farmacofórico desse composto, conferindo ação citotóxica e pró-apoptótica (Wiert, 2007). De fato, as estiril-lactonas são altamente reativas na presença de biomoléculas contendo aminoácidos nucleofílicos ou resíduos de guanina, pois apresentam a δ -lactona α,β -insaturada que atua como acceptor de Michael nessas condições (Barcelos *et al*, 2012).

Alguns trabalhos demonstram a atividade pró-apoptótica de (*R*)-GTN incluindo aumento da expressão das caspases 9, 3 e 7, da proteína pró-apoptótica Bax, inibição de NOS (óxido-nítrico sintase) constitutiva e inibição do transporte núcleo-citoplasma mediado por CRM1 (de Fátima *et al*, 2008; Inayat-Hussain *et al*, 1999 e 2003 e Wach *et al*, 2010). Há também evidências de que a goniotalamina causa danos ao DNA, levando a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que dispara a cascata apoptótica intrínseca (Inayat-Hussain *et al*, 2010).

Anteriormente em nosso grupo foi realizada a síntese da (*S*)-GTN, isômero não natural, que também apresenta atividade antiproliferativa contra diversas linhagens tumorais, com seletividade para linhagem renal 786-0 e de ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES) (de Fátima *et al*, 2006 e 2008). Na linhagem 786-0, (*S*)-GTN leva à inibição das formas constitutiva, induzida e endotelial da NOS, com indução de apoptose e aumento de expressão da proteína LC3, envolvida em processos autofágicos (de Fátima *et al*, 2008).

Apesar de existirem alguns estudos relacionados à atividade *in vitro* de (*R*)- e (*S*)-GTN, incluindo propostas para seu mecanismo de ação, pouco se conhece sobre o perfil de atividade dessas moléculas em modelos animais de câncer (*in vivo*). Levando-se em consideração os resultados já obtidos com os estudos *in vitro* e o fato de moléculas acceptoras de Michael (ou eletrofílicas) serem altamente reativas frente a outras biomoléculas, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade da goniotalamina em modelos farmacológicos (*in vivo*) de câncer, inflamação, dor, bem como determinar o tipo de morte celular induzido por esse composto.

Objetivos

Objetivos

1 - Objetivo Geral

Avaliar a atividade farmacológica da goniotalamina em modelos experimentais de câncer e inflamação.

2 - Objetivos específicos

1. Produzir goniotalamina nas suas formas enantioméricas e racêmica em quantidades suficientes para estudos experimentais de média duração *in vivo*
2. Avaliar os parâmetros celulares envolvidos na atividade antiproliferativa *in vitro* por citometria de fluxo;
3. Avaliar a atividade anticâncer *in vivo* em modelos experimentais utilizando as linhagens de Ehrlich e de melanoma B16-F10;
4. Avaliar a atividade farmacológica da goniotalamina em modelo de edema de pata e de nocicepção induzida por processos inflamatórios;
5. Avaliar a atividade farmacológica e determinar o mecanismo de ação da goniotalamina em modelos de colite aguda e crônica.

Metodologia

Metodologia

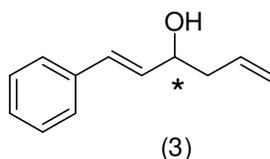
1 – Síntese da goniotalamina

1.1 - Síntese de (R)- e (S)- Goniotalamina

A síntese de (R)- e (S)- Goniotalamina foi realizada no Instituto de Química – UNICAMP no período de 02/2008 a 02/2010, sob orientação do Prof. Ronaldo Aloise Pilli e da então mestranda Cilene Marquissolo.

1.1.1 - Preparação do (4R) e do (4S)-1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno

Figura 6 - (4R) ou (4S)-1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno

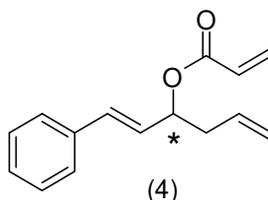


A uma solução de 80,2 mg (0,280 mmol) de (R)- ou (S)-BINOL (1,1'-Bi-2-naphthol) em 2,80 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) sob agitação, adicionou-se peneira molecular 4 Å (pulverizada e ativada em forno a 120°C por vários dias) e 83,5µL (0,280 mmol) de tetraisopropóxido de titânio ($\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$) a temperatura ambiente, resultando numa solução alaranjada. Aqueceu-se a reação até temperatura de refluxo, onde permaneceu por 1 h, tornando-se amarronzada. Em seguida, resfriou-se a mistura até temperatura ambiente e adicionou-se 510,0 mg (2,82 mmol) de *trans*-cinamaldeído. Após 5 min de agitação a reação foi resfriada a -78 °C e adicionou-se 1,06 mL (3,38 mmol) de aliltributilestanana. A mistura foi então colocada sob agitação magnética a -20°C por 60 h. Transcorrido este período a reação foi tratada com 30 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 30 mL de CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi extraída

com 3 porções de 30 mL de CH₂Cl₂. As fases orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de magnésio (MgSO₄) anidro, o solvente foi evaporado e o bruto da reação foi purificado por cromatografia em coluna com sílica *flash*, empregando-se a mistura hexano:acetato de etila (4:1) como eluente. O (4*R*) ou (4*S*)-1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno (**3**) (Figura 6) foi obtido em 70% de rendimento e >95% de excesso enantiomérico.

1.1.2 – Preparação do (4*R*) e do (4*S*)-prop-2-enoato de 1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno

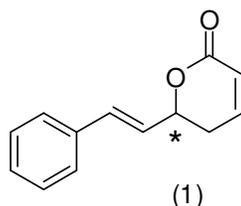
Figura 7 - (4*R*) ou (4*S*)-prop-2-enoato de 1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno



A uma solução de 548,0 mg (2,46 mmol) do álcool (4*R*) ou (4*S*)-1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno em 2,5 mL de CH₂Cl₂ a 0 °C adicionou-se 0,36 mL (4,44 mmol) de cloreto de acrilóila. Sob banho de gelo, 1,25 mL (8,87 mmol) de trietilamina (Et₃N) foram adicionados gota a gota. O sistema foi aquecido até temperatura ambiente e após 2h a reação foi extraída com 10mL de solução saturada de cloreto de amônio (NH₄Cl) e 10mL de CH₂Cl₂. A fase orgânica foi separada e a aquosa foi extraída com (3x10 mL) de CH₂Cl₂. As fases orgânicas foram secas com MgSO₄ anidro, filtradas e concentradas. O produto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica *flash*, empregando-se a mistura hexano:acetato 9:1 como eluente. O (4*R*) ou (4*S*)-prop-2-enoato de 6-fenil-hex-1,5-dieno (**4**) (Figura 7) foi obtido em 69% de rendimento.

1.1.3 - Preparação da (R)- e da (S)-goniotalamina

Figura 8 - (R)- e (S)-goniotalamina (GTN)



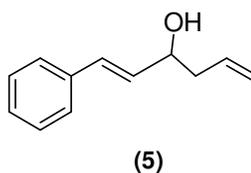
Uma solução de 236,5mg (0,997 mmol) do acrilato (4R) ou (4S)-prop-2-enoato de 1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno em 100mL de CH₂Cl₂ foi submetida à temperatura de refluxo. Posteriormente foram adicionados 82mg (0,099mmol ou 10 mol%) de uma solução do catalisador de Grubbs de 1^a geração (dicloreto de *bis* (tricicloexilfosfino) benzilideno de rutênio) em 25mL de CH₂Cl₂. A mistura ficou sob aquecimento por 4 horas. Após esse período o sistema foi resfriado, o bruto foi evaporado e purificado por cromatografia em coluna com sílica *flash*, empregando-se a mistura hexano:acetato de etila 1:1 como eluente. A (R) ou (S)-goniotalamina (1) ou (GTN) (Figura 8) foi obtida em 80% de rendimento.

1.2 – Síntese do racemato de goniotalamina (*rac*-GTN)

A síntese de *rac*-GTN envolve alilação do *trans*-cinamaldeído com brometo de alilmagnésio em substituição à alilação enantioselectiva, seguida de esterificação com cloreto de acrilóila e Et₃N e finalizada com reação de metátese de olefinas com catalisador de Grubbs de 1^a geração. A síntese foi realizada no Instituto de Química –UNICAMP no período de 02/2010 a 09/2010, sob orientação do Prof. Ronaldo Aloise Pilli e do então doutorando Ilton Barros Daltro de Castro.

1.2.1- Preparação do 1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno

Figura 9 - 1-fenil-3-hidroxi-hexa-1,5-dieno



A uma solução de 3964,8 mg (30,0 mmol) de *trans*-cinamaldeído em tetrahidrofurano (THF) anidro (60 mL), a -78°C e sob atmosfera de N_2 , foi adicionada uma solução de brometo de alilmagnésio em éter etílico (Et_2O) (1,2 equiv.; 36,0 mmol). A mistura foi mantida sob estas condições por 1 hora. Após este período, a mistura foi aquecida à temperatura ambiente e adicionou-se 25,0 mL de solução saturada de NH_4Cl , para tratamento da reação. As fases foram separadas e a aquosa extraída com Et_2O (3x20mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com MgSO_4 anidro, filtradas e concentradas. O bruto da reação foi submetido à cromatografia em coluna *flash* (eluente hexano:acetato de etila 4:1) para fornecer o álcool **5** (Figura 9) em 95% de rendimento.

As etapas seguintes (esterificação e metátese de olefinas para fechamento de anel) foram realizadas seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para a síntese assimétrica.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) foram obtidos no equipamento Bruker Avance (250 MHz para ^1H e 62,5 MHz para ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelo sinal de clorofórmio deuterado em 7,26 ppm para RMN de ^1H e 77,0 ppm para o RMN de ^{13}C . Os pontos de fusão foram obtidos em um equipamento Electrothermal 9100 e foram não-corrigidos.

2 – Ensaios *in vitro*

2.1 – Células

As linhagens tumorais humanas foram cedidas pelo NCI, Frederick-MA, EUA e mantidas em condições estéreis (Tabela 2).

Tabela 2 - Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas DI. * DI: densidade de inoculação

Linhagem Celular	Nome	DI* (x 10 ⁴ células/mL)
Pulmão	NCI-H460	4,0
Mama	MCF-7	6,0
Ovário com fenótipo de resistência multidrogas	NCI-ADR/ RES	5,0
Cólon	HT-29	5,0
Próstata	PC-3	4,5
Melanoma	UACC-62	4,0
Ovário	OVCAR-3	7,0
Renal	786-0	5,0
Glia	U251	4,0
Queratinócito humano*	HaCat	4,0
Fibroblasto renal de macaco verde*	Vero	4,0
Melanoma murino	B16-F10	4,0

* *linhagens não tumorais*

2.2 – Cultivo celular

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos de 25cm² (T25) com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB – Gibco®) a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂. Quando a monocamada celular atingia cerca de 80% de confluência, as linhagens eram repicadas, o que ocorria geralmente uma vez por semana.

Para linhagens aderidas, o desprendimento celular foi realizado mediante ação enzimática da tripsina. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado, o frasco lavado com 500

μL de tampão de Hank's (Sigma®) para eliminar resíduos de meio de cultura e após aspiração do tampão foram adicionados 500 μL de tripsina-EDTA 2,5 g/L (Vitrocell®), a 37°C, até que as células se soltassem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada com RPMI + SFB 5% e uma alíquota dessa suspensão foi transferida aos novos frascos, completando-se o volume para 5 mL.

2.2.1 Descongelamento das células

O descongelamento das células foi realizado sempre que houve necessidade de renovação ou obtenção de células em passagem adequada para os experimentos. Para tanto, os criotubos foram descongelados à temperatura ambiente, seu conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL e, para lavagem do glicerol utilizado no congelamento, teve o seu volume completado para 10 mL com meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®) contendo 5% SFB (Gibco®). O tubo foi centrifugado a 2000 rpm por 4 minutos a 4°C, o sobrenadante foi aspirado e descartado e o precipitado de células foi ressuspensionado cuidadosamente em 5 mL do meio de cultura descrito. A suspensão foi então transferida para frascos de manutenção de T25 e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

2.2.2 Congelamento das células

Para sua expansão as células foram cultivadas em frascos de 75cm² (T75) e o volume final de suspensão celular a ser congelado foi sempre de 1x10⁶ cel/mL. Para células aderidas, após tripsinização com tripsina/EDTA (Sigma®), as células foram ressuspensionadas em 10 mL de meio suplementado com 30% de SFB, procedido pela contagem do número de células em câmara de Neubauer. A suspensão celular foi centrifugada a 2000rpm, por 4 minutos à 4°C, o sobrenadante foi aspirado e, a seguir, foi adicionado meio RPMI com 30% de SFB e 20% de glicerol em volume calculado para obtenção de uma concentração final de 1x10⁶ cel/mL. Cada criotubo contendo 1 mL da solução celular foi colocado na fase gasosa do nitrogênio líquido por 24 horas, para depois serem imersos na fase líquida.

2.3 - Atividade antiproliferativa em cultura de células

2.3.1 Aplicação das células

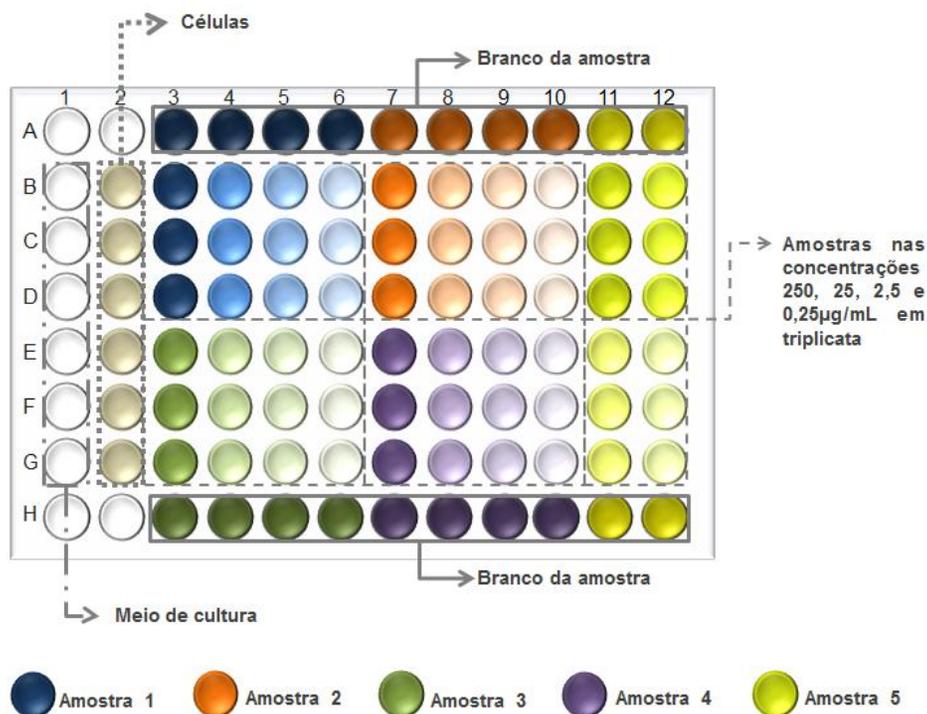
No primeiro dia de experimento, a suspensão celular foi preparada com meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L) e ajustada em sua respectiva densidade de inoculação. Foram aplicados 100µl de suspensão celular em placas de 96 compartimentos, que foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Foi também preparada uma placa controle (placa T₀), que continha todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

2.3.2 Preparo e aplicação das amostras

As formas enantioméricas puras e o racemato da goniotalamina foram diluídos em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1g/mL. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas em pelo menos 400 vezes em RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L), o que evita a toxicidade do DMSO. As amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, (100 µL/compartimento) em triplicata, e a seguir foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido (Figura 10). Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata.

No experimento realizado com B16-F10, a *rac*-GTN foi adicionada à placa nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 126 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata.

Figura 10 - Placa de 96 compartimentos utilizada nos testes de atividade antiproliferativa



Placa de 96 compartimentos usada nos testes de atividade antiproliferativa, mostrando a disposição e concentrações das amostras, o branco das amostras (aplica-se somente a amostra nas diferentes concentrações), das células (aplica-se somente células) e do meio de cultura (aplica-se somente meio de cultura).

No momento de adição das amostras, as células inoculadas na placa controle T_0 foram fixadas com a adição de 50 μL /compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma®) para determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas, sendo este o valor basal 0. O TCA atua como um fixador, precipitando proteínas. Células viáveis se mantêm fixas na placa, enquanto células não viáveis se desprendem, sendo lavadas.

Após 48 horas de tratamento as células foram fixadas com 50 μL de TCA a 50% e incubadas por 1 hora a 4°C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e

metabólitos secundários e a seguir foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. No experimento com B16-F10 a fixação das células ocorreu após 24 horas de tratamento.

Após a secagem, foram adicionados 50µL/compartimento do corante protéico sulforrodamina B (SRB) (Sigma®) a 0,4 % (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1 % e a seguir as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. As placas foram então lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% e após secagem completa à temperatura ambiente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150µL/compartimento de Trizma Base (10µM, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

A sulforrodamina B é um corante protéico que se liga aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade antiproliferativa da amostra em teste, pois há mais células viáveis (Skehan *et al*, 1990; Rubistein *et al*, 1990; Monks *et al*, 1991).

2.3.3 Análise dos resultados

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e através das fórmulas a seguir, foi determinada a porcentagem de crescimento de cada amostra testada.

Se $T > C$, a amostra estimulou o crescimento.

Se $T \geq T_0$ e $< C$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$.

Se $T < T_0$ a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0) / (T_0)]$.

Sendo T a média da absorbância da célula tratada, C o controle de célula e T_0 o controle das células no dia da adição das amostras.

O resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de crescimento. Os dados de absorbância foram analisados e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50%.

Utilizando-se o *software* Origin[®], realizou-se a regressão linear dos dados obtidos com as médias da porcentagem de crescimento e foram calculados os seguintes parâmetros:

- TGI (*total growth inhibition*): a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular ($T=T_0$). Esse parâmetro é utilizado para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade.

- LC₅₀ (*lethal concentration 50%*): a concentração necessária para matar 50% das células.

2.4 – Influência da goniotalamina no crescimento da linhagem MCF-7 sob estímulo estrogênico (E-screen)

As células (MCF-7) foram inoculadas em placas de 96 compartimentos na densidade de $4,0 \times 10^4$ /mL e após 24 horas foram expostas a concentrações crescentes de (R)-, (S)- goniotalamina ou Tamoxifeno (TAM) (Sigma[®]), na presença e na ausência de 17- β estradiol (1nM). As células foram incubadas por 144 horas e a atividade determinada através do método da sulforrodamina B (Soto *et al*, 1995).

2.5 – Citometria de Fluxo

Os estudos acerca do tipo de morte celular produzido pela goniotalamina foram realizados no citômetro de fluxo Guava EasyCiteTMMiniSystem Millipore[®] (FAPESP 09/51602-5). As linhagens tumorais avaliadas foram HT-29 (côlon), SK-MEL-2 (melanoma) e SK-MEL-2 transfectada com Bcl-X_L (resistência a apoptose intrínseca). O veículo utilizado foi o DMSO, sendo que os controles negativos receberam esse diluente no volume máximo correspondente ao usado para as células tratadas (0,1% de DMSO).

2.5.1 Anexina

Este teste emprega a marcação dupla por anexina V e 7-amino-actinomicina D (7-AAD). A anexina V é uma proteína ligante de fosfolípido, com elevada afinidade por fosfatidilserina, que se localiza na face interna da membrana plasmática de células viáveis. Na fase inicial do processo apoptótico, as moléculas de fosfatidilserina são translocadas para a face externa e ficam disponíveis para a ligação com anexina V, marcando, portanto as células em apoptose. O 7-AAD liga-se ao DNA da célula e atua como um indicador de integridade estrutural de membrana já que não é capaz de marcar células viáveis e em apoptose inicial.

Células HT-29 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de 5×10^4 cel/mL em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L), mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24h de estabilização, as células foram tratadas com a *rac*-GTN, em triplicata.

No primeiro experimento, as concentrações de *rac*-GTN utilizadas foram 10, 15 e 20µg/mL, por 24 horas. No segundo experimento, a concentração escolhida foi a de 10µg/mL, realizando-se leituras após 3, 6, 9 e 12 horas de tratamento.

Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e, a uma suspensão celular de 1×10^5 células em 100µL adicionaram-se 100 µL do reagente *Guava*[®]*Nexin*. As amostras foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz e então analisadas por citometria de fluxo, Software *Guava*[®]*Nexin* (2000 eventos).

Os gráficos apresentados nos resultados foram construídos e analisados no programa WinMDI 2.9, sendo:

Esquema 1 - significado dos quadrantes presentes nos gráficos gerados a partir dos experimentos para avaliação de morte celular por citometria de fluxo.

necrose	Apoptose tardia
Células viáveis	Apoptose inicial

2.5.2 Multicaspases

Este teste utiliza um inibidor de caspases conjugado a fluorocromo, o *sulforhodamine-valyl-analyl-aspartyl-fluoromethylketone* (SR-VAD-FMK), que é permeável à célula e não citotóxico. Uma vez no interior celular, o SR-VAD-FMK se liga covalentemente às múltiplas caspases, ficando retido na célula. O sinal vermelho-fluorescente é proporcional ao número de caspases ativas presente nessa célula, ou seja, células acometidas pela via apoptótica. Nesse teste também se utiliza o 7-AAD, como controle da integridade de membrana. Se há marcação com 7-AAD, as células já estão em estágio de apoptose tardia, ou seja, mortas.

Células SK-MEL-2 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de 1×10^6 cel/mL em meio RPMI com 10% de SFB, 1mM de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais e penicilina 100U/mL-estreptomicina 100 μ g/mL, mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24h de estabilização, as células foram tratadas com a *rac*-GTN na concentração de 10, 15 e 20 μ g/mL, em triplicata. As leituras foram feitas após 12 e 24 horas de tratamento.

Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e, a uma suspensão celular de 1×10^5 células em 100 μ L foram adicionados 5 μ L do reagente SR-VAD-FMK 20X. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C, em estufa de CO₂ e protegidas da luz. Após três lavagens com tampão de lavagem (solução estoque disponível no *kit*) seguidas de centrifugação, o *pellet* celular foi ressuspendido em 100 μ L de tampão de lavagem e então se adicionou 5 μ L 7-AAD, encubando-se por 20 minutos a temperatura ambiente, sob

proteção da luz e então analisadas por citometria de fluxo, software *Guava®Multicaspases* (5000 eventos).

2.5.3 Caspase 8 e Caspase 9

Os *kits* são constituídos por inibidores específicos para caspase 8 (FAM-LETD-FMK), caspase 9 (FAM-LEHD-FMK) e caspase 3/7 (FAM-DEVD-FMK), sendo cada inibidor permeável e não tóxico à célula. Uma vez no citoplasma, o inibidor se liga à caspase ativa correspondente e a fluorescência resultante é proporcional ao número de caspases ativas no momento em que o reagente foi adicionado. Para cada caspase iniciadora (caspase 8 ou 9) foi realizado um experimento.

Células HT-29 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de 5×10^4 cel/mL em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L), mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24h de estabilização, as células foram tratadas com a *rac*-GTN na concentração de 10µg/mL, em triplicata. As leituras foram feitas após 8, 10 e 12 horas de tratamento.

Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e, a uma suspensão celular de 1×10^5 células em 100µL foram adicionados 10µL da solução trabalho de caspases (1:25 em tampão fosfato-salina (PBS) 1X). As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C, em estufa de CO₂ e protegidas da luz. Após três lavagens com tampão de lavagem (solução estoque disponível no *kit*) seguidas de centrifugação, o *pellet* celular foi ressuspendido em 100µL de tampão de lavagem e então se adicionou 200µL da solução trabalho caspase-7-AAD (1:40 em tampão de lavagem), incubando-se por 10 minutos a temperatura ambiente, sob proteção da luz. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, software *Guava®ExpressPro* (2000 eventos).

3 – Ensaios *in vivo*

3.1 – Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos Balb/C e C57BL/6 fêmeas e Swiss machos obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica-UNICAMP (CEMIB), ratos Wistar obtidos do Centro de Bioterismo da Universidad de Sevilla e camundongos C57BL *wild type* e *knockout* IL-10 dos Laboratórios Charles River-França. Os camundongos (20-35 g) e ratos (180-230g) foram mantidos no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia – CPQBA – UNICAMP ou no biotério da faculdade de Farmácia – Universidad de Sevilla, em salas com temperatura controlada de 25±2 °C em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso livre à água e ração. Os cuidados dos animais bem como os protocolos de pesquisa estão de acordo com os princípios e diretrizes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e European Union regarding animal experimentation (Directive of the European Counsel 86/609/EC) aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal do Instituto de Biologia – UNICAMP e pelo comitê de experimentação da Universidad de Sevilla.

3.2 Avaliação da Toxicidade *in vivo*

Grupos de três camundongos Balb/C fêmeas foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com as doses de 50, 100, 300, 600 e 1000 mg/kg de (*R*)-, (*S*)- ou *rac*-GTN. Os grupos foram observados continuamente por período de 4 horas e então diariamente, por período de 15 dias. Os seguintes parâmetros foram avaliados: sinais de toxicidade geral, como os efeitos na locomoção, comportamento (agitação, atividade reduzida, sonolência), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades e mortalidade (Lapa *et al*, 2008; Litchfield & Wilcoxon, 1949).

3.3 - Atividade antiproliferativa da goniotalamina em camundongos implantados com a linhagem MCF-7 encapsulada em fibras semipermeáveis (Hollow fiber)

As células, cultivadas em condições normais (meio de cultura RPMI + soro fetal bovino 5%, estreptomicina/penicilina, 37°C) foram tripsinizadas e ajustadas à densidade de 1×10^5 células/fibra, em 160 µl de meio de cultura. Os fragmentos de fibras (2 cm) foram preenchidos pela suspensão celular e selados, sendo cultivados em placas de 6 compartimentos com 2 ml de meio de cultura, por 24 horas antes do implante nos animais. Uma placa foi mantida como controle para avaliação da quantidade de células/fibra no momento de implante nos animais, cujo crescimento celular foi avaliado pelo método de MTT (Decker *et al*, 2004). Os camundongos (Balb-C, fêmeas, n=4/grupo) foram anestesiados (100 mg ketamina + 5 mg xilazina) e receberam três fibras no peritônio (Figura 11), o que garante que as células cresçam nas mesmas condições, diminuindo a variação interindividual (Hollingshead *et al*, 1995; Temmink *et al*, 2007). Os tratamentos foram realizados a cada 3 dias, por 18 dias, sendo: controle negativo (veículo - salina 0,9% + tween 80%), controle positivo (doxorrubicina 3 mg/kg, via i.p.) e *rac*-GTN (10, 30 e 100 mg/kg, via i.p.). No 18º dia, os animais foram sacrificados, as fibras retiradas e colocadas em placas de 6 compartimentos contendo meio de cultura + soro fetal bovino a 5%. Adicionou-se solução trabalho de MTT (1,25 mg/mL) e incubou-se por 4 horas, a 37°C, protegidas da luz. O meio foi aspirado e as fibras mantidas em solução de protamina a 2,5% (6 ml/compartimento) por 24 horas a 4°C. A seguir, as fibras foram limpas com gaze, para eliminar os *debris* fixados externamente e incubadas em placas de 24 compartimentos, 1 fibra/compartimento, cortadas ao meio e deixadas para secar a temperatura ambiente. Os cristais de formazam formados foram dissolvidos em 250 µL de DMSO e incubados por 4 horas, protegidos da luz. Alíquotas de 150 µL da solução extraída foram transferidas para placas de 96 compartimentos e a leitura foi feita por espectrofotometria a 550 nm. Os resultados foram expressos como ((média de leitura D18- média de leitura D0/média de leitura D0)*100) (Hollingshead *et al*, 1995; Temmink *et al*, 2007).

Figura 11 - Fibras de polivinilideno (*Hollow Fiber*) contendo células tumorais humanas de mama (MCF-7), implantadas no peritônio de camundongo Balb-C



Fibras de polivinilideno (*Hollow Fiber*) contendo células tumorais humanas de mama (MCF-7), na densidade de 1×10^5 células/fibra, implantadas no peritônio de camundongo Balb-C.

3.4 – Tumor sólido de Ehrlich

3.4.1 Manutenção e preparo das células

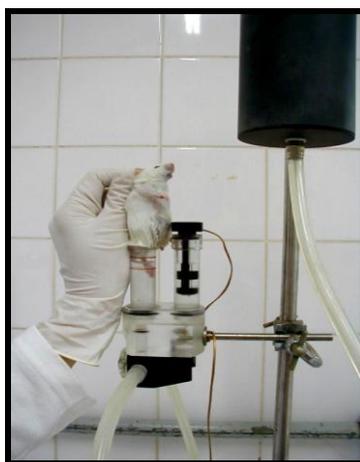
As células de tumor de Ehrlich são mantidas na sua forma ascítica, no peritônio dos camundongos, por passagens semanais de 5×10^5 células/animal. Para tanto, as células foram descongeladas, ressuspendidas em PBS e centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular novamente ressuspendido em PBS, em volume suficiente para preparar a suspensão celular na densidade de inoculação de 5×10^5 células/animal. Dois animais foram inoculados (doadores) e após sete dias foram sacrificados, o líquido ascítico foi coletado e submetido a processamento, para preparo da suspensão de manutenção da linhagem ou para preparo da suspensão de trabalho (Oloris *et al*, 2002; Gomes *et al*, 2008).

3.4.2 Atividade da goniotalamina sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich

Para os experimentos foram utilizados camundongos fêmea da linhagem Balb/C (n=8/grupo) e as células foram preparadas na densidade de $2,5 \times 10^6$ células/60 μ L/animal

em PBS (suspensão de trabalho) (Kleeb *et al*, 1999). O volume basal da pata traseira direita dos animais foi avaliado em aparelho de hidroplestímetro (Panlab[®], Espanha) e a seguir foram inoculados 60 µl ($2,5 \times 10^6$ células) no coxim plantar dessa mesma pata (Figura 12). O volume tumoral foi avaliado a cada três dias e determinado pela diferença entre o volume medido no dia e o volume basal. No 15º de experimento os animais foram eutanasiados e as patas foram removidas e pesadas, para a determinação do peso relativo tumoral, dado pela diferença entre os pesos da pata com tumor e sem tumor, dividido pelo peso corporal (Figura 12). A partir do terceiro dia após o inóculo das células, os animais foram tratados intraperitonealmente a cada três dias, sendo divididos nos seguintes grupos: controle negativo (veículo – salina 0,9% + tween 80%), controle positivo (5-Fluorouracil – Europharma[®] 10 mg/kg – 5-FU ou doxorubicina – Europharma[®] 3 mg/kg - DOX) e grupos experimentais ((*R*)- e (*S*)-GTN na dose de 50 mg/kg e *rac*-GTN nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, *rac*-GTN 100 mg/kg + 5-FU 10 mg/kg e Piroxicam Pfizer[®] - 20 mg/kg).

Figura 12 - Avaliação do volume da pata em hidroplestímetro e comparação das patas sadia e com tumor após eutanásia dos animais no 15º dia.



A avaliação do volume da pata em hidroplestímetro foi feita a cada três dias, sendo ferramenta para avaliar o desenvolvimento tumoral ao longo do experimento. Ao final, os animais foram eutanasiados, as patas traseiras sadia e com tumor foram retiradas para pesagem e determinação do peso relativo tumoral (diferença de peso entre as patas sadia e com tumor dividido pela massa corporal).

3.4.3 Atividade da goniotalamina sobre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich

Camundongos da linhagem Balb/C (n=8/grupo) receberam intraperitonealmente células de tumor de Ehrlich na densidade de $1,0 \times 10^4$ células/100 μ L/animal em PBS (suspensão de trabalho) (Sacoman *et al*, 2008). Os animais foram divididos em grupos e tratados um dia após o inóculo das células, sendo: controle negativo (veículo – salina 0,9% + tween 80%) e grupos experimentais (*rac*-GTN nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg). Os animais foram tratados intraperitonealmente a cada três dias e no 9º dia de experimento os animais foram sacrificados e o líquido ascítico retirado após injeção de 3 mL de PBS no peritônio. A suspensão obtida foi centrifugada por 5 minutos a 2500 rpm, 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* celular novamente ressuspendido em PBS, na proporção de 1/20. A contagem do número de células/mL foi realizada em citometria de fluxo, Guava EasyCite™ MiniSystem Millipore®, excluindo-se *debris* celulares e células de pequeno tamanho.

Além da contagem celular, ao final do experimento foi analisado o hemograma do sangue total dos animais (Sysmex®, modelo pocH-100iV), avaliando: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg) e plaquetas (Pt).

3.4.4 Avaliação dos parâmetros sanguíneos

Ao final de alguns experimentos foi realizado o hemograma de cada animal. Para tanto, os animais foram anestesiados (100 mg ketamina + 5 mg xilazina) e o sangue coletado através do plexo retro-orbitário com capilares de vidro. O sangue foi colocado em microtubos com EDTA (1mL de sangue para 50 μ L de EDTA) e lido em aparelho veterinário para análise de hemograma (Sysmex®, modelo pocH-100iV), avaliando-se: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg) e plaquetas (Pt).

3.5 – Melanoma B16-F10

3.5.1 Atividade da goniotalamina sobre o desenvolvimento metastático do melanoma B16-F10

Para induzir a metástase no pulmão, $1,0 \times 10^5$ células B16-F10 foram injetadas via endovenosa na veia safena de camundongos C57BL/6. A seguir, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de oito animais que foram tratados a partir do 2º dia, a cada três dias, via i.p., com solução salina 0,9% + tween 80% (controle negativo) ou *rac*-GTN na dose de 100mg/kg. Os animais foram eutanasiados no 21º dia, o pulmão foi retirado, pesado e então processado para dosagem da melanina.

3.5.2 Extração e quantificação de melanina

Após a retirada o pulmão foi pesado e homogeneizado em 5mL de água destilada com a ajuda de um sonicador. A amostra foi centrifugada a 10000G por 20 min e o precipitado (ppt) lavado com 5mL de tampão fosfato pH6,5 para remoção de materiais solúveis e nova centrifugação nas mesmas condições. A seguir o precipitado foi extraído com uma mistura de clorofórmio: metanol 2:1 (1x) e depois com etanol: éter 3:1 (2x), para retirada dos lipídios, centrifugando e descartando o sobrenadante após cada etapa.

O resíduo, após secagem, foi tratado com 1mL solução de lise contendo 0,3% de saponina em solução salina (NaCl) 0,9%, durante 30 min para remoção das hemoproteínas. Após centrifugação o ppt foi lavado com 5mM MgCl₂ em 0,15M NaCl (2x) e tratado com 0,01M Tris-HCl (pH 7,8) contendo 0,5% de SDS; 0,01M EDTA; 100 µg/mL Proteínase K incubado a 56° C por 2h. O produto dessa digestão foi lavado com solução salina 0,9% e depois com água destilada. O ppt foi dissolvido em 400µL de uma solução de NaOH 0,1N à 56° C por 30 min para completa solubilização. A solução foi a seguir aplicada em placa de 96 compartimentos e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 450nm. O resultado foi expresso dividindo-se a leitura espectrofotométrica pela massa do pulmão.

3.6 – Atividade da goniotalamina em modelos de inflamação

3.6.1 – Edema de pata induzido por Carragenina

Os experimentos foram conduzidos de acordo com Posadas *et al* (2004) e Nunes *et al* (2007), com algumas modificações. O volume basal da pata traseira direita de camundongos Balb/C (n=8/grupo) foi avaliado em aparelho de hidropletismômetro (Panlab[®]/Espanha) e então os animais foram tratados intraperitonealmente, sendo: controle negativo (veículo – salina 0,9% + tween 80%), controle positivo (Piroxicam – Pfizer[®] 20 mg/kg) e grupos experimentais (*rac*-GTN nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg e doxorrubicina – Europharma[®] 5mg/kg). Após 30 minutos, a inflamação foi induzida através da injeção de 40 µL de carragenina 2,5% (Sigma-Aldrich[®]) no coxim plantar da pata traseira direita. A seguir o edema produzido pela carragenina foi avaliado após 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 24, 48 e 72 horas, sendo determinado pela diferença entre o volume medido e o volume basal.

3.6.2 – Edema de pata induzido por Fosfolipase A₂

O procedimento experimental é semelhante ao utilizado no modelo de edema de pata por carragenina, sendo os animais divididos nos seguintes grupos: controle negativo (veículo – salina 0,9% + tween 80%), controle positivo (dexametasona – Sigma[®] - 1 mg/kg) e o grupo experimental (*rac*-GTN, 300 mg/kg). Após 30 minutos, a inflamação foi induzida através da injeção intraplantar de 30 µL de fosfolipase A₂ (PLA₂) de veneno de *Naja naja* (Sigma[®]), 5 µg/animal. As avaliações foram realizadas após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da indução da inflamação (Giner-Larza *et al*, 2000).

3.6.3 – Edema de pata induzido pelo composto 48/80 (liberação de histamina e serotonina)

O procedimento experimental é semelhante ao utilizado no modelo de edema de pata por carragenina, sendo os animais divididos nos seguintes grupos: controle negativo

(veículo – salina 0,9% + tween 80%), controle positivo (ciproheptadina – Periactin[®]- 4 mg/kg) e o grupo experimental (*rac*-GTN, 300 mg/kg). Após 30 minutos, a inflamação foi induzida através da injeção intraplantar de 30 µL de composto 48/80 (Sigma[®]), 10 µg/animal. As avaliações foram realizadas após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da indução da inflamação (Cirino *et al*, 1989).

3.6.4 – Edema de pata induzido por Bradicinina

O procedimento experimental é semelhante ao utilizado no modelo de edema de pata por carragenina, sendo os animais divididos nos seguintes grupos: controle negativo (veículo – salina 0,9% + tween 80%) e grupos experimentais (*rac*-GTN, 300 mg/kg e dexametasona – Sigma[®], 1 mg/kg). Após 30 minutos, a inflamação foi induzida através da inoculação intraplantar de 30 µL de bradicinina (Sigma[®]), 50 µg/animal. As avaliações foram realizadas após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da indução da inflamação (Cirino *et al*, 1989).

3.6.5 – Edema de pata induzido por Prostaglandina E₂

O procedimento experimental é semelhante ao utilizado no modelo de edema de pata por carragenina, sendo os animais divididos nos seguintes grupos: controle negativo (veículo – salina 0,9% + tween 80%), controle positivo (Piroxicam – Pfizer[®] – 20 mg/kg) e o grupo experimental (*rac*-GTN, 300 mg/kg). Após 30 minutos, a inflamação foi induzida através da injeção intraplantar de 20 µL de prostaglandina E₂ (Sigma[®]), 1 µg/animal. As avaliações foram realizadas após 15, 30, 60 e 90 minutos da indução da inflamação (Claudino *et al*, 2006).

3.6.6 – Contorção abdominal induzida por ácido acético

O experimento foi realizado de acordo com Spíndola *et al* (2010). Grupos de 6 camundongos Swiss machos foram tratado via i.p. com veículo (salina 0,9% + tween 80%, 10 mL/kg) e *rac*-GTN (10, 30, 100 e 300 mg/kg). As contorções foram induzidas com

solução de ácido acético 0,8% em água destilada (10 mL/kg) 30 minutos após os tratamentos e a seguir seu número determinado durante 15 minutos, para avaliação da nocicepção.

3.6.7 – Nocicepção induzida pela Formalina

Grupos de 6 camundongos Swiss machos foram tratados via i.p. com veículo (salina 0,9% + tween 80%) e *rac*-GTN (50, 100, 150 e 200 mg/kg). Após 30 minutos, 20 µL de solução de formalina (formaldeído 1,2% em PBS) foram inoculados no coxim plantar da pata traseira direita dos animais. O tempo total dispendido pelo animal mordendo/lambendo a pata inoculada (índice de nocicepção) foi avaliado durante 40 minutos (Spíndola *et al*, 2010).

3.6.8 – Colite aguda e subaguda induzida por TNBS

Estes experimentos foram realizados no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Sevilla, sob orientação da Profa. Dra. Virginia Motilva, de acordo com Morris *et al* (1989).

- Colite subaguda induzida por TNBS

Ratos Wistar machos (n=8/grupo), com peso entre 180-200g foram deixados em jejum de 12 horas e anestesiados via i.p. com solução de hidrato de cloral a 12%. A colite aguda foi induzida com solução de TNBS (Sigma[®]) dissolvido em etanol (50%, v/v), através de uma cânula de poliuretano (diâmetro externo de 2 mm) que foi introduzida via anal, 10 mg/kg, 0,25mL/animal; o grupo satélite recebeu salina 0,9%, via retal. Após a inoculação, os animais foram deixados de cabeça para baixo por 30 segundos, para garantir que a solução de TNBS não extravasasse. Os tratamentos foram realizados 48h, 24h e 1 h antes da indução da colite e também após 24 h de indução, sendo: controle negativo (veículo – salina 0,9% + tween 80%), grupo satélite (veículo – salina 0,9% + tween 80% - sadio) e grupos experimentais: *rac*-GTN nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, via i.p. e 30

mg/kg, via oral (v.o.). Após 48 horas de indução de colite, os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico (hidrato de cloral, 24%) para remoção do cólon distal, que foi cortado longitudinalmente e após lavagem em solução salina 0,9% foi pesado e medido.

- Avaliação macroscópica

Os cólons foram fotografados e o dano macroscópico foi avaliado mensurando-se a extensão das lesões (cm²). Além disso, obteve-se a relação peso/comprimento do cólon.

- Dosagem de Mieloperoxidase (MPO)

Fragmentos de cólon foram obtidos de todos os animais e congelados a -70°C. Para o teste, os tecidos foram descongelados, pesados (100 mg) e homogenizados em PBS (1/10 volume), pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 4800 rpm, 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi homogenizado novamente com solução contendo PBS pH 6,0, 0,5% de hexadecil-trimetilamonio bromido (HETAB) e 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Esse homogenato foi submetido a um ciclo de congelamento/descongelamento com N₂ e então sonicado. Uma amostra de 10 µL do sonicado foi diluída em 240 µL de PBS pH 6,0 e a seguir 50 µL dessa diluição foi colocada em placa de 96 compartimentos, em triplicata. Acrescentou-se 50 µL de O-dianisidina 0,067%, 50 µL de HETAB 0,5% e 50 µL de água oxigenada 0,003% e incubou-se por 5 minutos, ao abrigo da luz. A leitura foi feita por espectrofotometria, a 450 nm, sendo a quantidade de MPO caracterizada pelo aumento de absorbância das amostras, já que quando há atividade dessa enzima a solução nos compartimentos torna-se alaranjada (Grisham *et al*, 1990).

- Colite aguda induzida por TNBS

A indução de colite aguda consiste na administração de dose elevada de TNBS (30 mg/kg em 0,25 mL/animal) (Morris *et al*, 1989). A indução foi realizada no primeiro dia de experimento e os animais foram tratados diariamente por 10 dias, sendo: controle negativo

(veículo – salina 0,9% + tween 80%), grupo satélite (veículo – salina 0,9% + tween 80% - sadio) e grupos experimentais: *rac*-GTN nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, por via oral.

3.6.9 – Colite espontânea em camundongos knockouts para interleucina-10 (IL-10 KO)

Esse experimento foi conduzido com camundongos machos da linhagem C57BL6, sendo 28 animais *wild type* (WT) e 28 *knockouts* para IL-10 (*KO*), ou seja, pré-dispostos ao desenvolvimento de inflamações crônicas, todos provenientes dos Laboratórios Charles River, França, onde viviam em condições SPF (condições livres de patógenos). Com 5 semanas de idade os animais foram trazidos para o biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade de Sevilla, onde foram mantidos em condições convencionais. Ao atingirem 7 semanas de idade, os grupos foram separados e os tratamentos iniciados, sendo: WT controle (veículo – salina 0,9% + tween 80%), controle negativo *KO* (veículo – salina 0,9% + tween 80%), tratamento WT (*rac*-GTN, 30 mg/kg, via oral) e tratamento *KO* (*rac*-GTN, 30 mg/kg, via oral). Os tratamentos foram realizados três vezes/semana, por 12 semanas e durante esse período foram observados os sinais de toxicidade e progressão da doença, tais como perda de peso, diarreia, sangramentos, excreção de muco e prolapso retal (Scheinin *et al*, 2003).

- Avaliação macroscópica

Após 12 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados, o sangue foi retirado por punção cardíaca e o cólon exposto, sendo pesado, medido e fotografado. Obteve-se a relação peso/comprimento do cólon e o dano macroscópico foi avaliado em estereomicroscópio, análise cega, segundo o seguinte *score* proposto por Berg *et al* (1996):

Score 0: cólon sem sinais de inflamação

Score 1: áreas de inflamação (áreas avermelhadas)

Score 2: áreas de possível displasia (áreas espessas)

Score 3: áreas de displasia e possíveis tumores pequenos

Além disso, o tecido foi dividido e alíquotas armazenadas para análise histológica (fixação em solução de formol tamponado a 4%), extração de RNA para realização de *real-time* PCR (congeladas a -70°C, tratamento com DNase) e análises bioquímicas (congeladas a -70°C). O *real-time* PCR foi realizado com objetivo de quantificar a expressão relativa de genes envolvidos no processo inflamatório e na carcinogênese.

- Histologia

Os fragmentos destinados à análise histológica foram fixados em solução de formol a 4%, tamponado, por 24 horas. Após esse período, seguiu-se a desidratação progressiva com série crescente de etanol: etanol 50°, etanol 70°, etanol 80°, etanol 100° e inclusão em parafina. Os cortes foram realizados em micrótomo Leica Ultracut, 5 µm de espessura. Para a coloração os cortes foram desparafinizados em série de xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

- Avaliação microscópica

As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus CX41 e a análise de imagens através de câmara digital Altra 20, acoplada a sistema analisador de imagens automático (AnalySIS GetIT). As análises foram cegas e realizadas utilizando-se as objetivas de 4X, 10X e 20X, por histopatologista externo ao grupo.

A escala de inflamação seguiu um *score* de acordo com a proposta de Berg *et al*, (1996), com algumas modificações:

Score 0: tecido intacto, sem modificações

Score 1: poucas células mononucleares na lâmina própria, acompanhadas por mínima hiperplasia. Perda mínima ou nula de muco nas células caliciformes

Score 2: frequentes lesões focais inflamatórias na lâmina própria (células mononucleares e neutrófilos). Hiperplasia moderada. Pequenas erosões epiteliais. Escassa inflamação na submucosa

Score 3: Grandes áreas de inflamação na mucosa, atingindo a submucosa. Abscessos nas criptas. Hiperplasia. Perda abundante de mucina. Úlceras.

Os cortes também foram analisados com o objetivo de detectar zonas de displasia, segundo as descrições de Sturlan *et al* (2001).

-Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada em capela de fluxo, ambiente livre de ribonucleases e outras fontes de RNA/DNA, a fim de evitar a contaminação com DNA genômico. Os materiais foram todos autoclavados e limpos com solução de 0,1N NaOH e 1mM de EDTA, seguido de lavagem em água *RNase-free*.

Para a extração de RNA total utilizou-se o *kit* de extração de RNA total Promega #TM048. Resumidamente: um tubo estéril de microcentrífuga/amostra contendo 175 µL de tampão de lise de RNA + β-mercaptoetanol foi pesado e o peso anotado. O tecido (que estava conservado em N₂, a -70°C) foi cortado em pequenas porções, congelado em nitrogênio líquido e macerado com pistilo em gral de porcelana em nitrogênio líquido. Depois de o nitrogênio evaporar o tecido macerado foi transferido para o tubo recém-pesado e misturado por inversão. O tubo contendo o tecido e o tampão de lise foi pesado e assim calculou-se a massa de tecido macerado. Adicionou-se 350 µL de tampão de diluição de RNA e o tubo foi colocado em banho de água ou *termoblock* a 70°C por 3 minutos, com o cuidado de não ultrapassar esse tempo. Transferiu-se o lisado para um microtubo limpo e adicionou-se 200 µL de etanol 95%, homogenizado com a pipeta 3-4 vezes. Centrifugou-se a mistura em coluna Spin (disponível no *kit*) por 1 minuto a 12.000-14.000 x g e lavou-se com solução de lavagem de RNA, seguida de tratamento com solução de DNase e DNase stop. Adicionou-se 100 µL de água livre de nucleases e o RNA purificado foi armazenado a -70°C. A concentração de RNA foi mensurada em NANODROP.

- Retrotranscrição

A retrotranscrição (síntese de DNA a partir de RNA pela ação da enzima transcriptase reversa) foi realizada segundo *kit* de retrotranscrição “SuperScript™ First-Strand Synthesis Using Random Primers” – Invitrogen – Cat. No: 11904-018). Para tanto se utilizou 1 ng-5µg de RNA total extraído. Para controle, utilizou-se RNA controle (50 ng/µL).

- Mistura em tubo estéril de 0,5 mL, livre de nucleases:

x µL contendo 1 a 5 ng de RNA total ou 1-500 ng de mRNA

1 µL de mix de 10 mM dNTP

1 µL de random primers (50 ng/µL)

Água destilada até completar 12 µL

- Aqueceu-se a mistura a 65°C por 5 minutos e colocou-se em gelo por 1 minuto. Coletou-se o conteúdo por centrifugação e adicionou-se:

4 µL de 5 X First-Strand Buffer

2 µL 0,1 M DTT

1 µL de RNaseOUT™ (40U/µL)

- Adicionou-se 1 µL da enzima SuperScript™ II RT em cada tubo e no controle 1 µL de DEPC-treated water ao invés da enzima. Incubou-se a 25°C por 10 minutos e a 42°C por 50 minutos.

- A reação foi terminada a 70°C por 15 minutos e depois em gelo. Centrifugou-se brevemente e adicionou-se 1 µL de RNase H em cada tubo, incubação por 20 minutos a 37°C. As reações foram armazenadas a -20°C.

- PCR em tempo real

A reação de *real time*-PCR (amplificação e quantificação da expressão de uma sequência alvo de DNA) foi realizada segundo protocolo SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Takara, #RR041A), em aparelho LightCycler®, Roche, pelo método de Sybr®Green PCR master mix. A reação foi realizada utilizando os passos segundo amplificador. Estágio 1: Desnaturação inicial em um ciclo, a 95°C, 10-30 segundos. Estágio 2: Shuttle PCR, desnaturação a 95°C, 3-5 segundos e anelamento/extensão a 60°C, 20-30 segundos. Estágio

3: PCR em 3 passos - desnaturação a 95°C por 3-5 segundos, anelamento a 55°C por 10-20 segundos, extensão a 72°C por 6-15 segundos, 30 a 45 ciclos.

Os *primers* foram desenhados pelo programa NCBI *Primer Blast*, que permite selecionar o intervalo de temperatura de anelamento ao DNA, o comprimento da sequência de bases do gene e a espécie do DNA trabalhado (Tabela 3).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores murino-específicos (*primers*) utilizados para a amplificação de genes alvos

Gene	Sequência	Temperatura de anelamento (°C)
GAPDH	F:5'AACGACCCCTTCATTGAC3'	56
	R:5'TCCACGACATACTCAGCAC3'	
TNFα	F:5'GATCTCAAAGACAACCAACTAGTG3'	56
	R:5'CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG3'	
Caspase 8	F:5'TBCGGGATCCAGACAATGCCC3'	56
	R:5'AGCCCGCAGTCTCACAAGTCAC3'	
Sirt1	F:5'TGCCTCCTGAAGGCTGGGATTACAT3'	56
	R:5'GGTGGTGCAAACACTGCTCCTC3'	
MMP9	F:5'TCTGGATTTGGGGGTGATGGGCA3'	56
	R:5'GCGCCATGTCACAACCCTTCG3'	
Bcl-2	F:5'CCGGCGGAGGGTCAGATGGA3'	56
	R:5'CACCGGGACATGGCTGCCAG3'	
VEGF	F:5'GAGGTTGGCACCATGGGAGCAGA3'	56
	R:5'CACGTGCCGTGGAGTGTCACAT3'	

As análises foram realizadas através da eficiência de reação ($\Delta\Delta C_q$) e normalizadas descontando-se o Ct (número de ciclos necessários para a amplificação do gene) individual de cada gene do Ct do gene utilizado como controle endógeno (*housekeeping*), nesse caso o GAPDH (Bustin *et al*, 2009). Os ΔC_q de cada grupo foram descontados do grupo WT controle, portanto a análise forneceu a quantificação da expressão relativa de cada gene.

4 – Análise dos resultados

Todos os resultados obtidos foram estatisticamente analisados através do Teste de Duncan ($p < 0,05$), ANOVA, utilizando-se o programa estatístico Statistica7[®].

Resultados e Discussão

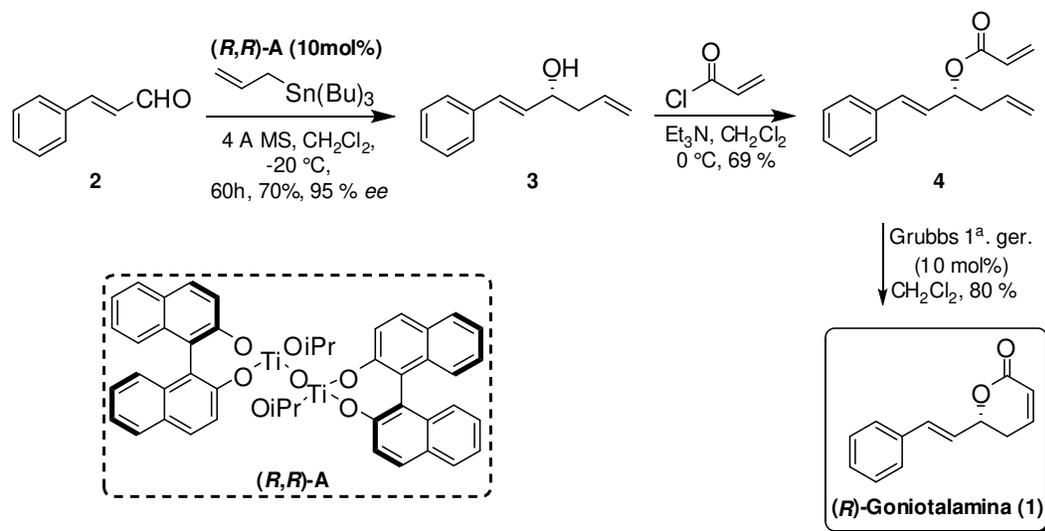
Resultados e discussão

1 - Síntese assimétrica e racêmica e atividade antiproliferativa *in vitro* da goniotalamina

1.1 – Síntese assimétrica da goniotalamina

As sínteses de (*R*)- e (*S*)-goniotalamina foram realizadas em três etapas, empregando a alilação assimétrica do *trans*-cinamaldeído nas condições desenvolvidas por Keck e colaboradores (2003) (Esquema 2). Esse processo emprega quantidades catalíticas (< 10 mol%) do $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ e de BINOL em diclorometano e na presença de peneira molecular (4Å MS) sob a temperatura de -20°C por 60 horas, sendo um sistema eficiente que permite a obtenção dos alcoóis homoalílicos em bons rendimentos e com ótimo excesso enantiomérico (Marquissolo, 2009). A goniotalamina em suas duas formas enantioméricas foi obtida com rendimento global de 39%.

Esquema 2 - Rota de síntese para a (*R*)-goniotalamina (1) ou (*R*)-GTN



Aspecto físico: Sólido cristalino branco

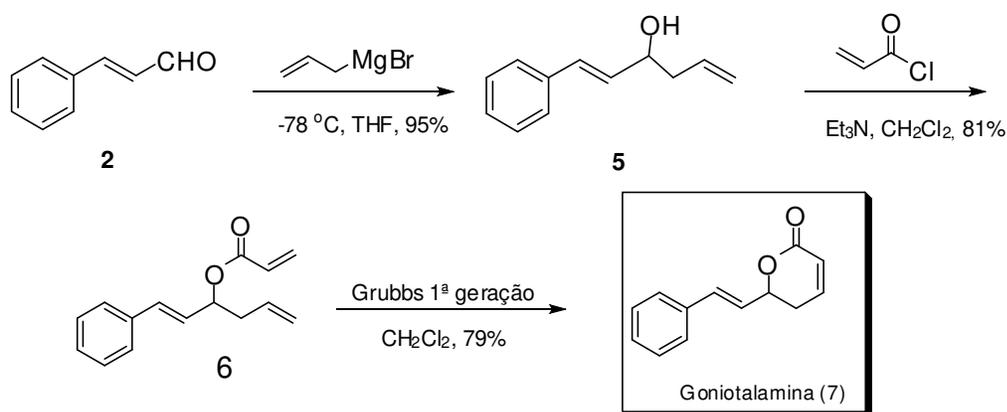
Ponto de fusão: 81-82 °C

A síntese da (*S*)-goniotalamina foi realizada nas mesmas condições, porém empregando-se o (*S,S*)-A.

1.2 – Síntese racêmica da goniotalamina

Já a síntese racêmica envolveu a alilação do *trans*-cinamaldeído com brometo de alilmagnésio em substituição à alilação enantioselectiva, seguida de esterificação com cloreto de acrilóila e Et₃N e finalizada com reação de metátese de olefinas com catalisador de Grubbs de 1ª geração. Essa rota apresentou excelentes rendimentos para as etapas de alilação (95%), esterificação (81%) e metátese de olefinas (79%). A goniotalamina foi obtida em 61% de rendimento global.

Esquema 3 - Rota de síntese para a *rac*- goniotalamina (7) ou *rac*-GTN



A realização dos testes *in vivo* exige grande quantidade de amostra-teste, de forma que sua obtenção deve ser otimizada e em larga escala. A síntese assimétrica realizada nas condições de Keck e colaboradores (2003), apesar de fornecer excessos enantioméricos excelentes, é uma etapa trabalhosa e longa, já que exige 60 horas para que a reação ocorra.

Dessa forma, avaliou-se a atividade antiproliferativa *in vitro* do racemato de goniotalamina (*rac*-GTN) e comparou-se com o perfil de atividade de seus enantiômeros. A síntese não-assimétrica da goniotalamina apresenta excelente rendimento global, obtendo-se grandes quantidades em menor período de tempo. De fato, em um período de três meses foi possível a síntese de 25 gramas de *rac*-GTN e apesar do aumento da escala, o rendimento se manteve ao redor de 60%.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) são apresentados em anexo.

1.3 – Atividades antiproliferativa da goniotalamina em cultura de células

Considerando que um mesmo composto pode apresentar diferentes perfis de atividade a depender da linhagem celular, foram utilizadas neste estudo linhagens tumorais humanas de diferentes origens histológicas e genéticas: endodérmicas (NCI-460/pulmão, HT-29/cólon), ectodérmicas (UACC-62/melanoma, MCF-7/mama, U251/glioma) e mesodérmicas (OVCAR-03/ovário, NCI-ADR/RES/ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, PC-3/próstata, 786-0/rim). Além disso, a atividade antiproliferativa foi avaliada em células com fenótipos não-tumorais, de origem ectodérmica (HaCat/queratinócito humano e Vero/fibroblasto renal de macaco verde).

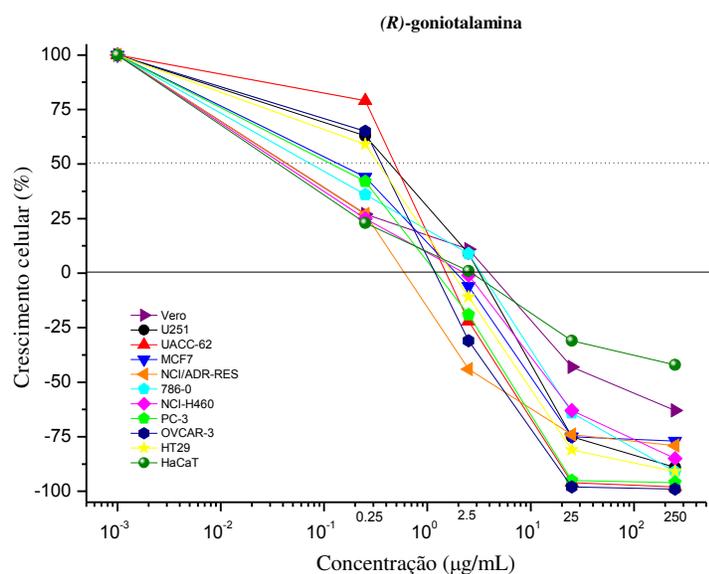
O crescimento celular foi determinado por espectrofotometria, utilizando-se o corante protéico sulforrodamina B (SRB) e as análises foram realizadas baseadas na metodologia de triagem *in vitro* para drogas anticâncer realizada pelo NCI, EUA, que utiliza um painel de 60 linhagens tumorais humanas (NCI60) (Monks *et al*, 1991; Shoemaker, 2006). De modo diferente de outros métodos, o ensaio com SRB permite a determinação da densidade celular no tempo 0 (momento de adição das amostras), o que possibilita o cálculo da concentração que inibe totalmente o crescimento celular (Shoemaker, 2006).

Os gráficos gerados relacionam a porcentagem de crescimento e a concentração das amostras testadas (Figuras 13-15). Os valores entre 100% e 0 representam inibição de crescimento, sendo a linha 0 o marco para a inibição total de crescimento, ou seja, quando

a quantidade de células ao final do experimento é a mesma do momento de adição das amostras (placa T₀). Já os valores negativos representam morte celular, pois a quantidade de células (dosagem de proteínas coradas por absorvância, inferida sobre a quantidade de células ao final do experimento) nesse caso, é menor do que aquela do momento de adição das amostras, ou seja, a quantidade de células analisadas na placa T₀ (Monks, 1991). A tabela (Tabela 4) indica os valores de TGI (*total growth inhibition*), ou seja, a concentração de amostra necessária para inibir totalmente o crescimento celular em 48 horas de tratamento.

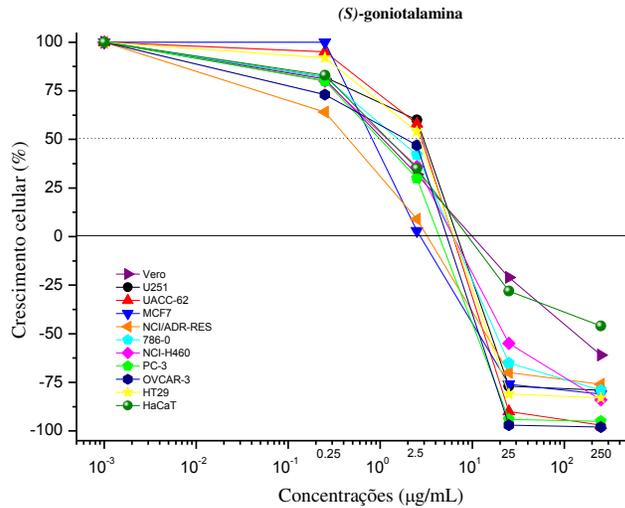
A triagem *in vitro* inicial permite a seleção dos melhores candidatos aos estudos em modelos experimentais de câncer utilizando animais de experimentação. É uma técnica que permite a avaliação da atividade antiproliferativa com maior especificidade, rapidez, eficiência e reprodutibilidade (Monks *et al*, 1991).

Figura 13 – Atividade antiproliferativa da (R)-goniotalamina



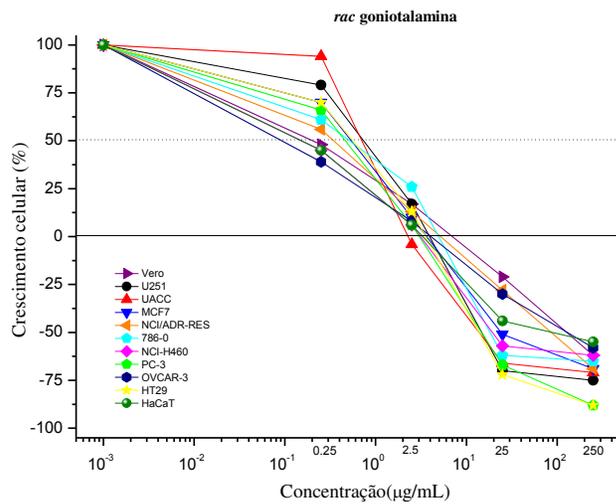
Atividade antiproliferativa da (R)-goniotalamina em painel de 9 linhagens tumorais humanas e duas linhagens não-tumorais, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

Figura 14 – Atividade antiproliferativa da (S)-goniotalamina



Atividade antiproliferativa da (S)-goniotalamina em painel de 9 linhagens tumorais humanas e duas linhagens não-tumorais, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

Figura 15– Atividade antiproliferativa da rac-goniotalamina



Atividade antiproliferativa da rac-goniotalamina em painel de 9 linhagens tumorais humanas e duas linhagens não-tumorais, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

(*R*)-, (*S*)- e *rac*-GTN inibiram o crescimento das células estudadas em função das concentrações empregadas, havendo também indução de morte celular (Figuras 13-15). (*R*)-GTN apresentou os menores valores de TGI, seguidos pela *rac*-GTN e (*S*)-GTN. As linhagens mais sensíveis à (*R*)-GTN foram PC-03 (próstata) e NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência multidrogas), enquanto que para *rac*-GTN foram NCI-460 (pulmão), PC-03, HT-29 (côlon) e UACC-62 (melanoma) e para (*S*)-goniotalamina foram NCI-ADR/RES e OVCAR-03 (ovário) (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de TGI e LC₅₀ em µM, para (*R*)-, (*S*)- e *rac*-GTN, concentrações necessárias para inibir totalmente o crescimento celular e levar à morte de 50% das células, respectivamente^a

	TGI			LC ₅₀		
	<i>Rac</i> -GTN	(<i>R</i>)-GTN	(<i>S</i>)-GTN	<i>Rac</i> -GTN	(<i>R</i>)-GTN	(<i>S</i>)-GTN
U251	18,7	13,2	32,1	110,97	106,8	107,3
UACC-62	14,98	8,34	25,62	88,70	119,2	96,3
MCF-7	20,5	8,0	14,68	451,33	83,5	68,32
NCI-ADR/RES	26,3	3,1	14,4	345,0	31,5	41,35
786-0	21,6	9,7	29,3	116,77	115,9	121,3
NCI-H460	13,3	6,6	29,6	2534,94	50,6	123,5
PC-03	13,9	5,4	18,4	21,88	83,1	90,5
OVCAR-03	20,08	8,31	9,14	685,37	99,6	84,5
HT-29	15,5	8,5	28,3	109,5	91,8	104,2
VERO	31,0	13,0	64,7	712,7	400,2	761,7
HaCat	17,2	16,0	57,0	551,17	1541,2	1265,6

^a Concentrações foram determinadas por regressão não-linear utilizando o programa ORIGIN PRO 8.0[®] (OriginLab Corporation).

Em geral, o perfil de atividade de *rac*-GTN se manteve entre os perfis apresentados por (*R*)- e (*S*)-GTN: o enantiômero (*R*)- é mais potente, apresentando valores de TGI abaixo de 13 µM para as células tumorais, enquanto que *rac* e (*S*)-GTN apresentam valores de TGI entre 13-26 µM e 9-45 µM, respectivamente (Tabela 4) (Vendramini-Costa *et al*, 2010). Para a maioria das linhagens tumorais humanas avaliadas, a goniotalamina, em suas três formas, inibe totalmente o crescimento celular em concentrações entre 5 e 30 µM (1 e 6 µg/mL), que são valores relativamente baixos, demonstrando a potência das moléculas,

porém com pouca seletividade (Tabela 4). Quanto às linhagens não-tumorais (Vero e HaCat), as três formas da goniotalamina apresentam valores de TGI mais elevados, porém próximos da faixa de concentração que inibe totalmente o crescimento celular das linhagens tumorais, de forma que não se pode afirmar seletividade para linhagens tumorais neste parâmetro. Realmente somente estudos *in vivo* poderão responder acerca da toxicidade de um composto. Em termos de morte celular, analisando-se os valores de LC₅₀ pode-se observar que em geral são necessárias concentrações maiores de goniotalamina para levar à morte de 50% das células não-tumorais (Tabela 4).

A atividade antiproliferativa da goniotalamina pode ser explicada pela presença em sua estrutura de uma δ lactona α - β insaturada, que atua como aceptor de Michael na presença de biomoléculas contendo aminoácidos nucleofílicos (por exemplo, cisteína, lisina, serina e treonina) ou resíduos de guanina, como já demonstrado em outras lactonas naturais, como a citostatina e a fostriecina (de Fátima *et al*, 2006; Barcelos *et al*, 2012). De fato, diversos estudos apontam para a atividade antiproliferativa da goniotalamina em diferentes linhagens tumorais humanas, tais como carcinoma cervical (Hela), carcinoma gástrico (HCG-27), carcinoma mamário (MCF-7, T47D, MDA-MB-231), leucemia (HL-60, Jurkat T), carcinoma de próstata (PC-03) e de cólon (HT-29) (Inayat-Hussain, *et al*, 1999, 2003; Pihie *et al*, 1998; de Fátima *et al*, 2005).

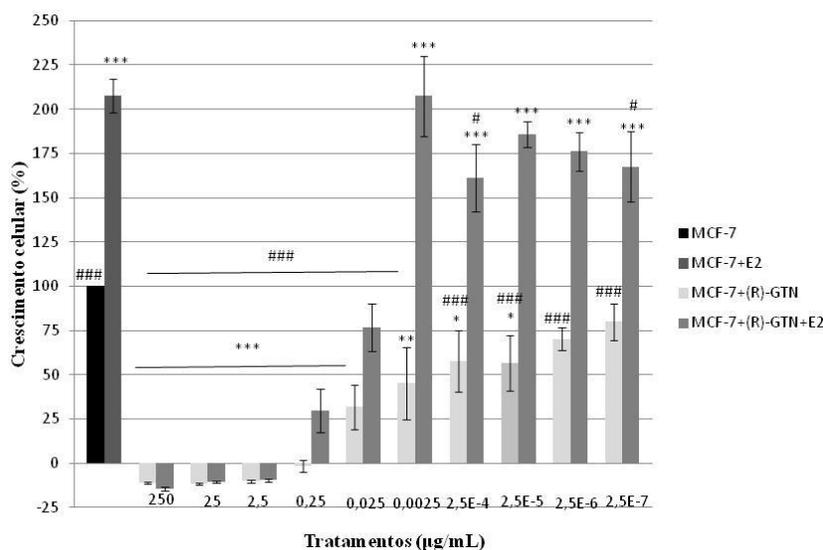
A goniotalamina em suas formas enantioméricas e racêmica apresentam atividade antiproliferativa *in vitro*, em concentrações na ordem de μ M, sendo que os resultados obtidos para *rac*-GTN são comparáveis aos de seus enantiômeros. Esses dados aliados ao ótimo rendimento da rota sintética racêmica e o menor tempo para obtenção do produto fazem da mistura racêmica da goniotalamina uma escolha natural para os estudos *in vivo*.

1.4 – Influência da goniotalamina no crescimento celular da linhagem MCF-7 sob estímulo estrogênico (E-screen)

Tendo em vista os baixos valores de TGI apresentados por (*R*)-GTN e (*S*)-GTN para a linhagem MCF-7 (mama), avaliou-se a atividade antiproliferativa da goniotalamina nessas células quando expostas ao estímulo hormonal. A linhagem MCF-7, um

adenocarcinoma da glândula mamária, apresenta receptores de estrogênio citoplasmáticos, respondendo ao estímulo proliferativo desse hormônio (ATCC, 2012). Além disso, essa célula expressa o oncogene *Wnt7B* e produz proteínas que se ligam aos fatores de crescimento insulina-like (IGFBP), sendo essa secreção modulada pelos tratamentos anti-estrogênicos (ATCC, 2012). Dessa forma, utilizou-se como controle positivo o tamoxifeno (TAM), um anti-estrogênico que atua como modulador seletivo de receptores de estrogênio, funcionando como um antagonista parcial por se ligar à subunidade AF2 do receptor, que é ativa transcricionalmente e que regula a expressão de genes-alvo da cascata estrogênica (Lam *et al*, 2009).

Figura 16 - Influência de (R)-GTN sobre o crescimento da linhagem MCF-7, na presença e ausência do 17-β estradiol

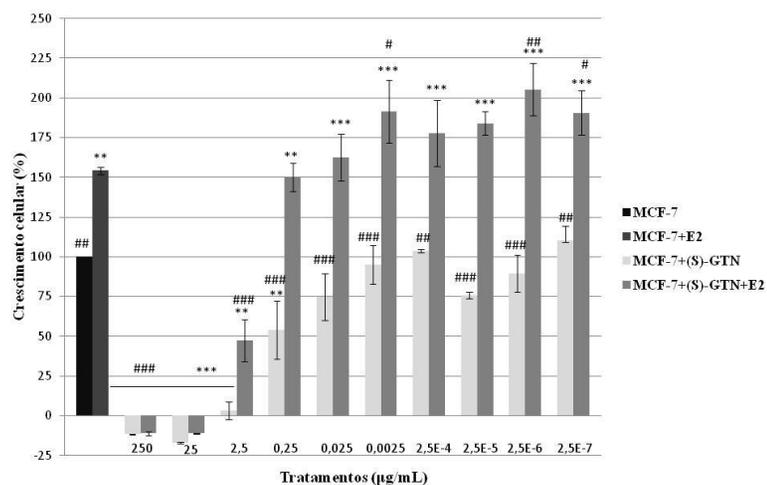


Influência de (R)-GTN sobre o crescimento da linhagem MCF-7, na presença e ausência do 17-β estradiol (E2) (1nM). As células foram tratadas com (R)-GTN em diferentes concentrações (2,5E-7 a 250 µg/mL). *, # p<0,05, **, ## p<0,01 e ***,### p<0,001 (ANOVA). * diferença estatística em relação às células sem estradiol. # diferença estatística em relação às células com estradiol. (E- corresponde a 10⁻).

As concentrações entre 2,5 e 250 µg/mL apresentam atividade citocida tanto na presença quanto na ausência de estrogênio, ou seja, o mecanismo de morte é independente da via estrogênica. Concentrações abaixo de 2,5 µg/mL inibem o crescimento celular,

porém à medida que a concentração de goniotalamina diminui, diminui também seu efeito antiproliferativo sobre a célula, prevalecendo o efeito proliferativo do estrógeno (Figura 16).

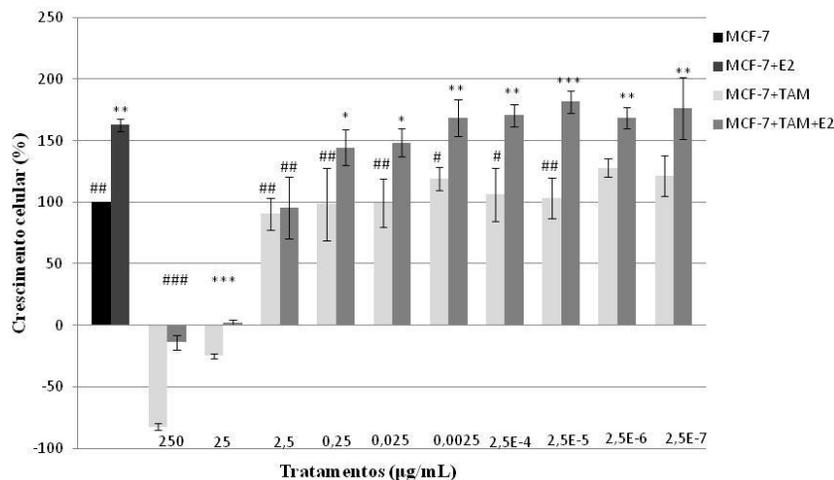
Figura 17 - Influência de (S)-GTN sobre o crescimento da linhagem MCF-7, na presença e ausência do 17-β estradiol



Influência de (S)-GTN sobre o crescimento da linhagem MCF-7, na presença e ausência do 17-β estradiol (E2) (1nM). As células foram tratadas com (S)-GTN em diferentes concentrações (2,5E-7 a 250 μg/mL). *, # p<0,05, **, ## p<0,01 e ***,### p<0,001 (ANOVA). * diferença estatística em relação às células sem estradiol. # diferença estatística em relação às células com estradiol. (E- corresponde a 10).

De maneira semelhante ao que ocorre com a (R)-GTN, as concentrações citocidas de (S)-GTN (25 e 250μg/mL) levam as células à morte tanto na presença como na ausência de estrógeno e conforme há diminuição da concentração de goniotalamina, há também diminuição de seu efeito antiproliferativo, o que favorece a ação do estrógeno (Figura 17).

Figura 18 - Influência do tamoxifeno sobre o crescimento da linhagem MCF-7, na presença e ausência do 17- β estradiol



Influência do tamoxifeno (TAM) sobre o crescimento da linhagem MCF-7, na presença e ausência do 17- β estradiol (E2) (1nM). As células foram tratadas com TAM em diferentes concentrações (2,5E-7 a 250 $\mu\text{g/mL}$). *, # $p < 0,05$, **, ## $p < 0,01$ e ***, ### $p < 0,001$ (ANOVA). * diferença estatística em relação às células sem estradiol. # diferença estatística em relação às células com estradiol. (E- corresponde a 10).

No caso do tamoxifeno, a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ leva quase que a totalidade das células à morte, porém quando estas são expostas ao estrógeno, a ação citocida do tamoxifeno praticamente é inibida, indicando efeitos antagônicos sobre a célula (Figura 18). O mesmo ocorre na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, onde o estrógeno inibe a ação citocida do tamoxifeno, havendo inibição total do crescimento celular. Os efeitos antagônicos do tamoxifeno e estrógeno podem ser mais bem observados quando as células são tratadas com tamoxifeno na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$: tal concentração não altera a viabilidade celular, porém inibe totalmente a ação do estrógeno, indicando um efeito sobre os receptores do hormônio. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Soto *et al* (1995).

Os receptores de estrógeno funcionam tanto como fatores como co-fatores de transcrição (Shi *et al*, 2007). Dois terços dos tumores de mama apresentam crescimento dependente de estrógeno; quando o estrógeno se liga em seu receptor, há a sinalização para a transcrição de genes que ativam a proliferação e sobrevivência (Brekman *et al*, 2011).

Estudos recentes indicam que o estrógeno leva à estabilização pós-traducional de proteínas relevantes para a promoção do ciclo celular, como c-Myc e ciclina D1 (Shi *et al*, 2007). De maneira semelhante, a β -catenina, juntamente com TCF/LEF (família de fatores de transcrição) podem promover a sobrevivência e proliferação celular durante diversos estágios do desenvolvimento da glândula mamária, regulando também os genes que codificam para c-Myc e ciclina D1. Além dos receptores de estrógeno, outros receptores, como os da família dos receptores de fatores de crescimento endotelial (EGFR), também direcionam o crescimento de células tumorais de mama, levando à ativação das cinases Akt e Erk, que participam de vias de proliferação e sobrevivência (Frogne *et al*, 2009). O estrógeno leva também à ativação da PI3K, direcionando as células MCF-7 para a fase S do ciclo celular, promovendo sua proliferação (Lombardi *et al*, 2008).

A proliferação e sobrevivência celular em decorrência da ação do estrógeno é uma ação coordenada entre essas atividades e a inibição de morte celular: diversos estudos indicam que o estrógeno induz a expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2*, portanto inibindo a apoptose, além de inibir a transcrição do gene *p53*, que codifica para a proteína p53, importante regulador de morte celular (Brekman *et al*, 2011). Dessa forma, tratamentos que inibam a proliferação celular ou que induzam apoptose independentemente de Bcl-2 e p53 ou ainda que inibam a expressão do gene *bcl-2* possivelmente serão ativos em linhagens dependentes de estrógeno, como a MCF-7, como pode ser o caso da goniotalamina em maiores concentrações, não necessariamente interagindo com os receptores de estrógeno.

O tamoxifeno e o fulvestrano (antagonista de receptores de estrógeno, sem efeitos agonistas), além de atuarem nos receptores de estrógeno, também induzem apoptose via inibição da expressão de Bcl-2 (Kansra *et al*, 2005; Ko *et al*, 2011). A expressão de Bcl-2 está envolvida com a resistência ao tamoxifeno em alguns tipos de câncer de mama (Ko *et al*, 2011).

A ação independente de (*R*)- e (*S*)-GTN sobre a linhagem permite concluir que nessas condições experimentais tais moléculas não atuam através da inibição da atividade estrogênica, o que não exclui a possibilidade de ação sobre as mesmas vias ativadas e/ou

inibidas pelo estrógeno. Nesse caso não haveria competição, ou seja, a administração de estrógeno não influenciaria a atividade da goniotalamina.

2 - Toxicidade aguda in vivo

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada pela administração intraperitoneal de (*R*)-, (*S*)- e *rac*-GTN nas doses de 50, 100, 300, 600 e 1000 mg/kg, seguindo-se a observação dos animais durante 4h após a administração das doses e durante os 15 dias subsequentes. Nenhuma evidência de toxicidade foi observada durante as 4h de observação bem como durante os 15 dias seguintes nos animais tratados com as doses de 50, 100 e 300 mg/kg: os animais se mantiveram ativos e ganharam peso normalmente. Os animais tratados com a dose de 600 mg/kg apresentaram secreção ocular após 5 minutos de tratamento, diminuição da locomoção e da resposta aos estímulos, com aparecimento de tremores após 15 minutos de tratamento. Todos os animais se recuperaram após 2 horas de tratamento, não havendo morte. Já os animais tratados com a dose de 1000 mg/kg apresentaram muitos sinais de toxicidade: após 2 minutos de tratamento os animais apresentaram tremores, dificuldade respiratória, cauda em Straub, epistonus (cabeça e tronco arqueados para trás) e convulsões esparsas ao longo de duas horas, quando todos os animais tratados morreram. A toxicidade apresentada pelas doses de 600 e 1000 mg/kg caracterizam uma ação central da molécula, que interfere na capacidade respiratória e locomotora dos animais, levando à convulsões do tipo clônico-tônica. Dessa forma a dose máxima considerada segura foi a de 300 mg/kg, sendo os testes *in vivo* realizados com doses que variaram entre 10 e 300 mg/kg, pelas vias intraperitoneal e oral.

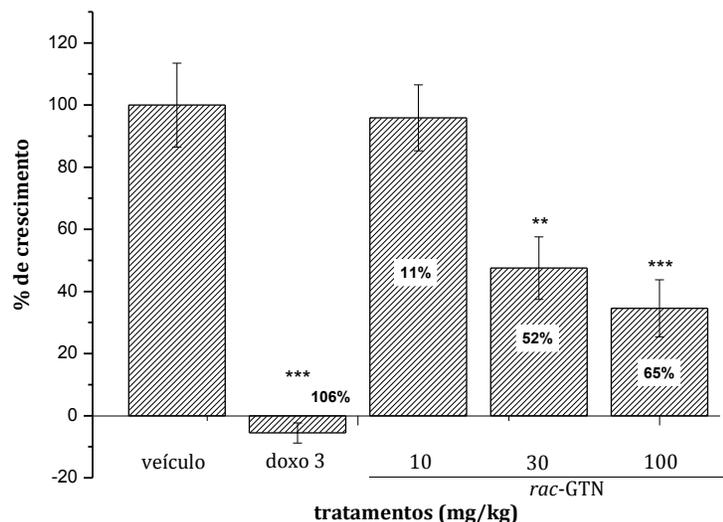
3 - Atividade antiproliferativa da goniotalamina em camundongos implantados com a linhagem MCF-7 encapsulada em fibras semipermeáveis (Hollow fiber)

O modelo de *Hollow fiber* consiste no cultivo de linhagens tumorais em fibras de polivinilideno permeáveis a substâncias com peso molecular <500 KDa, podendo ser implantadas no subcutâneo e/ou peritônio de animais imunocompetentes. Os animais são tratados com substâncias de interesse e então as fibras são retiradas e o efeito dos tratamentos sobre as linhagens celulares é avaliado empregando-se métodos colorimétricos (Decker *et al*, 2004). A vantagem desse modelo reside no fato de que os animais, mesmo sendo imunocompetentes, não desenvolvem reação imune contra as células contidas nas fibras, pois essas não são apresentadas como antígenos. Portanto não há resposta imune celular, o que permite o implante de células humanas. A linhagem escolhida para este modelo foi a de mama (MCF-7), por ter sido a linhagem com a qual já foram realizados testes mecanísticos associados à ação da goniotalamina sobre receptores de estrógeno. A via escolhida para o implante das fibras foi a abdominal.

A goniotalamina apresentou atividade antiproliferativa dose-dependente, sendo que o tratamento com a menor dose não foi ativo, enquanto que as doses de 30 e 100 mg/kg inibiram o crescimento tumoral em 52% e 65% respectivamente (Figura 19). Já o tratamento com a doxorrubicina, 3 mg/kg, apresentou atividade citocida, inibindo em 106% o crescimento celular, ou seja, havia menor quantidade de células no final do experimento.

Esse experimento demonstrou o efeito da goniotalamina em células tumorais humanas em modelo *in vivo*. É interessante notar que no modelo de *Hollow fiber* as células tumorais estão confinadas às fibras, portanto a ação que se observa é de fato sobre vias que levam à proliferação celular. A goniotalamina, ao apresentar atividade antiproliferativa nesse modelo, confirma a atividade *in vitro* já estudada.

Figura 19 - Atividade antiproliferativa da goniotalamina sobre a linhagem MCF-7 implantada no abdômen de camundongos, em modelo de *Hollow Fiber*



Efeito da *rac*-GTN sobre o crescimento da linhagem MCF-7, expresso como porcentagem de crescimento. Os valores contidos nos retângulos brancos indicam a porcentagem de inibição de crescimento. Tratamentos com *rac*-GTN, via i.p., nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg resultaram em inibição do crescimento celular dose-dependente. A doxorubicina (3 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o veículo foi salina 0,9% + tween 80%. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA).

O modelo de *Hollow fiber* é amplamente utilizado pelo NCI como modelo intermediário entre a triagem *in vitro* e o modelo de tumor xenográfico *in vivo*, por ser um modelo eficiente para seleção de potenciais substâncias com alguma atividade *in vivo*, com o aditivo de fornecer informações acerca da atividade pós-metabolização da substância usada nos tratamentos (Mi *et al*, 2009).

Porém, sobre o modelo de *Hollow fiber* é importante apontar que este não substitui outros que permitam estudos acerca da biologia e patogênese do tumor, pois neste não é possível avaliar aspectos do estroma ou de respostas imunológicas, sendo esta apenas uma triagem inicial com células humanas implantadas *in vivo* (Decker *et al*, 2004).

Dessa forma, avaliou-se a goniotalamina no modelo de tumor sólido e ascítico de Ehrlich em camundongos imunocompetentes. O tumor de Ehrlich, por ser murino, pode ser

implantado livremente no camundongo, portanto há a participação do ambiente circundante no desenvolvimento desse tumor.

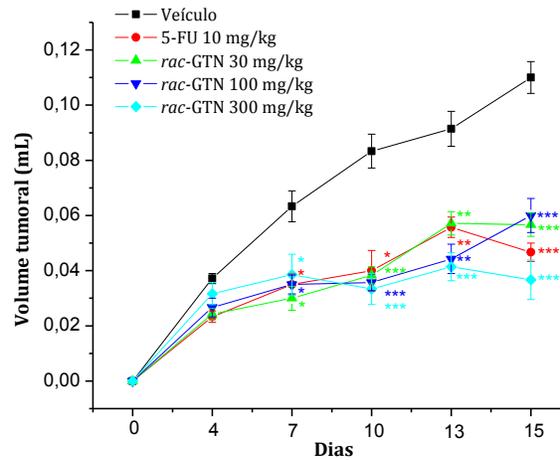
4 – Tumor sólido e ascítico de Ehrlich

A fim de avaliar a atividade *in vivo* da goniotalamina em um modelo onde o tumor cresce livremente, utilizou-se o modelo de tumor sólido de Ehrlich inoculado na pata direita traseira do animal. Este tumor é de crescimento rápido e agressivo e o fato de ser inoculado na pata do animal permite analisar o comportamento sistêmico das amostras, que são administradas intraperitonealmente. Além disso, como o experimento tem entre 15 e 20 dias de duração, pode-se avaliar a toxicidade da amostra em doses repetidas, pois os esquemas de tratamento podem variar de um tratamento semanal para até tratamentos diários. No caso da goniotalamina, os tratamentos foram realizados a cada três dias, totalizando cinco administrações.

Após o sétimo dia de experimento, os tratamentos com 30, 100 e 300 mg/kg de *rac*-GTN e 10 mg/kg de 5-FU diminuíram o crescimento tumoral em $50,0 \pm 19,3\%$, $41,7 \pm 13,9\%$, $35,7 \pm 32,5\%$ e $41,7 \pm 17,8\%$ respectivamente, havendo diferença estatística em todos os grupos tratados comparados ao controle positivo (salina 0,9% + tween 80%), mas não havendo diferença entre os grupos tratados ($p < 0,05$) (Figura 20). A inibição de crescimento tumoral foi mantida até o final do experimento (após 5 tratamentos), quando o crescimento tumoral foi inibido em $57,6 \pm 7,4\%$ no grupo tratado com 5-FU (Figura 20) e em $48,5 \pm 9,4\%$, $40,9 \pm 9,5\%$ e $66,7 \pm 15,9\%$ nos grupos tratados com *rac*-goniotalamina nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg respectivamente ($p < 0,001$) (Vendramini –Costa *et al*, 2010).

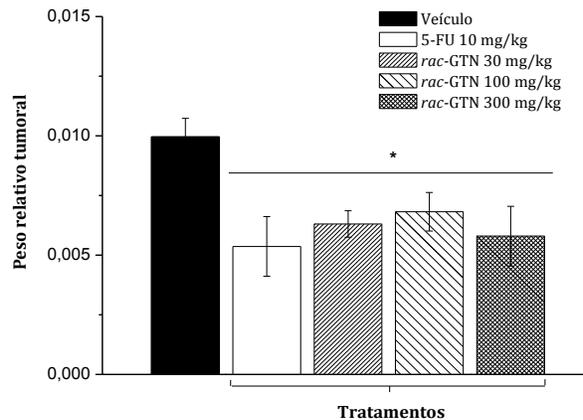
Em concordância com esses dados, o peso relativo tumoral (razão massa do tumor/massa animal) foi inibido em $46,1 \pm 7,8\%$ no grupo tratado com 5-FU e $41,8 \pm 26,0\%$, $31,6 \pm 22,9\%$ e $36,7 \pm 15,9\%$ nos grupos tratados com *rac*-goniotalamina nas doses de 300, 100 e 30 mg/kg respectivamente ($p < 0,05$, Figura 21) (Vendramini –Costa *et al*, 2010).

Figura 20 - Efeito da *rac*-goniotalamina sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich



Efeito da *rac*-GTN sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich, expresso como volume do tumor (mL) por dia de tratamento. Tratamentos com *rac*-goniotalamina nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg resultaram em inibição significativa do crescimento tumoral. O 5-fluorouracil (5-FU) foi utilizado como controle positivo e veículo foi salina 0,9% + tween 80%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA).

Figura 21 -Efeito da *rac*-goniotalamina sobre o peso relativo tumoral

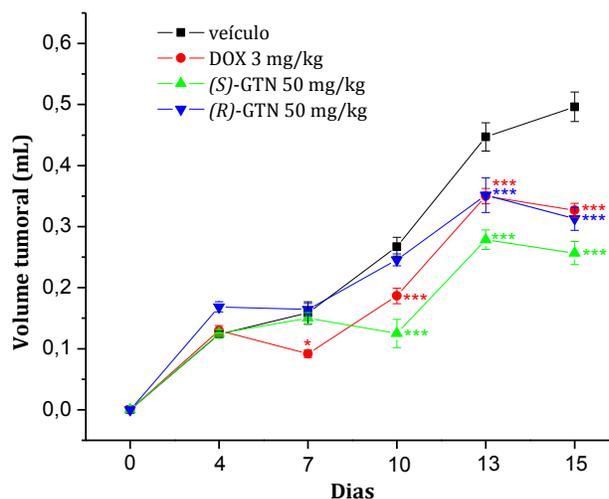


Peso relativo tumoral, expresso pela diferença entre o peso das patas com e sem tumor dividido pela massa corporal. Tratamentos com *rac*-GTN nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg e com 5-FU (10 mg/kg) resultaram em redução significativa no peso relativo tumoral, em comparação com o controle negativo (salina 0,9% + tween 80%). * $p < 0,05$ (ANOVA).

A fim de investigar a influência da configuração absoluta na atividade antiproliferativa *in vivo* e considerando os resultados promissores obtidos com *rac*-GTN no modelo de tumor sólido de Ehrlich, a atividade de (*R*)- e (*S*)-GTN também foi avaliada nesse modelo. Estudos relacionando estrutura-atividade são importantes, como já demonstrado no caso da talidomida racêmica, que é muito utilizada no tratamento de mieloma múltiplo, mas cujos enantiômeros possuem atividades distintas: o enantiômero (*R*) possui propriedades sedativas e o enantiômero (*S*) é teratogênico (Kumar & Rajkumar, 2006).

Como os resultados da *rac*-GTN foram similares em todas as doses testadas ($p < 0,001$), a dose de 50 mg/kg foi selecionada para os enantiômeros e a doxorrubicina (3 mg/kg) foi utilizada como controle positivo.

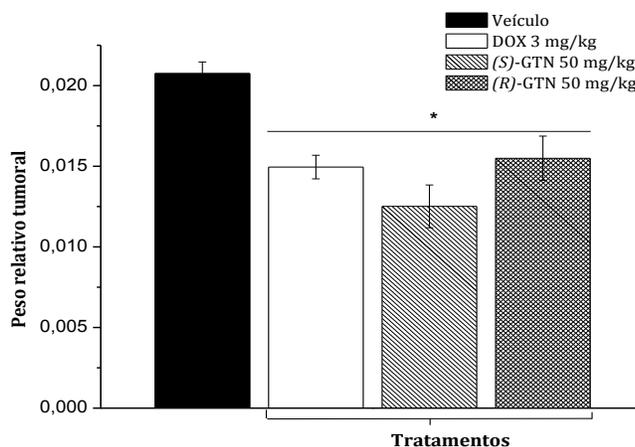
Figura 22 - Efeito da (*R*)- e (*S*)-goniotalamina sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich



Efeito da (*R*)- e (*S*)-GTN sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich, expresso como volume do tumor (mL) por dia de tratamento. Tratamentos com (*R*)- e (*S*)-GTN na dose de 50 mg/kg resultaram em inibição significativa do crescimento tumoral. Doxorrubicina (3 mg/kg) foi utilizada como controle positivo e o veículo foi salina 0,9% + tween 80%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA).

Os enantiômeros da goniotalamina começaram a inibir o crescimento tumoral a partir do 10º dia, após três tratamentos (Figura 22). O enantiômero (*S*)- inibiu o aumento de volume tumoral em $53,7 \pm 20,9\%$ no 10º dia, perfil que foi mantido até o final do experimento, quando a inibição de crescimento foi de $48,7 \pm 9,3\%$. Nos animais tratados com (*R*)-GTN o efeito inibitório sobre o crescimento tumoral foi observado após o 13º dia de experimento ($21,9 \pm 15,6\%$), com resultados similares quando comparados com os outros grupos experimentais no final do experimento ($37,4 \pm 10,8\%$) ($p < 0,001$). A doxorubicina inibiu o crescimento tumoral a partir do 7º dia ($42,7 \pm 9,2\%$), ação mantida até o final do experimento ($34,7 \pm 5,6\%$), quando todos os grupos tratados foram estatisticamente iguais (Vendramini –Costa *et al*, 2010).

Figura 23 - Efeito da (*R*)- e (*S*)-goniotalamina sobre o peso relativo tumoral



Peso relativo tumoral, expresso pela diferença entre o peso das patas com e sem tumor dividido pela massa corporal. Tratamentos com (*R*)- e (*S*)-GTN na dose de 50 mg/kg e com Doxorubicina (3mg/kg) resultaram em redução significativa no peso relativo tumoral, em comparação com o controle negativo (salina 0,9% + tween 80%). * $p < 0,05$ (ANOVA).

Corroborando com os dados de volume tumoral o peso relativo tumoral foi inibido em $28,0 \pm 11,0 \%$ nos animais tratados com doxorubicina 3 mg/kg enquanto que nos

animais tratados com (*R*)- e (*S*)-goniotalamina a inibição foi de $25,3 \pm 16,2\%$ e $39,7 \pm 20,3\%$, respectivamente ($p < 0,001$), (Figura 23) (Vendramini-Costa *et al*, 2010).

Durante os experimentos, os animais foram pesados e observados quanto a possíveis sinais de toxicidade. Após 15 dias de experimento (5 tratamentos), não foram observados sinais de toxicidade ou expressiva perda de peso nos animais tratados com *rac*-, (*R*)- e (*S*)-goniotalamina e 5-FU. No entanto os animais tratados com doxorrubicina (3 mg/kg) apresentaram perda de massa corporal (2,5g de perda no final do experimento, representando 10% da massa corporal e então definindo a máxima dose tolerada). A doxorrubicina é um potente agente antitumoral que está entre as drogas antineoplásicas mais ativas desenvolvidas até o momento, porém sua aplicação é limitada por seus efeitos colaterais, que incluem toxicidade à medula óssea, distúrbios gastrointestinais, estomatite, alopecia, edema, cardiotoxicidade aguda e cumulativa (Graeser *et al*, 2010).

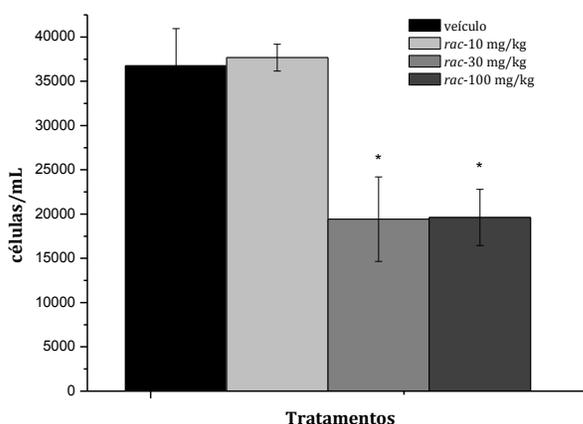
A toxicidade apresentada pela maioria das drogas disponíveis na quimioterapia do câncer e também pela radioterapia é um dos maiores desafios para o desenvolvimento de novas drogas, que visam maiores índices terapêuticos com maior seletividade para as linhagens tumorais (Weinberg, 2008). Dessa forma, a ausência de sinais de toxicidade nas doses efetivas da goniotalamina representa um indicativo positivo para a continuidade dos estudos pré-clínicos com essa molécula.

Tumores sólidos são estruturas complexas e heterogêneas, apresentando um microambiente composto por células tumorais e do estroma, embebidas em uma matriz extracelular e cercadas por uma rede vascular. No interior desses tumores existem diferenças de pH, pressão de oxigênio e fluxo de nutrientes, que contribuem para a resistência tumoral à quimioterapia devido à distribuição irregular de drogas nesse ambiente (Trédan *et al*, 2007). Apesar disso, a goniotalamina, nas formas de racemato e enantioméricamente puras, inibiram o crescimento tumoral em modelo de tumor sólido de Ehrlich, demonstrando provável eficácia no tratamento de tumores sólidos.

O tumor sólido é um modelo interessante, pois permite acompanhar o desenvolvimento tumoral dia a dia até o final do experimento, porém é mais difícil a

avaliação da densidade celular. Como o modelo ascítico permite essa quantificação, foi realizado um experimento piloto avaliando a atividade da *rac*-GTN no modelo de tumor ascítico de Ehrlich. Nesse piloto o experimento foi mais curto (8 dias), o que permitiu a coleta do líquido ascítico livre de hemorragia e a contagem de células totais/mL de ascite através de citometria de fluxo, excluindo-se *debris* celulares e células de pequeno tamanho. A fim de avaliar a influência da goniotalamina sobre os parâmetros sanguíneos, no final desse experimento o sangue foi retirado para determinação do hemograma.

Figura 24 - Tumor ascítico de Ehrlich: quantidade de células/mL de lavado peritoneal nos diferentes tratamentos

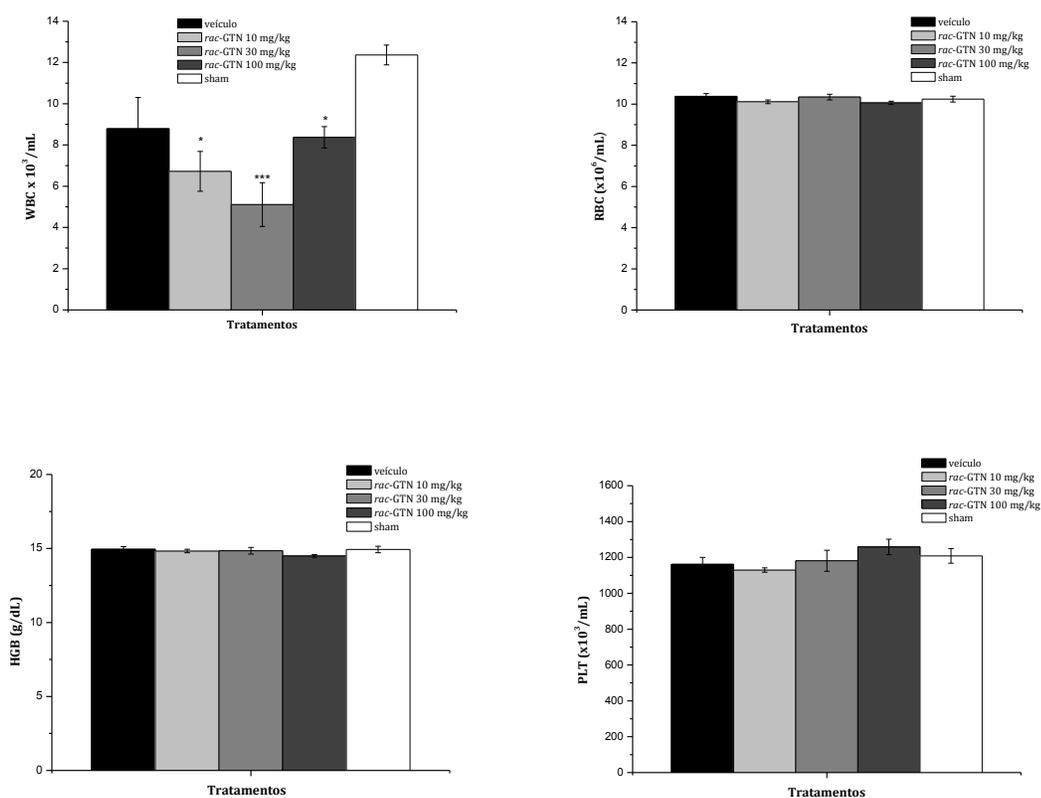


Efeito da *rac*-GTN sobre o número total de células/mL do lavado peritoneal contendo ascite decorrente do desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich. Tratamentos com *rac*-GTN, via i.p., nas doses de 30 e 100 mg/kg resultaram em inibição significativa do número de células/mL. Como veículo foi utilizado salina 0,9% + tween 80. * $p < 0,05$ (ANOVA).

Como observado no tumor sólido de Ehrlich, os tratamentos com *rac*-GTN nas doses de 30 e 100 mg/kg reduziram o desenvolvimento tumoral de maneira semelhante ($42,5 \pm 32,6\%$ e $40,6 \pm 26,6\%$, respectivamente), sendo ambas estatisticamente iguais entre si e diferentes do controle negativo (Figura 24).

Quanto aos parâmetros sanguíneos, o tumor ascítico de Ehrlich produz no hospedeiro mudanças na resposta hematopoiética medular, como anemia, depleção tímica, imunossupressão e leucocitose granulócito-dependente, havendo também efeitos supressores nas células progenitoras da medula óssea (Bincoletto *et al*, 2005). No caso desse experimento, o desenvolvimento do tumor foi responsável por uma diminuição do número de leucócitos, sem alteração na quantidade de eritrócitos, hemoglobina e plaquetas (Figura 25).

Figura 25 - Efeitos da *rac*-goniotalamina sobre alguns parâmetros hematológicos



Hemograma do sangue total dos animais após tratamento com *rac*-GTN, via i.p., nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg. Grupo sham: animais saudáveis, sem tumor e sem tratamento. Leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hgb) e plaquetas (Ptl). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Duncan's test, $p < 0,001$ (ANOVA).

A diminuição na contagem de leucócitos, apesar de não estar correlacionada com as doses, sugere uma possível inibição de proliferação dessas células. Essa hipótese deverá ser

avaliada em estudo específico de toxicidade e com animais saudáveis, realizando a contagem diferencial desses leucócitos.

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário de crescimento rápido e agressivo, que gera uma resposta inflamatória local caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, formação de edema e migração celular (Stewart, 1959; Fecchio *et al*, 1990). Os estudos sugerem que a resposta inflamatória neutrofílica é essencial para o controle do tumor de Ehrlich, porém o aumento do influxo dessas células também promove seu desenvolvimento, o que pode estar relacionado com a angiogênese e fatores de crescimento induzidos pela inflamação, que são necessários para o desenvolvimento tumoral (Bergami-Santos *et al*, 2004; Nascimento *et al*, 2006). Pode-se concluir então que a modulação da resposta inflamatória pode inibir o desenvolvimento desse tumor.

Corroborando com essa hipótese, diversos estudos apontam para uma estreita relação entre câncer e processos inflamatórios crônicos, suportada por evidências epidemiológicas onde mais de 25% dos cânceres estão relacionados à infecções crônicas e a outros tipos de inflamação (Schetter *et al*, 2010). Durante o processo de tumorigênese, modificações drásticas no estroma, reação inflamatória e resposta imune são fatores desencadeados no microambiente tumoral, que atuam promovendo e mantendo o tumor (Bissel & Hines, 2011).

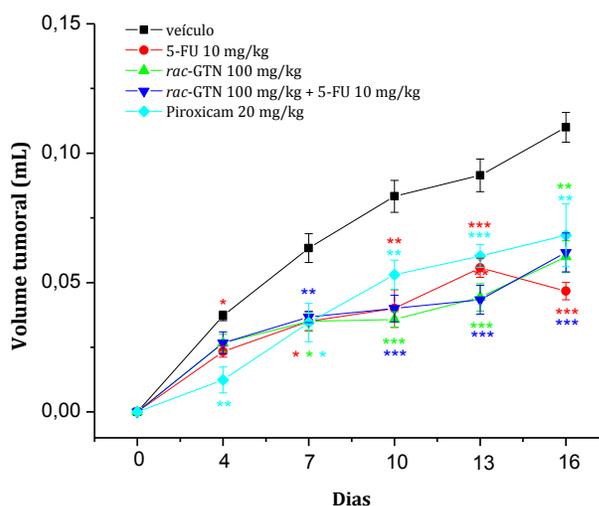
Inflamações crônicas têm sido associadas a vários passos envolvidos na tumorigênese, incluindo transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (Aggarwal *et al*, 2009). O processo inflamatório associado ao câncer inclui infiltração de células de defesa, predominantemente de células fagocitárias, presença de mensageiros inflamatórios (como fator de necrose tumoral, interleucinas e quimiocinas), tecido em remodelamento e angiogênese (Mantovani, 2007).

Considerando que o microambiente é um componente determinante na formação e manutenção tumoral, o entendimento de seu papel na tumorigênese poderá auxiliar na transposição desses conhecimentos para a clínica. O co-tratamento com drogas que modifiquem o ambiente tumoral pode promover uma resposta adjuvante com os quimioterápicos que atuam em alvos específicos (Bissel & Hines, 2011). Recentemente diversos estudos foram realizados propondo terapias combinatórias que enfocam o papel do

microambiente em vários tipos de câncer, bem como o tumor propriamente dito. Algumas dessas terapias já foram aprovadas pelo FDA (US Food and Drug Administration) para o tratamento de diversos cânceres, como inibidores de angiogênese (Avastin[®]) e o anti-inflamatório Celebra[®], inibidor de COX-2 utilizado em estudos clínicos de fase II como adjuvante no tratamento de câncer de próstata e pâncreas, por suprimir o crescimento de vasos (Bissel & Hines, 2011).

A fim de avaliar a influência da inflamação no desenvolvimento tumoral, a atividade do anti-inflamatório não-esteroidal Piroxicam (20 mg/kg) foi avaliada no modelo de tumor sólido de Ehrlich. Além disso, considerando a extensa aplicação de terapias combinatórias no tratamento de diversos tipos de câncer, a atividade da *rac*-GTN, 100 mg/kg, em combinação com o 5-FU, 10 mg/kg também foi avaliada (Figura 26).

Figura 26 - Efeito da *rac*-goniotalamina, *rac*-goniotalamina + 5-fluorouracil e do Piroxicam (AINEs) sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich



Efeito da *rac*-GTN, *rac*-GTN + 5-fluorouracil e do piroxicam (AINEs) sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich, expresso como volume do tumor (mL) por dia de tratamento. Tratamentos com *rac*-GTN, *rac*-GTN + 5-fluorouracil e do piroxicam (AINEs) resultaram em inibição significativa do crescimento tumoral. O quimioterápico 5-fluorouracil (10 mg/kg) foi utilizado como controle positivo e o veículo foi salina 0,9% + tween 80. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA).

Já no quarto dia de experimento, os grupos tratados com 5-FU 10 mg/kg e com piroxicam 20 mg/kg apresentaram diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). Realmente, esse quadro pode estar relacionado com uma ação citotóxica do quimioterápico e uma ação anti-inflamatória do AINEs, pois já foi relatado que existe um aumento expressivo nos níveis de prostaglandina E_2 após o inoculo das células tumorais de Ehrlich (Oloris *et al*, 2002). Nos grupos tratados com *rac*-GTN e *rac*-GTN + 5-FU houve inibição do crescimento tumoral a partir do sétimo dia de experimento, porém de maneira semelhante: no grupo que recebeu os dois tratamentos observou-se o mesmo perfil de atividade que o apresentado pelo grupo tratado somente com *rac*-GTN. A inibição de crescimento foi mantida até o final do experimento, sendo de $57,6 \pm 7,4\%$ e de $43,9 \pm 16,7\%$ para os grupos tratados com 5-FU e *rac*-GTN + 5-FU respectivamente ($p < 0,01$) e de $40,9 \pm 9,5\%$ e $37,9 \pm 12,7\%$ para os tratamentos com *rac*-GTN e piroxicam ($p < 0,001$).

O 5-FU faz parte do conjunto de drogas antimetabólicas, ou seja, atua inibindo processos biossintéticos essenciais e/ou sendo incorporado em macromoléculas, como DNA e RNA, inibindo suas funções normais. É um análogo da uracila com um átomo de flúor na posição C-5, no lugar de um hidrogênio; essa uracila modificada se incorpora ao DNA e RNA, inibe a síntese da enzima timidilato sintase, promovendo danos ao DNA. Além disso, inibe também a síntese de RNA e está relacionado à proteína FAS, que é um membro da superfamília do receptor de fator de necrose tumoral, que compõem o *death-inducing signalling complex* (DISC) e ativa a via de apoptose extrínseca via ativação de caspase 8 (Longley *et al*, 2003). Porém, o 5-FU apresenta baixa biodisponibilidade, que pode ter sido também interferida pela administração da goniotalamina, o que explicaria o perfil de atividade do tratamento combinado ser igual ao tratamento somente com a goniotalamina (Longley *et al*, 2003). Essa hipótese poderá ser mais bem explorada em estudos mais detalhados, incluindo avaliação dos mecanismos de ação.

Era de se esperar que o Piroxicam fosse ativo nesse modelo, pois durante o desenvolvimento do tumor de Ehrlich há também a instalação de um quadro inflamatório que auxilia no desenvolvimento tumoral. A liberação de prostaglandina E_2 provavelmente foi inibida já no início do experimento, pois o Piroxicam, sendo um AINEs, atua na inibição da ciclooxigenase (COX), enzima que catalisa a síntese de prostaglandinas,

prostaciclina e tromboxano a partir do ácido araquidônico (Rang *et al*, 2004). A COX-2 está superexpressa em muitos tipos de câncer, sendo relacionada a mau prognóstico. Seus produtos estão relacionados à angiogênese e metástase em diferentes níveis, além de terem papel na supressão da resposta imune local no ambiente tumoral e na apoptose (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

O fato de a goniotalamina inibir a progressão do tumor de Ehrlich, que tem um componente inflamatório importante para seu desenvolvimento (o que foi comprovado com a atividade do Piroxicam sobre esse modelo), estimulou a realização de estudos acerca da atividade da goniotalamina em modelos de inflamação.

5 – Atividade da goniotalamina em modelos de inflamação

O processo inflamatório é caracterizado pela produção de prostaglandinas, leucotrienos, histamina, bradicinina, fator ativador de plaquetas e pela liberação de agentes químicos pelo tecido e células migratórias (Mazzon *et al*, 2011). A compreensão da ação anti-inflamatória requer conhecimento sobre os mecanismos básicos da reação inflamatória.

A reação inflamatória corresponde aos eventos que ocorrem nos tecidos em resposta a um patógeno ou substância nociva, englobando dois componentes: uma resposta inata não-adaptativa e uma resposta imunológica específica. Inicialmente tem-se a resposta inata, que é disparada com o reconhecimento por macrófagos teciduais de padrões moleculares específicos associados a patógenos ou ao agente nocivo. Essa interação leva à produção das principais citocinas pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina-1 (IL-1), que vão atuar nas células endoteliais vasculares de vênulas pós-capilares, promovendo aumento de permeabilidade e exsudação de líquidos (eventos vasculares). Essas citocinas promovem também o aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície das células vasculares e de neutrófilos, favorecendo a migração celular até o local da lesão (eventos celulares). O exsudado é transportado por vasos linfáticos até gânglios e tecidos linfóides, onde produtos de microorganismos invasores podem então iniciar uma resposta imune específica (Rang *et al*, 2004).

O aumento de permeabilidade vascular com exsudação de líquido contém os componentes das cascatas enzimáticas que dão origem aos mediadores da inflamação: a bradicinina, proveniente do sistema das cininas e os componentes C3a e C5a do sistema complemento. A bradicinina promove aumento de permeabilidade vascular decorrente de sua ação direta e também por estimular a síntese de outros mediadores inflamatórios. Já as frações do complemento C3a e C5a estimulam os mastócitos a liberarem histamina, que promove a dilatação de arteríolas locais. Além desses mediadores, as reações antígeno-anticorpo e a própria lesão celular promovem estímulos que levam à liberação de ácido araquidônico por ação de fosfolipase A₂ (PLA₂), que será metabolizado em uma série de cascatas que levam à síntese de outros mediadores inflamatórios, como os leucotrienos, prostaglandinas e outras quimiotaxinas, amplificando a resposta inflamatória (Rang *et al*, 2004).

Os eventos celulares derivam da atração de neutrófilos até o local da lesão, por quimiotaxinas, onde haverá o reconhecimento e fixação dessas células aos microorganismos existentes na região de inflamação e então a fagocitose (Rang *et al*, 2004).

Tendo conhecimento dos mecanismos básicos da resposta inflamatória, o estudo da avaliação de atividade anti-inflamatória foi realizado inicialmente em modelo de edema de pata induzido por carragenina, que simula as diversas etapas da reação inflamatória, e posteriormente em modelos de inflamação induzida por diferentes mediadores.

5.1 – Edema de pata induzido por Carragenina

O modelo de inflamação induzida por carragenina é comumente utilizado para avaliar o efeito de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), sendo útil para avaliar a contribuição de mediadores envolvidos nas alterações celulares durante o processo inflamatório (Mazzon *et al*, 2011). A inflamação aguda gerada pela carragenina está relacionada com a infiltração de neutrófilos que produzem radicais livres como o superóxido e radicais hidroxilas, bem como com a liberação de outros mediadores relacionados com estímulo inflamatório (Salvemini *et al*, 1996).

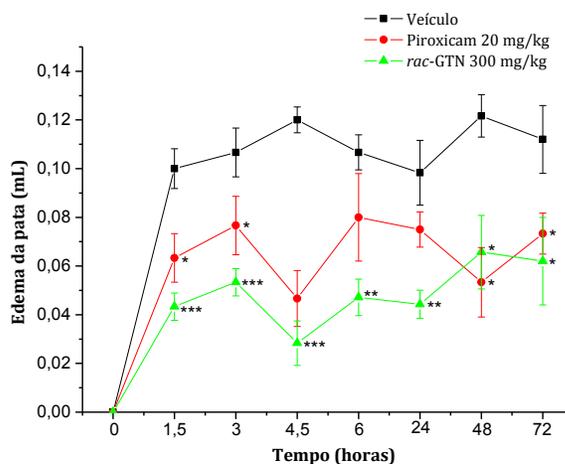
Em camundongos esse modelo apresenta duas fases distintas: uma fase inicial, que se inicia imediatamente após o inóculo da carragenina e permanece por até 6 horas, enquanto que a fase tardia tem início após 6 horas e produz um pico entre 48 e 72 horas (Posadas *et al*, 2004; Nunes *et al*, 2007). Pode-se dizer ainda que dentro da fase inicial, a primeira hora é livre de prostaglandinas, sendo caracterizada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina, não sendo portanto efetivamente inibida por AINEs (Mazzon *et al*, 2011). Nessas seis primeiras horas há a participação de serotonina, PLA₂, histamina, cininas, metabólitos derivados de ácido aracdônico (prostaglandinas e leucotrienos) e óxido nítrico (NO), enquanto que os mediadores na fase tardia produzem um edema dependente da mobilização de neutrófilos, aumento da expressão de COX-2, diminuição da produção de NO, com migração de monócitos e macrófagos (Nunes *et al*, 2007; Pedernera *et al*, 2010; Fröde *et al*, 2001).

Na dose de 300 mg/kg a *rac*-GTN inibiu a primeira fase do processo e manteve o edema sob controle até o final do experimento. Comparativamente o Piroxicam também atuou na primeira fase, mas deixa de exercer efeito após 6 horas de experimento, voltando a atuar somente no segundo pico do processo, após 48 horas (Figura 27). A dose de 100 mg/kg produziu modesta redução do edema na primeira fase, atuando de forma mais expressiva na segunda fase edematogênica. Já a menor dose de *rac*-GTN (30 mg/kg) reduziu o edema somente após 48 horas (Figura 28). Ao final do experimento todos os tratamentos inibiram significativamente o edema inflamatório em relação ao controle negativo ($p > 0,05$) (Figuras 27 e 28) (Vendramini-Costa *et al*, 2010).

A inibição das fases iniciais da inflamação observada no tratamento onde a goniotalamina foi administrada na maior dose é interessante, pois os mediadores envolvidos nessa etapa (bradicinina, histamina, serotonina, PLA₂) são fundamentais para a manutenção do quadro inflamatório, sendo intimamente relacionados com o aumento da permeabilidade vascular e o extravazamento de líquidos para o plasma, processos que contribuem para a ativação da resposta celular e migração neutrofílicas aos sítios de inflamação. Uma vez que exista inibição dessa etapa, todas as outras serão inibidas por consequência. Doses menores não foram capazes de bloquear o efeito agudo desses mediadores, inibindo somente fases

mais tardias do processo, ou seja, quando a expressão de COX-2 no tecido atinge seu pico (Nunes *et al*, 2007).

Figura 27 - Atividade da goniotalamina e do Piroxicam em modelo de edema de pata induzido por carragenina

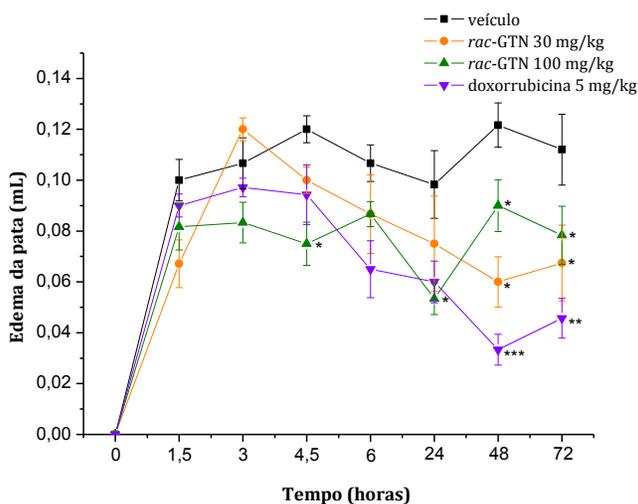


Efeito da *rac*-GTN sobre o modelo de edema de pata induzido por carragenina, expresso em edema da pata (mL) por tempo após a indução da inflamação. Os camundongos foram tratados com *rac*-GTN (300 mg/kg), salina 0,9% + tween 80 ou Piroxicam (20 mg/kg), 30 minutos antes da inoculação intraplantar de carragenina 2,5%. O edema de pata foi avaliado em hidropletismômetro 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 24, 48 e 72 horas após a indução da inflamação. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, estatisticamente diferentes do grupo tratado com veículo (ANOVA).

A possível atividade anti-inflamatória da doxorrubicina (5mg/kg) também foi avaliada, havendo redução do edema inflamatório a partir de 24 horas após a indução de inflamação (Figura 28), que foi mantido por toda a fase tardia, quando ocorre intensa mobilização de neutrófilos e envolvimento de leucotrienos, caracterizando a resposta celular. Provavelmente o tratamento com a doxorrubicina interferiu na produção/mobilização de células de defesa, o que corrobora com sua conhecida ação sobre as células de rápida proliferação, como as medulares, levando à leucopenia. A atividade apresentada pela doxorrubicina é similar à apresentada por *rac*-GTN na dose de 30 mg/kg, sendo que o perfil de atividade apresentado pela goniotalamina é dependente da dose: doses

elevadas inibem todas as fases inflamatórias, enquanto que doses mais baixas atuam na fase tardia do processo inflamatório, como o quimioterápico (Vendramini-Costa *et al*, 2010). Esse fato também corrobora com o que foi observado no tratamento com *rac*-GTN na dose de 30 mg/kg no modelo ascítico de Ehrlich, quando os animais apresentaram leucopenia (Figura 25).

Figura 28 - Atividade da goniotalamina e da doxorrubicina em modelo de edema de pata induzido por carragenina



Efeito da *rac*-GTN sobre o modelo de edema de pata induzido por carragenina, expresso em edema da pata (mL) por tempo após a indução da inflamação. Os camundongos foram tratados com *rac*-GTN (30 e 100 mg/kg), salina 0,9% + tween 80 ou doxorrubicina (5 mg/kg), 30 minutos antes da inoculação intraplantar de carragenina 2,5%. O edema de pata foi avaliado em hidropletismômetro 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 24, 48 e 72 horas após a indução da inflamação. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, estatisticamente diferentes do grupo tratado com veículo (ANOVA).

Certos tipos de câncer induzem a formação de um microambiente inflamatório, que tem como objetivo contribuir no desenvolvimento do tumor (Walczak, 2011). Como já citado, Hanahan & Weinberg (2011), em sua revisão sobre os *hallmarks* do câncer, incluíram a inflamação como um processo facilitador, pois fornece moléculas bioativas tais como fatores de crescimento e sobrevivência, fatores angiogênicos, enzimas que modificam

a matrix extracelular, entre outros. Em certos casos, a inflamação é evidente já nos primeiros estágios da progressão tumoral, promovendo o desenvolvimento do tumor ou propiciando às células tumorais a evolução gênica, visto que a ação de células inflamatórias pode levar à liberação de agentes mutagênicos (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

No microambiente tumoral, as células do sistema imune e as endoteliais são recrutadas a produzir mais mediadores pró-inflamatórios, incluindo eicosanóides e fatores angiogênicos e de crescimento (Wang & Dubois, 2010). Prostaglandinas e leucotrienos são promotores tumorais devido ao seu papel na relação entre as células tumorais e o estroma, estabelecendo um microambiente que facilita a angiogênese e impede o ataque do sistema imune. Além disso, modulam a proliferação, diferenciação tumoral, apoptose e interferem na migração e invasividade das células tumorais (Wang & Dubois, 2010).

Tumores sólidos estão entre as principais causas de morte nos países ocidentais e sua incidência cresce a cada ano. Embora o prognóstico desses pacientes tenha evoluído na última década em virtude do diagnóstico precoce e das terapias antitumorais, existe ainda a necessidade de novos tratamentos (de Groot *et al*, 2007). Portanto, a inibição das fases inicial e tardia do processo inflamatório pela goniotalamina pode contribuir como adjuvante ao tratamento quimioterápico.

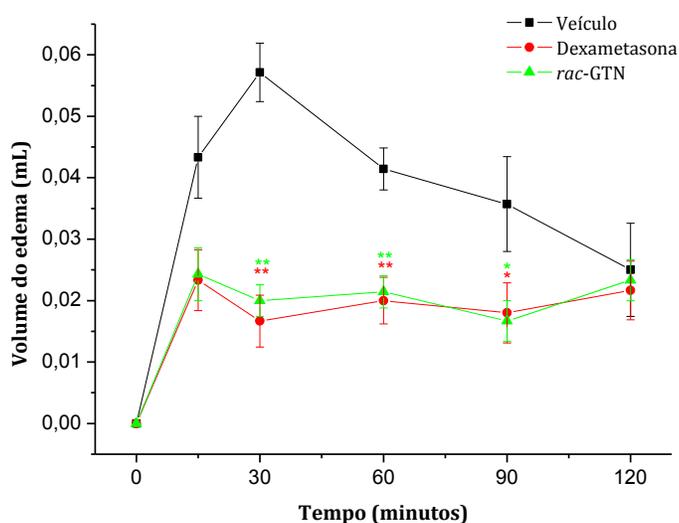
A fim de melhor investigar a atividade anti-inflamatória da goniotalamina, sua atividade sobre os mediadores que atuam nas diferentes fases do processo inflamatório foi avaliada. Para tanto foi selecionada a dose de 300 mg/kg, que foi ativa em todas as fases inflamatórias produzidas pela carragenina.

5.2 – Edema de pata induzido por Fosfolipase A₂

A fosfolipase A₂ (PLA₂) produziu edema inflamatório verificado já na primeira avaliação (15 minutos), havendo um pico inflamatório aos 30 minutos, que a seguir passou a diminuir (Figura 29). A atividade anti-edematogênica de *rac*-GTN foi verificada já na primeira avaliação, quando houve inibição de 44,0±26,2%. O pico inflamatório foi reduzido em 65,0±11,1%, sendo que nas avaliações subsequentes (60 e 90 minutos) a inibição foi de 48,3±16,7% e 53,3±22,9% respectivamente (p<0,05). De forma interessante,

rac-GTN apresentou perfil de atividade semelhante à dexametasona, que reduziu o edema inflamatório em 46,2±28,0% após 15 minutos, em 70,8±18,1% na segunda avaliação (30 minutos) e em 51,7±24,1% e 49,6±30,7% após 60 e 90 minutos da indução, respectivamente (p<0,05).

Figura 29 - Atividade da goniotalamina em modelo de edema de pata induzido por Fosfolipase A₂



Efeito de *rac*-GTN sobre o edema de pata induzido por fosfolipase A₂ de veneno de *Naja naja*, expresso como volume de edema (mL) por minuto após a indução de inflamação. Os animais foram tratados com *rac*-GTN (300 mg/kg), salina 0,9% + tween 80 ou dexametasona (1 mg/kg), 30 minutos antes do inóculo intraplantar de fosfolipase A₂, 5 µg/animal. O volume de edema foi avaliado em hidropletismômetro 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a indução de inflamação. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001, estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo (ANOVA).

A fosfolipase A₂ (PLA₂) hidrolisa glicerolipídios de membrana na posição sn-2, o que é seguido de uma liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídios. A PLA₂ é então translocada do citosol para a membrana perinuclear, processo dependente de Ca²⁺ e da ativação por fosforilação dependente de quinases ativadas por mitógenos, quando então hidrolisa preferencialmente fosfolipídios que contém ácido aracdônico (AA). O ácido aracdônico será utilizado nas cascatas enzimáticas de ciclooxigenases (COX) e

lipooxigenases (LOX) para produzir eicosanóides, incluindo prostaglandinas e leucotrienos. Estes fatores atuam promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, o que culmina no extravasamento de líquidos e na formação do exsudado inflamatório. Além disso, o ácido aracdônico participa também da síntese de quimiocinas, que atraem a migração de leucócitos para o local da inflamação (Rang *et al*, 2004; Tai *et al*, 2010; Wang & Dubois, 2010; Murakami *et al*, 2011).

Os glicocorticóides, como a dexametasona, interagem com receptores intranucleares, ativando a expressão de genes para a lipocortina, que sequestra o substrato fosfolipídico ou inibe diretamente a ação da PLA₂, não havendo, portanto, a hidrólise de fosfolipídios de membrana e a disponibilização de aracdonato. O resultado final desta ação é a inibição da liberação de eicosanóides, PAF (fator de agregação plaquetária) e histamina, além de inibição da expressão de genes para diversas proteínas inflamatórias, como citocinas, fatores de adesão celular, COX-2, iNOS, havendo também diminuição da concentração plasmática de componentes do sistema complemento (Rang *et al*, 2004; Barnes, 2010; Faiçal & Uehara, 1998).

A atividade apresentada pela goniotalamina nesse modelo foi semelhante à apresentada pela dexametasona, sugerindo uma ação sobre a PLA₂ ou sobre enzimas específicas da cascata de formação de eicosanóides. Tal atividade seria interessante, pois os produtos da cascata da PLA₂ (a prostaglandina, por exemplo) são fatores de crescimento tumoral (Stewart & Gera, 2006). Além disso, outros estudos indicam que a cPLA₂ (Fosfolipase A₂ citosólica) atua na promoção tumoral, contribuindo com a sobrevivência de células endoteliais, crescimento, migração e formação de novos vasos. Tais ações foram comprovadas em células deficientes em PLA₂ e também em células que receberam tratamentos com seus inibidores, havendo deficiências no processo angiogênico (Tosato *et al*, 2010).

Outro ponto onde poderia haver ação da goniotalamina é na indução da cPLA₂: TNF α , IL-1 e NF- κ B podem induzir a liberação de cPLA₂ (Sundarraaj *et al*, 2012). TNF α e IL-1 são citocinas pró-inflamatórias, moléculas sinalizadoras que possuem papel fundamental na resposta inflamatória e imune, através da modulação de diversas funções celulares, sendo secretadas em resposta a injúrias produzidas por carcinógenos, infecções e

inflamação (Mazzon *et al*, 2011). Essas citocinas, na maioria das vezes, ativam o fator de transcrição NF- κ B, que regula a transcrição de uma série de fatores pró-inflamatórios e tumorais, dentre eles a PLA₂, favorecendo a carcinogênese. A modulação de fatores envolvidos nas vias dessas citocinas ou na cascata do NF- κ B poderia levar à inibição da atividade da PLA₂, o que estaria coerente com a inibição apresentada pela maior dose de goniotalamina no modelo de inflamação induzida por carragenina, quando houve inibição do edema já na primeira hora. Sabe-se que o TNF α está intimamente relacionado aos processos de quimioatração, adesão e migração de neutrófilos: inibindo-se sua atividade, a fase celular da inflamação estará comprometida (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

5.3 – Edema de pata induzido pelo composto 48/80 (liberação de histamina e serotonina)

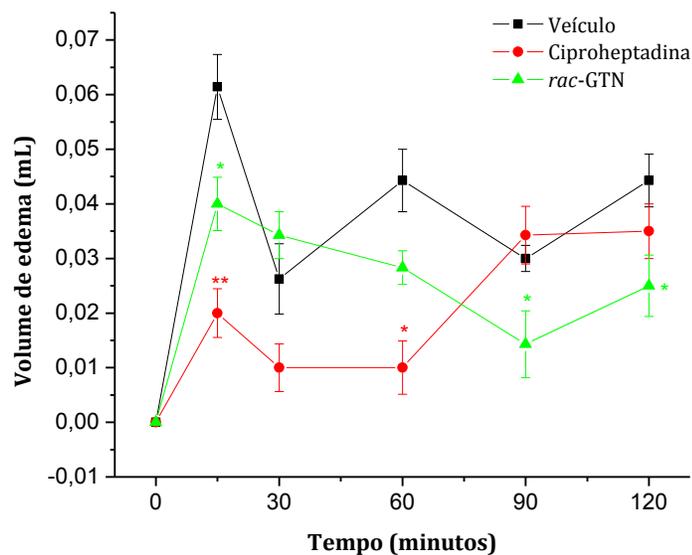
O composto 48/80 é uma substância polibásica constituída de uma mistura de polímeros de baixo peso molecular. Age induzindo uma rápida liberação de serotonina e principalmente histamina pelos mastócitos localizados no tecido, sendo que essa liberação ocorre dentro de minutos após o estímulo. O estímulo dos mastócitos leva ainda à liberação de outros mediadores, como os metabólitos do ácido aracdônico (prostaglandinas e leucotrienos), citocinas e quimiocinas, que são liberadas mais tardiamente (Penissi *et al*, 2009).

O composto 48/80 produziu um pico inflamatório após 15 minutos da administração, o qual reduziu em 53,5% na avaliação de trinta minutos, seguindo-se um aumento e manutenção deste nas avaliações subsequentes (Figura 30). O controle positivo (ciproheptadina) apresentou atividade até uma hora após a injeção de 48/80 inibindo em 67,4 \pm 17,8% o edema após quinze minutos de indução e em 59,1 \pm 40,9% e 77,4 \pm 29,2% após trinta e sessenta minutos da indução, respectivamente ($p < 0,05$).

A goniotalamina inibiu a formação do pico inflamatório (34,9 \pm 21,0%), proporcionando uma diminuição gradativa do edema inflamatório até a avaliação de noventa minutos (36,0 \pm 16,9%), quando o volume de edema volta a aumentar, porém ainda

sendo estatisticamente menor que o volume apresentado pelo controle negativo ($43,6 \pm 31,0\%$), $p < 0,05$.

Figura 30 - Atividade da goniotalamina em modelo de edema de pata induzido pelo composto 48/80 (liberação de serotonina e histamina)



Efeito de *rac*-GTN sobre o edema de pata induzido por histamina e serotonina, expresso como volume de edema (mL) por minuto após a indução de inflamação. Os animais foram tratados com *rac*-GTN (300 mg/kg), salina 0,9% + tween 80 ou ciproheptadina (4 mg/kg), 30 minutos antes do inóculo intraplantar do composto 48/80 (histamina/serotonina), 10 μ g/animal. O volume de edema foi avaliado em hidropletismômetro 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a indução de inflamação. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo (ANOVA).

A histamina é uma amina básica formada a partir da histidina pela histidina-descarboxilase, sendo liberada por basófilos e principalmente por mastócitos durante reações inflamatórias e alérgicas. Componentes do sistema complemento C3a e C5a presentes no exsudado inflamatório interagem com receptores específicos na superfície celular, estimulando a liberação de histamina, que também pode ocorrer por estímulo proveniente da interação de antígeno com anticorpos IgE fixados às células. Esse mediador

irá então promover a dilatação de arteríolas e vênulas pós-capilares, havendo aumento de permeabilidade vascular (Rang *et al*, 2004).

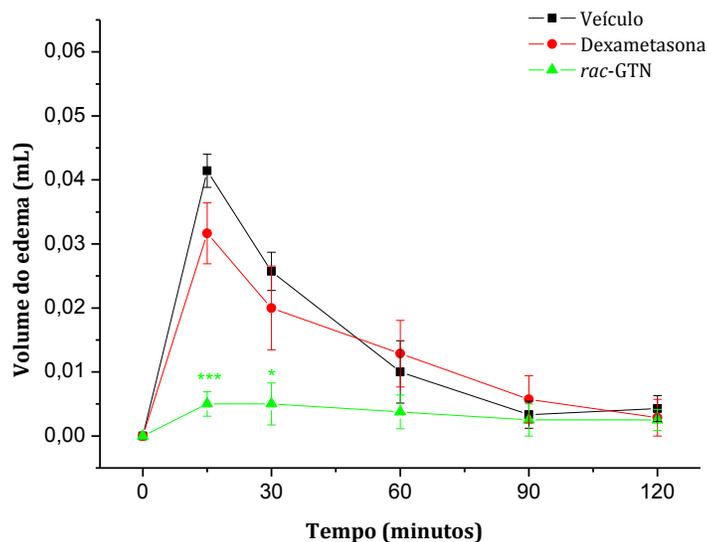
A atividade apresentada pela goniotalamina não foi tão eficiente quanto a da ciproheptadina (antagonista dos receptores H₁ e 5-HT_{1A}), sugerindo uma ação independente de receptores. A molécula poderia atuar sobre os mastócitos inibindo a liberação de histamina e serotonina, que são indutores das fases subsequentes da inflamação, o que levaria também à inibição da produção de prostaglandinas e leucotrienos. Corroborando com os resultados observados, estudos apontam que lactonas α,β -insaturadas, como a goniotalamina, podem inibir a degranulação de mastócitos (Penissi *et al*, 2009).

Outra possibilidade seria uma ação sobre a permeabilidade vascular ou mediadores produzidos a partir desse processo, como a bradicinina por exemplo. Além disso, sabe-se que a cinase multifuncional Akt, mais especificamente a Akt 1, tem papel importante no extravasamento vascular induzido pela histamina, exercendo controle na magnitude desse processo, de forma que inibição dessa cinase leva à diminuição da permeabilidade vascular e da migração de leucócitos (Di Lorenzo *et al*, 2009). A via PI3K-Akt está também envolvida nos processos de sobrevivência, sinalizando para a inibição de apoptose, podendo ser outra possibilidade para a ação da goniotalamina, que poderia atuar regulando esse processo, como já discutido no item sobre atividade estrogênica (Li *et al*, 2003).

5.4 – Edema de pata induzido por Bradicinina

A bradicinina produziu um pico inflamatório máximo após 15 minutos, seguido por diminuição progressiva do edema (Figura 31). A goniotalamina inibiu a formação de edema, chegando à inibição máxima de $87,9 \pm 12,9\%$ nos primeiros quinze minutos e mantendo essa atividade mesmo após o término de estímulo pela bradicinina ($p < 0,05$). A fim de se avaliar o perfil de atividade de um corticóide nesse modelo, utilizou-se a dexametasona (Sigma[®]), que não foi capaz de inibir a formação de edema induzida por bradicinina em nenhum período (Figura 31).

Figura 31 - Atividade da goniotalamina em modelo de edema de pata induzido por Bradicinina



Efeito de *rac*-GTN sobre o edema de pata induzido por bradicinina, expresso como volume de edema (mL) por minuto após a indução de inflamação. Os animais foram tratados com *rac*-GTN (300 mg/kg), salina 0,9% + tween 80 ou dexametasona (1 mg/kg), 30 minutos antes do inóculo intraplantar de bradicinina, 50 µg/animal. O volume de edema foi avaliado em hidropletismômetro 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a indução de inflamação. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo (ANOVA).

A bradicinina é um peptídeo vaso ativo formado pela ação de enzimas sobre substratos protéicos denominados cininogênios. Foi reportada pela primeira vez por Rocha e Silva, em 1949, como um fator hipotensivo, liberado quando há mistura de plasma sanguíneo humano com veneno de *Bothrops jararaca* ou tripsina. A formação de bradicinina no cenário inflamatório ocorre a partir do aumento de permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento de plasma (Brown & Roberts, 2001). Nesse exsudado estão presentes a pré-caliceína (precursor inativo da enzima proteolítica caliceína), o fator de Hageman (fator XII da seqüência de coagulação sanguínea e ativador fisiológico da ativação da caliceína), cininogênios de alto e baixo peso molecular, entre outros fatores. Em contato com superfícies de carga negativa, o fator de Hageman é ativado e sua

interação com a pré-caliceína a converte em sua forma ativa, promovendo então a formação de cininas, dentre elas a bradicinina, a partir de cininogênios (Rang *et al*, 2004).

Existem dois receptores para bradicinina: B₁ e B₂. O primeiro está ausente na maioria dos tecidos, sendo induzido por citocinas, principalmente a IL-1, em condições de inflamação e respondendo somente a metabólitos de bradicinina e não a ela propriamente. Já o receptor B₂ está presente constitutivamente, sendo ativado pela bradicinina, mas não por seus metabólitos (Campos & Calixto, 1995; Rang *et al*, 2004; Campanholle *et al*, 2010).

Os receptores de cininas são acoplados à proteína G, levando à ativação de fosfolipase C, com conseqüente produção de segundos mensageiros, tais como PI3K, DAG e cálcio. Tais segundos mensageiros vão sinalizar para diversas vias intracelulares, através da ativação de proteínas cinases C, MAPKs, transativação do receptor EGFR, PLA₂, que são vias envolvidas em proliferação, aumento de permeabilidade vascular e produção de mediadores inflamatórios (Roberts, 1989). A ação da bradicinina na inflamação se dá através do aumento de permeabilidade vascular, vasodilatação, liberação de NO e modulação da produção de prostaglandinas e histamina, sendo também um potente agente produtor de dor, por estimular terminações nervosas para essa via (Costa *et al*, 2006; Oliveira *et al*, 2010). Além disso, diversos estudos apontam para a relação de bradicinina e desenvolvimento tumoral, havendo aumento de expressão de seus receptores em alguns tipos de tumor (Stewart *et al*, 2005; Stewart & Gera, 2006).

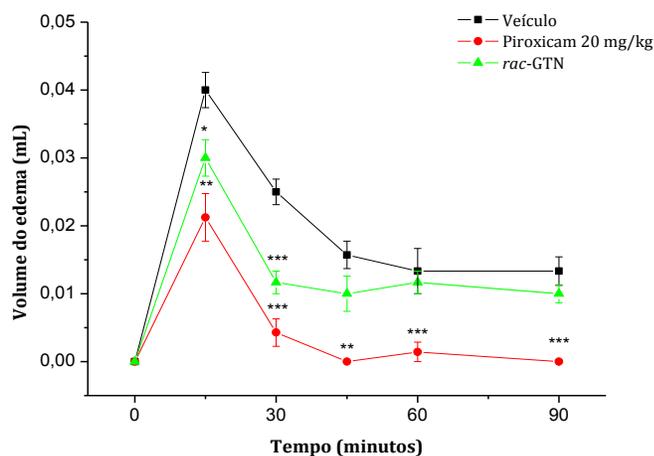
Sendo assim, a atividade apresentada pela goniotalamina nesse modelo pode ser decorrente da sua interação com os receptores desse peptídeo ou da sua atuação em cascatas subsequentes, inibindo diretamente a síntese de outros mediadores, como o NO ou os metabólitos derivados do ácido aracdônico, que podem ser produzidos sob estímulo da bradicinina. Diferentemente do ocorrido no modelo de edema de pata induzido por fosfolipase A₂, quando a goniotalamina atuou de forma semelhante ao corticóide, nesse modelo sua atividade foi distinta, sugerindo mecanismo de ação diferente do produzido pelo corticóide frente à bradicinina. Sabe-se que a dexametasona não atua sobre receptores B₂ de bradicinina, ponto onde a goniotalamina poderia estar atuando (Costa & Calixto,

1995). Estudos utilizando antagonistas específicos dos receptores de bradicinina (HOE140, por exemplo) contribuirão para elucidar esse possível mecanismo de ação.

5.5 – Edema de pata induzido por PGE₂

A PGE₂ produziu um pico inflamatório observado após 15 minutos, com diminuição subsequente (Figura 32). A atividade anti-edematogênica de *rac*-GTN foi verificada desde a primeira avaliação, quando houve inibição do pico inflamatório em 25,0±18,9%. A inibição máxima foi observada após 30 minutos da indução (53,3±16,3%), sendo que nas avaliações subsequentes (45, 60 e 90 minutos) *rac*-GTN perde sua atividade, mantendo o edema nos níveis do controle negativo (p<0,05). Já o piroxicam inibiu a formação do pico inflamatório em 46,9±24,8%, reduzindo gradativamente o edema até que este fosse completamente inibido 45 minutos após a indução.

Figura 32 - Atividade da goniotalamina em edema de pata induzido por PGE₂



Efeito de *rac*-GTN sobre o edema de pata induzido por prostaglandina E₂, expresso como volume de edema (mL) por minuto após a indução de inflamação. Os animais foram tratados com *rac*-GTN (300 mg/kg), salina 0,9% + tween 80 ou piroxicam (20 mg/kg), 30 minutos antes do inóculo intraplantar de prostaglandina E₂, 1 µg/animal. O volume de edema foi avaliado em hidropletismômetro 15, 30, 60 e 90 minutos após a indução de inflamação. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001, estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo (ANOVA).

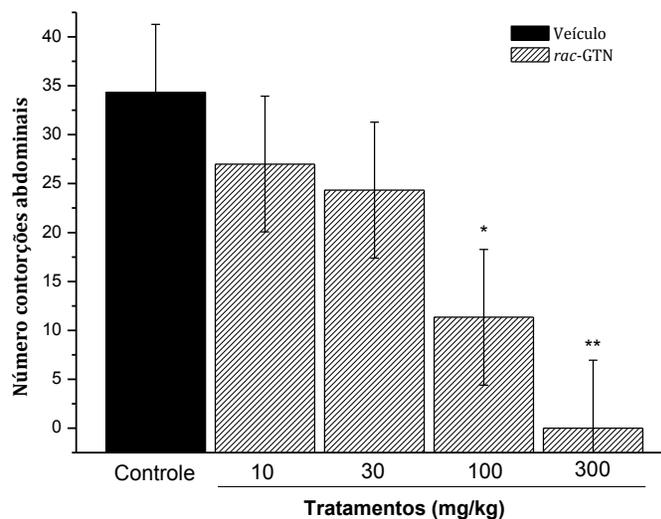
O piroxicam é um anti-inflamatório não-esteroidal (AINE), classe de anti-inflamatórios que são inibidores específicos da enzima ciclo-oxigenase (COX). Estas enzimas transformam o ácido aracdônico em prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) (Bertagnolli *et al*, 2008). Portanto, espera-se que inibidores específicos de COX apresentem maior potência nesse modelo, ainda que o piroxicam atue mais sobre a isoforma constitutiva COX-1 do que sobre a isoforma induzida COX-2 (Carvalho *et al*, 2004). A ação da goniotalamina sobre o edema induzido por PGE₂ foi menos potente que a apresentada pelo piroxicam, podendo ser um indício de ação não específica sobre ciclo-oxigenases, atividade indireta no *feedback* positivo que a PGE₂ promove sobre a produção de COX-2 ou ainda sobre as ações desencadeadas por esse prostanóide. De fato, quando se analisa sua ação sobre os outros mediadores já estudados (PLA₂, histamina/serotonina, bradicinina), pode-se observar que a goniotalamina apresenta maior atividade sobre todos os outros modelos, indicando uma ação em mediadores muito iniciais no processo inflamatório ou sobre fatores comuns a todos esse processos, como os associados à vasodilatação e/ou migração de neutrófilos, por exemplo.

5.6 – Contorção abdominal induzida por ácido acético

Considerando que o processo inflamatório gera dor, a atividade da *rac*-GTN foi avaliada em modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético. Esse modelo é amplamente utilizado em triagens para compostos com atividades analgésicas ou anti-inflamatórias, por produzir uma resposta inflamatória associada à dor (Spíndola *et al*, 2012).

A administração intraperitoneal de solução de ácido acético 0,8% induziu dor inflamatória, traduzida pelo número de contorções abdominais registradas por 15 minutos após o estímulo (Figura 33). Nos animais tratados com goniotalamina houve diminuição dose-dependente do efeito produzido pelo ácido acético, sendo que as doses de 10 e 30 mg/kg inibiram em 21,36% e 29,13% o número de contorções, sem diferenças estatísticas do controle negativo. Já as doses de 100 e 300 mg/kg inibiram em 67,0% e 100%, estatisticamente diferentes do grupo controle negativo.

Figura 33 - Atividade da goniotalamina em modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético



Efeito de *rac*-GTN sobre a dor inflamatória induzida por ácido acético 0,8%, traduzida pelo número de contorções abdominais em 15 minutos. Os animais foram tratados com *rac*-GTN (10, 30, 100 e 300 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9% + tween 80, 30 minutos antes da administração intraperitoneal de solução de ácido acético a 0,8%. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, estatisticamente diferentes do grupo tratado com veículo (ANOVA).

O estímulo produzido pelo ácido acético causa nocicepção por um mecanismo que envolve eicosanóides e aminas simpatomiméticas, que também estão envolvidas na hiperalgesia induzida por estímulos inflamatórios, como os da carragenina e lipopolissacarídeo. Além disso, a liberação de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas é secundária à liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-8$, o que demonstra a relação entre as vias inflamatórias e nociceptivas (Ribeiro *et al*, 2000). O ácido acético atua indiretamente, induzindo a liberação desses mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptivos via receptores presentes ao redor de pequenos vasos, que então sinalizam para o SNC (Spíndola *et al*, 2012).

Dessa forma, esperava-se alguma atividade da goniotalamina nesse modelo, reforçando novamente sua atividade anti-inflamatória. A inibição de 100% do estímulo pela

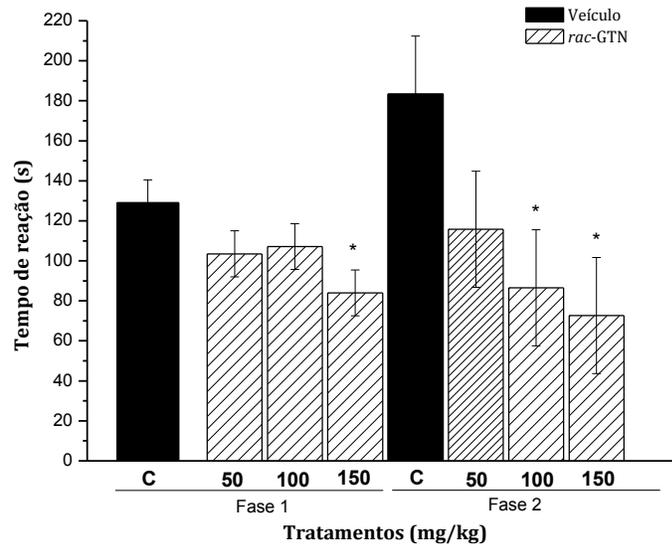
maior dose utilizada pode indicar uma ação direta sobre o SNC, antagonizando os efeitos simpatomiméticos, por exemplo. Para tanto, outros estudos devem ser realizados, em modelos que permitam analisar os efeitos sobre o SNC.

5.7 – Nociceção induzida pela Formalina

Com o objetivo de investigar a ação da goniotalamina sobre a dor neurogênica e inflamatória, sua atividade foi avaliada no modelo de dor induzida por formalina. A dor neurogênica é causada pela ativação direta dos terminais nervosos nociceptivos, enquanto que a dor inflamatória é mediada pela combinação de estímulo periférico e sensibilização da medula espinhal (Spíndola *et al*, 2012). A formalina produz aumento significativo de mediadores relacionados tanto com as vias neurogênicas (aminoácidos, cininas) quanto com as vias inflamatórias (prostaglandinas, leucotrienos), permitindo diferenciar a atuação nas duas vias que conduzem à nociceção (Santos *et al*, 2005).

O comportamento algíco provocado pela formalina é bifásico: uma fase aguda inicial (0-5 min, dor neurogênica) seguida de uma fase tônica, mais prolongada (25-40 min, dor inflamatória). A goniotalamina em sua maior dose inibiu ambas as fases, demonstrando uma possível ação sobre o SNC (Figura 34). Porém, sua ação foi mais intensa na segunda fase, a fase de dor inflamatória, quando houve inibição de 60,36%. Nessa segunda fase a dose de 100 mg/kg também produziu efeito, com inibição de 52,82%. Esses resultados sugerem que sua ação é mais intensa sobre a liberação de mediadores envolvidos com inflamação, tais como prostaglandinas e leucotrienos (Santos *et al*, 2005)

Figura 34 - Atividade da goniotalamina em modelo de nociceção induzida por formalina



Efeito de *rac*-GTN sobre a dor neurogênica e inflamatória induzida por formalina 1,2%, traduzida pelo tempo dispendido pelo animal lambendo ou mordendo a pata, em duas fases: a primeira nos primeiros 5 minutos após o estímulo e a segunda no período de 25-40 minutos após o estímulo. Os animais foram tratados com *rac*-GTN (50, 100 e 150 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9% + tween 80, 30 minutos antes da administração intraperitoneal de solução de formalina 1,2% * $p < 0,05$, estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo (ANOVA).

Observações gerais acerca da atividade anti-inflamatória da goniotalamina

A goniotalamina reduziu o processo inflamatório em todos os modelos estudados. Inibiu o edema inflamatório produzido pela carragenina em todas as fases, sugerindo uma ação no início do processo inflamatório, com mecanismos que podem ter levado à inibição de toda a cascata inflamatória subsequente, ou então apresentando múltiplos mecanismos, atuando em diferentes etapas da inflamação. O edema induzido por histamina foi inibido pela molécula, o que sugere um mecanismo de inibição da liberação de histamina, porém independente dos receptores, já que seu perfil de atividade diferiu do perfil apresentado pela ciproheptadina, antagonista específico de receptores H_1 e $5-HT_{1A}$. Bloqueando-se a liberação de histamina, inibe-se também a disponibilização de ácido aracdônico, o que leva à redução da síntese de eicosanóides, PAF e quimiocinas. Porém, o edema induzido por bradicinina foi também inibido pela goniotalamina, o que sugere uma ação concomitante à liberação de histamina, pois se sabe que a bradicinina é formada a partir de precursores presentes no exsudado inflamatório liberado logo após o estímulo inflamatório, sendo então, juntamente com a histamina, um dos primeiros mediadores inflamatórios a agirem na cascata inflamatória. Inibindo-se a liberação de bradicinina, inibe-se um dos estímulos para formação de eicosanóides, por inibição da ação da fosfolipase A_2 . Por outro lado, o edema estimulado por esse mediador também foi inibido pela goniotalamina, de maneira semelhante ao corticóide dexametasona, que age especificamente nessa via inflamatória, porém sua ação sobre a bradicinina é distinta da do corticóide, que sabidamente não atua sobre receptores B_2 de bradicinina, indicando um mecanismo de ação distinto. A ação apresentada no edema induzido por PGE_2 indica atuação no *feedback* positivo estimulado por este prostanóide: a presença de PGE_2 no tecido leva ao aumento de permeabilidade vascular, que ativar a liberação de outros mediadores inflamatórios, tais como a histamina e a bradicinina, que então sinalizarão para a produção de mais prostaglandinas e leucotrienos. Inibindo-se a liberação de bradicinina ou histamina inibe-se também a formação de prostanóides. A ação da goniotalamina sobre a dor inflamatória induzida por ácido acético é confirmada no modelo de nocicepção induzida por formalina, quando há

maior potência na segunda fase do experimento, que conta com a liberação de mediadores inflamatórios.

Relação câncer-inflamação

Haveria um *link* entre a atividade antitumoral e anti-inflamatória produzida pela goniotalamina? Nessa interrelação inflamações crônicas podem favorecer o desenvolvimento tumoral e o tumor pode favorecer o surgimento de uma resposta inflamatória. O ambiente tumoral é sustentado por células acessórias, dentre elas muitas células envolvidas no processo inflamatório. Dessa forma, a atividade sobre o esse processo pode ser um alvo terapêutico no tratamento dos diferentes tipos de câncer e nesse sentido a goniotalamina apresenta grande potencial.

O interesse na relação câncer-inflamação surgiu à medida que a bibliografia acerca da biologia tumoral mudou de perfil, pois antes os trabalhos tratavam muito mais das características da célula tumoral. Porém, com o tempo ficou claro que os tumores não poderiam ser delineados e entendidos somente a partir das células e seus genes e gradualmente o câncer foi sendo considerado uma doença de tecidos, de comunicações e circuitos, onde células mutadas, que se expandem clonicamente, carregam vantagens e coordenam seu ambiente através de sinais e conexões, liga e desliga, num circuito orientado para a expansão e sobrevivência que depende amplamente do suporte de células acessórias (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

Aliado a isso está o fato de que cerca de 25% dos tumores são provenientes de inflamações crônicas (Schetter *et al*, 2010). Inflamações crônicas estão relacionadas com diversas patologias, tais como doenças cardiovasculares, diabetes, artrite reumatóide, Alzheimer, doenças pulmonares, desordens autoimunes e câncer (Aggarwal *et al*, 2006). Quando crônica, a inflamação leva à remodelação tecidual excessiva, perda da arquitetura tecidual e a modificações no DNA e proteínas, como consequência do stress oxidativo provocado pelos mediadores liberados, o que aumenta os riscos para o desenvolvimento de câncer (Visser *et al*, 2006).

Dentre os tipos de câncer mais influenciados pelo ambiente inflamatório está o câncer colorretal (CCR). As doenças inflamatórias intestinais constituem os maiores fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer, sendo elas a retocolite ulcerativa crônica e a doença de Crohn, as quais compartilham diversas características inflamatórias incluindo ativação imune, infiltração leucocitária nos tecidos e aumento da densidade vascular (Cromer *et al*, 2011).

Grande parte do progresso recente no entendimento da imunidade da mucosa intestinal e da patofisiologia do intestino foi alcançada graças ao desenvolvimento de novos modelos animais de inflamação intestinal, que são divididos em cinco categorias: (i) modelos de *knockout* gênico; (ii) modelos envolvendo camundongos e ratos transgênicos; (iii) modelos de colite espontânea; (iv) modelos de colite induzida e (v) modelos de transferência em animais imunodeficientes (Jurjus *et al*, 2004).

A administração do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) por via intra-retal, modelo de inflamação induzida, é considerado o mais adequado para o estudo dos efeitos de novos compostos sobre a doença inflamatória intestinal, pois é a técnica que melhor simula o que ocorre em caso de doença inflamatória intestinal em humanos (Jurjus *et al.*, 2004)

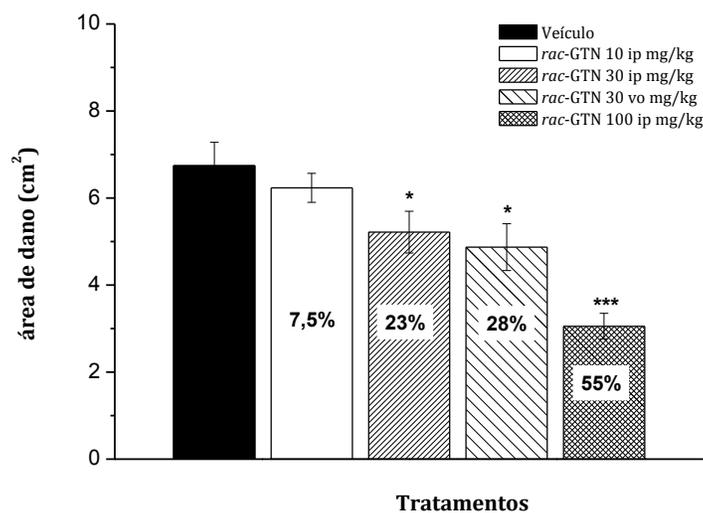
Tendo isso em vista, pensamos em avaliar a atividade da goniotalamina em modelos de colite, devido à importância desse tipo de inflamação no processo de carcinogênese que leva ao CCR. A Divisão de Farmacologia e Toxicologia – CPQBA – Unicamp mantém uma colaboração com alguns grupos da Espanha e Portugal, a rede CIBEP, dentre eles o grupo coordenado pela prof. Dra. Virginia Motilva, Faculdade de Farmácia da Universidade de Sevilla, que desenvolve modelos de colite induzida e espontânea. Dessa forma, realizei um estágio de seis meses (setembro de 2010 a fevereiro de 2011) no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Farmácia, Universidade de Sevilla, onde foram desenvolvidos os modelos de colite induzida por TNBS e colite espontânea em animais *knockouts* para a interleucina-10.

5.8 - Colite aguda e subaguda induzida por TNBS

- Colite subaguda induzida por TNBS

As análises de dano macroscópico do cólon revelaram que a atividade apresentada pela goniotalamina foi dose dependente, sendo que o grupo que recebeu menor dose não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo, a dose de 30 mg/kg - via i.p. inibiu em 23%, a maior dose inibiu 55% e o tratamento com a dose de 30 mg/kg, via oral, inibiu em 28% o dano macroscópico do tecido (Figura 35).

Figura 35 - Dano macroscópico nos cólons expostos ao TNBS, após tratamento com goniotalamina



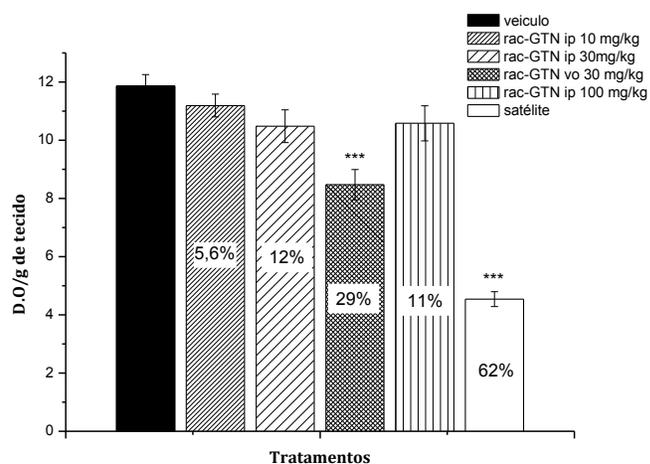
Área de dano macroscópico, em cm², decorrente da indução de colite por TNBS, 10 mg/kg, após tratamentos com *rac*-GTN nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, via i.p. e 30 mg/kg, via oral.* p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo (ANOVA).

O TNBS age por acoplamento dos grupos trinitrofenil às proteínas endógenas na lâmina própria, levando a uma resposta imune local. As proteínas são processadas e apresentadas às células T por células apresentadoras de antígeno, havendo também secreção excessiva de IL-12 e descontrole na resposta Th1 pelas células T. Em consequência dessa

resposta, há produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente interferon- γ , que estimula os macrófagos a produzirem citocinas pró-inflamatórias adicionais, como TNF α , IL-1 β e IL-6 (Strober *et al*, 1998). As citocinas relacionadas à resposta Th1 induzem a produção de moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios que atraem neutrófilos, promovendo sua aderência às células endoteliais vasculares (Talero *et al*, 2008). Há então um dano severo, decorrente da migração de granulócitos e macrófagos, além de intensa necrose local, levando também ao aumento de permeabilidade (Quaglio, 2011).

A goniotalamina diminuiu a área de dano macroscópico de maneira dose dependente, indicando ação sobre fatores que levam à permeabilidade vascular e/ou formação da necrose local, provavelmente por redução de citocinas pró-inflamatórias ou sobre a migração de granulócitos e macrófagos para o sítio inflamatório, resultados que corroboram com a diminuição do edema inflamatório induzido por diferentes mediadores. A fim de avaliar a ação sobre a ativação de neutrófilos e consequente migração, os níveis da enzima mieloperoxidase foram avaliados de acordo com Grisham *et al* (1999) (Figura 36).

Figura 36 - Atividade da goniotalamina sobre a ativação e migração de neutrófilos, avaliada através dos níveis de MPO



Atividade da goniotalamina sobre a ativação e migração de neutrófilos, traduzida a partir da D.O (densidade óptica) dos níveis da enzima mieloperoxidase por grama de cólon obtido dos diferentes grupos experimentais. Satélite: animal sem colite nem tratamento. *** p<0,001 estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo (ANOVA).

A enzima mieloperoxidase é encontrada predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo um marcador bioquímico que caracteriza a ativação desse tipo celular, com conseqüente migração para o sítio inflamatório e aumento de inflamação (Winterbourn & Brennan, 1997).

Pode-se observar que os tratamentos realizados por via i.p., mesmo os que levaram à redução do dano macroscópico no tecido, como é o caso das doses de 30 e 100 mg/kg, não impediram a ativação e conseqüente migração dos neutrófilos, caracterizando uma atividade anti-inflamatória posterior à esse evento, podendo ser inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo. Já o tratamento oral com a dose de 30 mg/kg inibiu em 29% a detecção da enzima, apresentando atividade sobre a ativação de neutrófilos. Dessa forma, pode-se inferir que provavelmente algum metabólito decorrente da metabolização da goniotalamina administrada pela via oral iniba a ativação e/ou migração de neutrófilos.

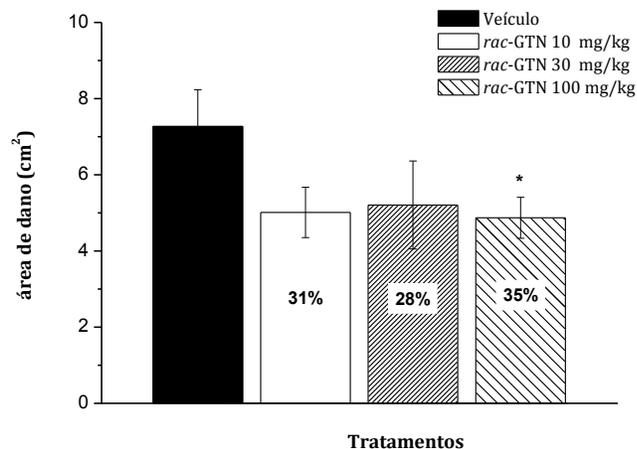
Como houve atividade da goniotalamina no modelo de colite subaguda, partiu-se para o modelo agudo, que consiste em maior dose de TNBS (30 mg/kg em 0,25 mL/animal) e tempo maior de experimento (14-21 dias) (Morris *et al*, 1989).

- Colite aguda induzida por TNBS

Os animais foram tratados com *rac*-GTN nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, via oral (Figura 37). A via oral foi escolhida por ter apresentado o melhor perfil de atividade no modelo subagudo, inibindo o dano macroscópico com dose intermediária de 30 mg/kg e reduzindo a ativação e migração de neutrófilos.

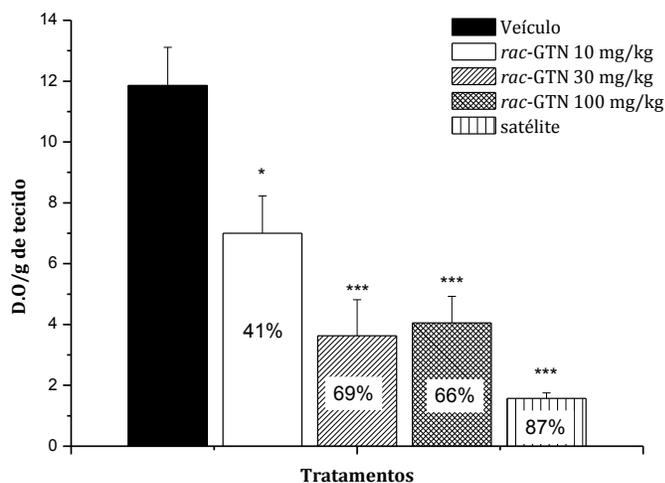
No modelo de colite aguda, com administração de maior concentração de TNBS, apenas o tratamento com a dose maior de goniotalamina apresentou atividade, inibindo em 35% a área de dano macroscópico. Porém, quando se observa a ação da goniotalamina sobre a mieloperoxidase (Figura 38), todas as doses inibiram a ativação de neutrófilos, o que significa que há atividade anti-inflamatória, mas que talvez o tempo de experimento não tenha sido suficiente para que a atividade sobre a área de dano macroscópico fosse significativa em relação ao controle negativo, havendo apenas uma tendência.

Figura 37 - Dano macroscópico nos cólons expostos ao TNBS, após tratamento com goniotalamina



Área de dano macroscópico, em cm², decorrente da indução de colite por TNBS, 10 mg/kg, após tratamentos com *rac*-GTN nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, via oral. * p<0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo (ANOVA).

Figura 38 - Atividade da goniotalamina sobre a ativação e migração de neutrófilos, avaliada através dos níveis de MPO



Atividade da *rac*-GTN sobre a ativação e migração de neutrófilos, traduzida a partir da D.O (densidade óptica) dos níveis da enzima mieloperoxidase por grama de cólon obtido dos diferentes grupos experimentais. * p<0,05, *** p<0,001 estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo (ANOVA).

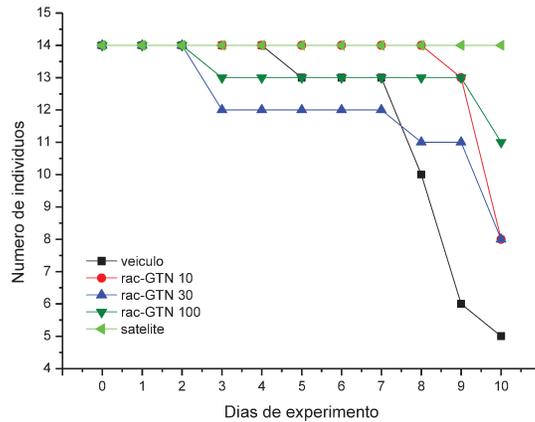
Espécies reativas de oxigênio estão envolvidas no desenvolvimento de injúrias teciduais em pacientes com IBD; o efeito anti-inflamatório dos corticóides no tratamento das IBDs é atribuído em parte à redução da infiltração leucocitária ao sítio inflamado, amenizando assim o insulto oxidativo (Witaicenis *et al*, 2012). Dessa forma, o efeito inibitório da goniotalamina sobre a ativação e migração leucocitária tem impacto importante sobre o desenvolvimento da injúria tecidual, diminuindo o dano causado pelo TNBS.

O modelo de colite aguda induzida por TNBS é um modelo desenvolvido em 14-21 dias (Talero *et al*, 2008), porém nesse caso apenas 35% dos animais do grupo controle negativo sobreviveram até o 10º dia, o que nos levou à interrupção do teste antes que os animais desse grupo controle fossem perdidos e nenhuma análise pudesse ser realizada. O fato de esses animais terem morrido pode ser devido a um lote de TNBS que não tivesse sido devidamente liofilizado, tornando-se mais agressivo aos animais. Independente do motivo de nesse experimento a indução de colite ter sido mais agressiva, nos grupos tratados com goniotalamina a ocorrência de óbitos foi menor que no controle negativo, indicando diminuição da agressividade e letalidade da colite (Figura 39).

Ao final do experimento, no grupo controle negativo havia apenas 5 animais vivos dos 14 que iniciaram o experimento (probabilidade de sobrevivência de 35%). Porém, nos grupos tratados com *rac*-GTN, doses de 10 e 30 mg/kg havia 8 animais (probabilidade de sobrevivência de 55%) e no grupo tratado com a dose de 100 mg/kg havia 11 (probabilidade de sobrevivência de 65%), indicando de fato uma ação da goniotalamina que acaba por prolongar a sobrevivência desses animais.

Pode-se concluir que a goniotalamina diminui o dano causado pelo TNBS quando administrada nas doses de 30 e 100 mg/kg, por via i.p. e oral. O mecanismo de ação dessa atividade ainda deve ser esclarecido através da dosagem de citocinas envolvidas nesse processo, porém a ação apresentada foi um bom indicativo para o prosseguimento dos estudos em modelo de inflamação crônica.

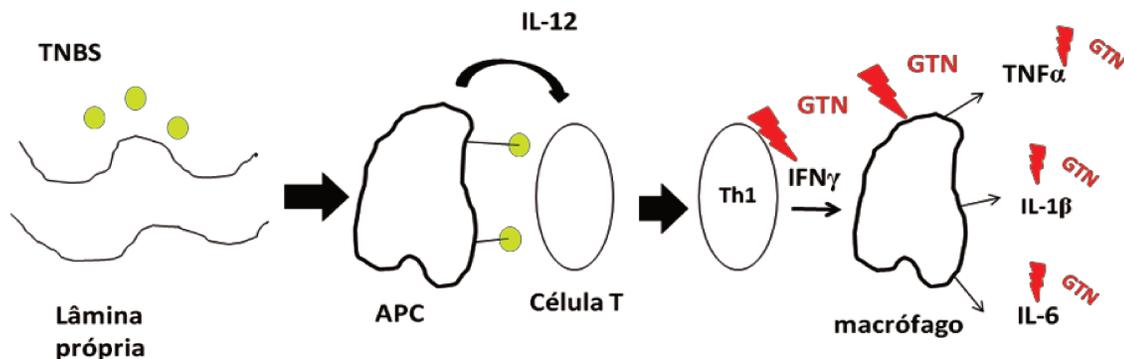
Figura 39 - Ocorrência de óbitos nos diferentes grupos durante o experimento de colite aguda induzida por TNBS



Ocorrência de óbitos por dia de experimento no modelo de colite aguda induzida por TNBS, sendo representada pela diminuição do número de indivíduos ao longo dos 10 dias de experimento.

O esquema a seguir (esquema 4) sugere alguns pontos onde a goniotalamina poderia atuar no processo inflamatório induzido pelo TNBS:

Esquema 4 - Hipótese da ação da goniotalamina no modelo de colite induzida por TNBS



Seqüência de eventos induzida pela administração de TNBS, levando à instalação de colite e possíveis alvos da goniotalamina. Adaptado de Strober, W.; Ludviksson, B.R.; Fuss, I.J. (1998). The Pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and crohn disease. *Ann. Intern. Med.*, 128:848-856. APC: célula apresentadora de antígeno. TNBS: ácido trinitro-benzeno-sulfônico. IFN: interferon.

Poderia haver inibição da produção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígeno, o que impediria a indução da resposta Th1 pelas células T, porém nesse caso haveria inibição total do processo inflamatório, o que não é o caso dos animais tratados com a goniotalamina. A inibição da produção e sinalização do IFN γ inibe a ativação de macrófagos e produção de citocinas importantes, tais como o TNF α , a IL-1 β e a IL-6, diminuindo a resposta inflamatória, o que poderia estar ocorrendo nos animais tratados com goniotalamina pela via oral, já que nesses tratamentos há diminuição da atividade da MPO. Adicionalmente, a goniotalamina poderia atuar diminuindo a expressão gênica para as citocinas pró-inflamatórias TNF α , a IL-1 β e a IL-6, o que modularia a resposta inflamatória e inibiria a liberação de substâncias que aumentam a permeabilidade intestinal, evitando a exposição das células T na lâmina própria aos antígenos da mucosa.

A inibição da colite induzida pelo TNBS nos modelos agudo e subagudo com a administração por via oral da *rac*-GTN direcionaram o estudo em modelo de colite espontânea em camundongos *knockouts* para interleucina-10, utilizando a dose de 30 mg/kg, por via oral.

5.9 – Colite espontânea em camundongo knockout para IL-10

O fato de que muitos dos pacientes com doenças inflamatórias intestinais apresentam genótipo para baixa produção de IL-10 sugeriu estudos em modelo que envolvesse a deleção genética de IL-10 (Scheinin *et al*, 2003). A enterocolite crônica desenvolvida por animais que apresentam tal deleção é aparentemente associada à produção desregulada de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1, semelhante ao que ocorre na doença de Crohn (Sheil *et al*, 2007).

A IL-10 é produzida por linfócitos Th2, além de ser produzido por macrófagos ativado, células dendríticas e células B1, podendo atuar também na regulação da expressão de IL-4 e IL-5 por linfócitos Th2. É uma citocina imunossupressora chave, que age diretamente nas células apresentadora de antígenos (APC), inibindo a secreção de IL-12 e indiretamente inibindo a ativação de células T (Gomes-Santos *et al*, 2012). Além disso, a IL-10 atua inibindo outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α , o

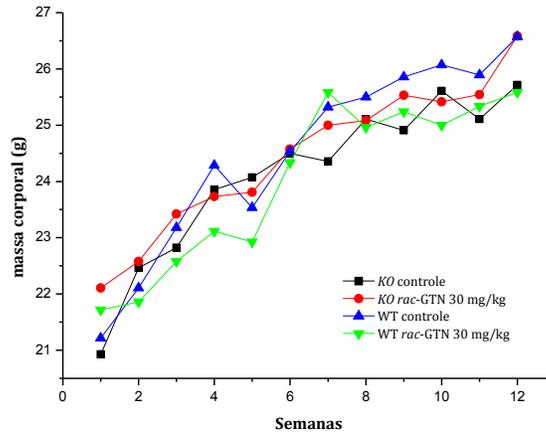
que constitui um freio para a evolução de inflamações agudas a crônicas, protegendo o desenvolvimento de colites (Wilson *et al*, 2010).

Animais deficientes em IL-10 desenvolvem espontaneamente enterocolite quando mantido em ambientes convencionais, porém quando mantidos em condições SPF (*specific pathogen free*) desenvolvem inflamação restrita ao cólon, sugerindo que a flora bacteriana entérica tem papel fundamental no desenvolvimento de colite espontânea nesses animais (Sellon *et al*, 1998).

A histopatologia da colite crônica em animais *knockouts* para IL-10 é caracterizada por displasia epitelial e infiltrados inflamatórios na mucosa e submucosa. O infiltrado inflamatório consiste em número pequeno a moderado de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, células plasmáticas e macrófagos, podendo atingir a barreira transmural do intestino. Os adenocarcinomas formados são histologicamente semelhantes aos de paciente com doença inflamatória intestinal, porém diferente do que ocorre nestes pacientes, em animais IL-10 *KO* não há envolvimento de genes como *K-ras*, *p53*, *APC* e *MSH* (Kanneganti *et al*, 2011). Portanto, apesar de não ser um modelo que simule todas as condições reais do quadro de doenças intestinais em humanos, é um ponto inicial para estudo de compostos que tenham ação em modelo subcrônico de inflamação e que dessa forma possam prevenir a formação de tumores.

Os animais provenientes do Charles River, França, chegaram à Universidade de Sevilla com 5 semanas de idade, quando foram mantidos em condições normais, ou seja, fora das condições SPF. Após uma semana os tratamentos foram iniciados, tendo sido três vezes por semana, por três meses. Não foram observadas diferenças de peso corporal entre os grupos *wild type* (WT) e *KO*, com ou sem tratamento, bem como nenhum sinal grave de toxicidade relativo ao tratamento subcrônico com a goniotalamina na dose de 30 mg/kg, via oral, o que é um bom indício acerca da ausência de toxicidade da molécula, mesmo após 3 meses de tratamento (Figura 40).

Figura 40 - Massa corporal dos animais ao longo de 12 semanas de experimento

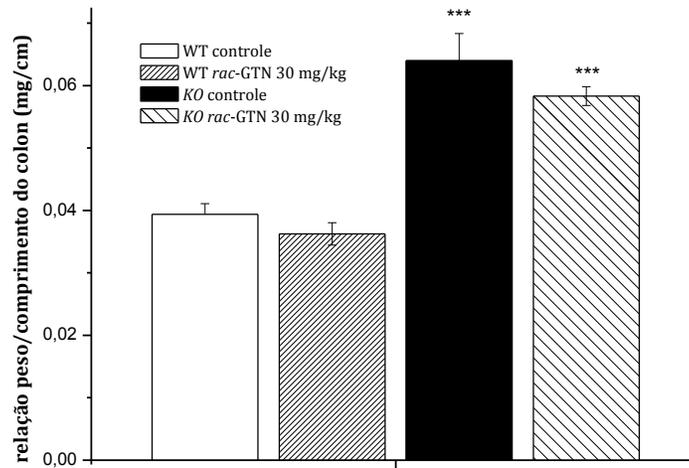


Massa corporal dos animais ao longo de 12 semanas de experimento. *KO* – *knockout* para IL-10; *WT* – *wild type*. Tratamentos: *rac*-GTN, 30 mg/kg via oral e veículo – salina 0,9% + tween 80.

No parâmetro relação peso/comprimento do cólon, *WT* que recebeu veículo não apresentou diferença estatística de *WT* tratado, porém ambos são estatisticamente diferentes dos grupos *KO* (Figura 41). De fato, macroscopicamente os cólons dos animais *KO* eram mais espessos e mais curtos, talvez por apresentarem mais inflamação e áreas de displasia.

O primeiro sinal de inflamação no grupo *KO* controle surgiu após 15 dias do início do experimento (animais com 7 semanas de idade), enquanto no grupo *KO* tratado os sinais surgiram após 42 dias de experimento (animais com 11 semanas de idade). Dentre os sinais de inflamação estavam fezes com sangue, excreção de muco e prolapso retal. Scheinin *et al* (2003) também observaram tais sinais, além de não observarem diferença de massa corporal entre animais tratados com anticorpo anti-TNF e animais controle (Figura 42).

Figura 41 - Relação peso/comprimento do cólon no modelo de colite espontânea



Relação peso/comprimento do cólon dos diferentes grupos. WT: *wild type*. KO: *Knockout* para IL-10. Tratamentos: *rac*-GTN, 30 mg/kg via oral e veículo – salina 0,9% + tween 80. *** $p < 0,001$, ANOVA, Duncan's test.

Figura 42 - Prolapso retal em animal do grupo KO controle no modelo de colite espontânea



Prolapso retal em animal do grupo KO controle. Esse é um dos sinais macroscópicos de colite instalada.

Quanto aos sinais de progressão de inflamação, ao final do experimento 42,9% dos animais do grupo *KO* controle apresentavam sangramentos e prolapso retal, enquanto que apenas 16,7% dos animais do grupo *KO* tratado apresentavam excreção de muco, não havendo sangramento ou prolapso retal. Além desses sinais, avaliados durante as 12 semanas de experimento, ao final do experimento os cólons foram retirados e avaliados em estereomicroscópio, quando os danos macroscópicos foram classificados em escalas (Tabela 5), sendo:

Score 0: cólon sem sinais de inflamação

Score 1: áreas de inflamação (áreas avermelhadas)

Score 2: áreas de possível displasia (áreas espessas)

Score 3: áreas de displasia e tumores pequenos

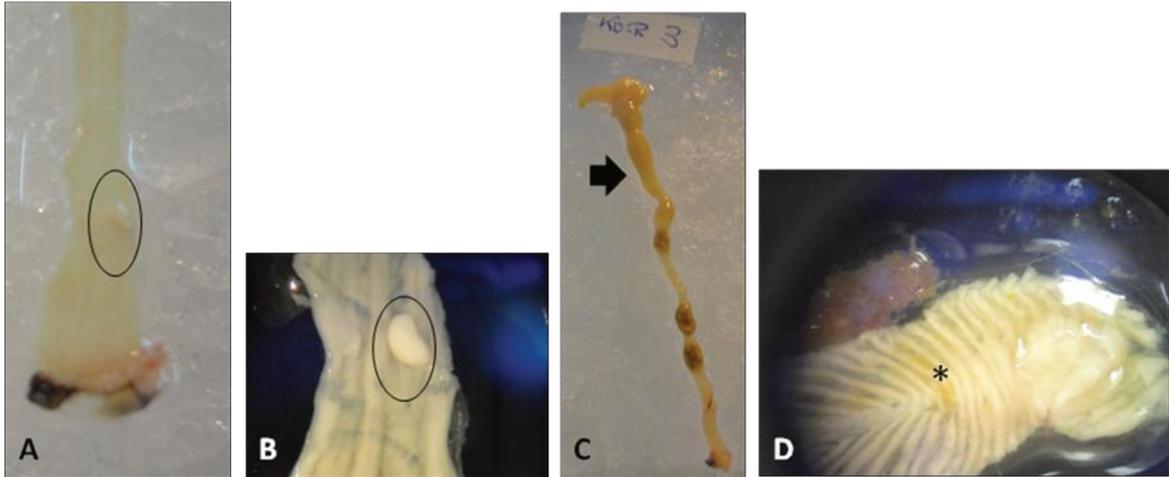
Tabela 5 - Classificação dos danos macroscópicos segundo *score* proposto por Berg *et al*, (1996).

	<i>Score 0</i>	<i>Score 1</i>	<i>Score 2</i>	<i>Score 3</i>	<i>Score médio</i>
<i>KO</i> controle	---	21,4%	14,3%	64,3%	2,43±0,85
<i>KO</i> tratados	16,6%	41,7%	41,7%	---	1,25±0,75**

**p<0,01 ANOVA p<0,001

De acordo com essa escala, mais da metade do grupo *KO* controle apresentou pontuação máxima, com um quadro inflamatório instalado e progredindo para a formação de tumores (Tabela 5). Por outro lado, a maioria dos animais tratados não atingiu a escala máximo, podendo ser reflexo da ação anti-inflamatória já observada em animais tratados com goniotalamina. Nos estudos realizados por Berg *et al* (1996), animais IL-10 *KO* de três semanas de idade já apresentaram sinais de inflamação, como infiltrado inflamatório, porém animais com mais de três meses de idade já apresentavam adenocarcinomas. Alguns dos aspectos analisados estão na figura abaixo (Figura 43).

Figura 43 - Análise do dano macroscópico do cólon extraído de animais dos grupos *KO* controle e *KO* tratado, após 12 semanas de experimento



Análise macroscópica dos cólons sob estereomicroscópio. A) e B) grânulos, classificados como possíveis tumores, ambos pertencentes ao grupo *KO* controle. C) área proximal dilatada e espessa (seta). Animal tratado com *rac*-GTN D) Manutenção da arquitetura tecidual em cólon do grupo tratado com *rac*-GTN (*).

Pode-se perceber que a arquitetura tecidual no grupo controle é desorganizada, havendo perda da morfologia típica desse tecido (Figura 43, A e B). No grupo tratado, o tecido teve sua arquitetura preservada, com manutenção das pregas intestinais (Figura 43, C e D). Em alguns casos, observou-se a presença de grânulos consistentes (Figura 43, A e B) e áreas espessas, de possível displasia, que só poderão ser confirmadas a partir de análises microscópicas (Figura 43, C). A avaliação dos danos macroscópicos está de acordo com a avaliação dos danos microscópicos, realizada a partir de cortes histológicos de 5 μ m de espessura, corados com hematoxilina e eosina. Para tanto, também foi realizada uma classificação mediante escalas segundo Berg *et al* (1996), com pequenas modificações. A avaliação foi cega e feita por histopatologista externo ao grupo de pesquisa.

Os cortes também foram analisados com o objetivo de detectar zonas de displasia, segundo as descrições de Sturlan *et al* (2001).

Score 0: tecido intacto, sem modificações

Score 1: poucas células mononucleares na lâmina própria, acompanhadas por mínima displasia. Perda mínima ou nula de muco nas células caliciformes

Score 2: frequentes lesões focais inflamatórias na lâmina própria (células mononucleares e neutrófilos). Displasia moderada. Pequenas erosões epiteliais. Escassa inflamação na submucosa

Score 3: grandes áreas de inflamação na mucosa, atingindo a submucosa. Abscessos nas criptas. Hiperplasia. Perda abundante de mucina. Úlceras.

Os resultados das análises histológicas dos cortes obtidos dos cólons dos animais dos grupos *KO* controle e tratado e *WT* controle e tratado estão expostos na Tabela 6 e Figura 44.

Tabela 6 - Avaliação histológica das alterações inflamatórias (escala 0-3) e displásicas (escala 0-1) nos animais wild type (WT) e IL-10 *-/-* (*KO*) com ou sem tratamento (*rac-GTN* 30 mg/kg v.o.), segundo Berg *et al*, 1996.

Escala de colite (0-3)								
Grupos	N	Animais					Escala média	Animais com displasia
		com dano inflamatório	0	1	2	3		
WT controle	14	0/14 (0%)	14/14 (100%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)	0	0/14 (0%)
WT tratado	12	0/12 (0%)	12/12 (100%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0	0/12 (0%)
<i>KO</i> controle	14	12/14 (85,7%)	2/14 (7,7%)	1/14 (7,8%)	2/14 (15,4%)	9/14 (69,2%)	2,29±1,1	11/14 (79,6%)
<i>KO</i> tratado	11	6/11 (54,5%)	5/11 (45,4%)	4/11 (36,4%)	2/11 (18,2%)	0/11 (0%)	0,73±0,7***	0/11 (0%)***

ANOVA $p < 0,001$, *** $p < 0,001$

Como era de se esperar, nos animais *WT* observa-se uma mucosa com arquitetura normal, com ausência de células displásicas, sendo que todos os animais apresentam escala

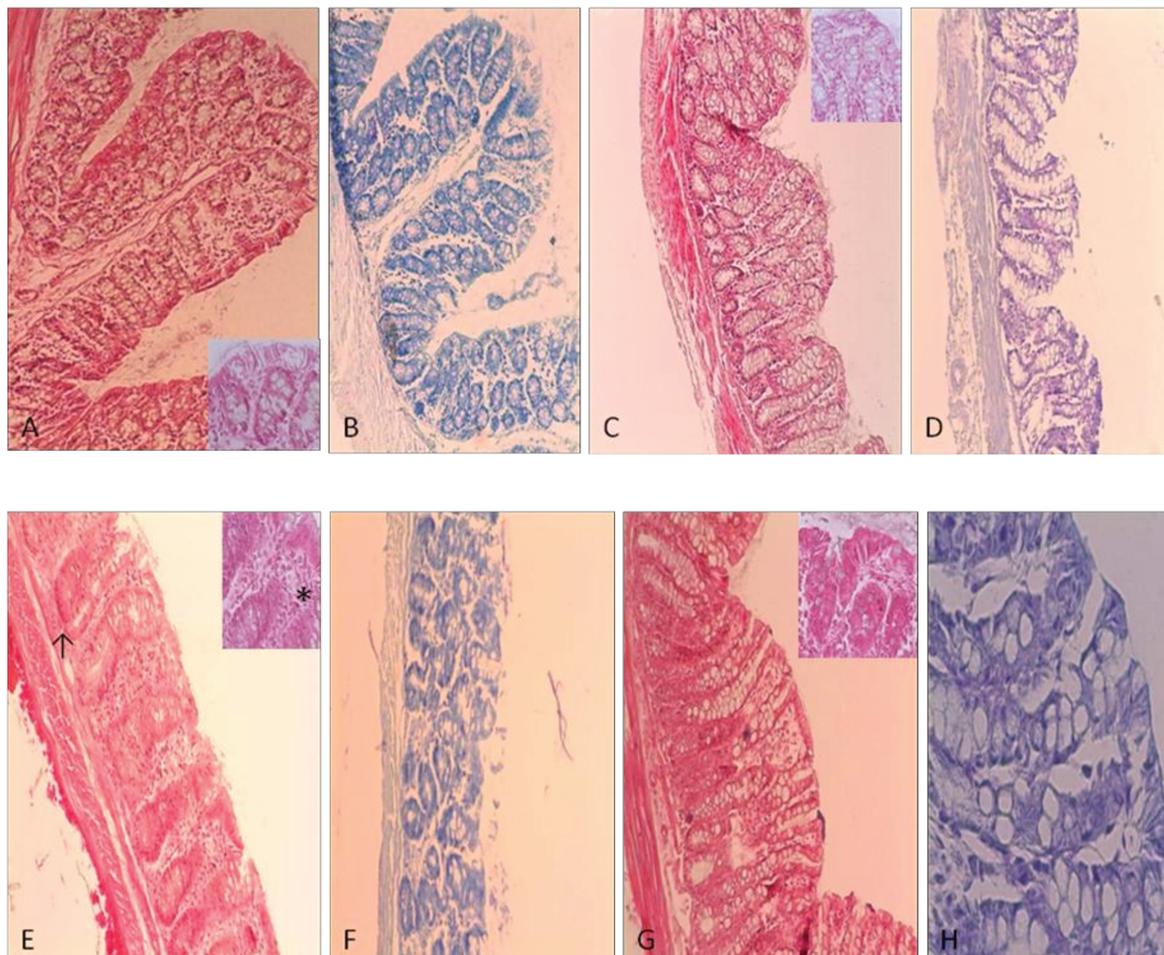
0 de colite. As imagens obtidas mostram um epitélio constituído por células de absorção e células da mucosa, formando invaginações tubulares retas, sem ramificações. Em determinadas regiões, na zona inferior da capa mucosa e próxima da submucosa, o epitélio se mostra interrompido por agregados linfóides. As células epiteliais superficiais, de tipo colunar e as caliciformes apresentam numerosos grânulos de mucina que compõem o muco protetor. Enfim, os animais destes grupos não apresentaram alterações inflamatórias, sinais de displasia ou de erosões superficiais, portanto a goniotalamina não interfere na arquitetura tecidual (Figura 44, A-D).

Os animais do grupo *KO* controle, após 12 semanas fora do ambiente SPF desenvolveram lesões inflamatórias na mucosa do cólon. Na Tabela 6 é possível observar os valores obtidos para cada escala, sendo que nesse grupo 9 dos 14 animais apresentaram valores máximos de escala, representando níveis máximos de dano inflamatório (69,2%, valor 3 na escala de colite). Além disso, o estudo morfológico detectou ainda a presença de células displásicas (79,6%), ou seja, 11 dos 14 animais apresentaram lesões pré-tumorais (Figura 44, E-F).

Por outro lado, os resultados obtidos com os animais do grupo *KO* tratado, em iguais condições experimentais, foram significativamente diferentes. Lesões inflamatórias foram observadas em 6 dos 12 animais do grupo (54,5% contra 85,7% do grupo *KO* controle), sendo que as porcentagens foram de 36,4% e 18,2% nas escalas 1 e 2 respectivamente. Não foram observadas lesões displásicas em nenhuma das amostras de cólon desse grupo de animais (Figura 44, G-H).

Os resultados obtidos a partir da análise histopatológica dos grupos tratados com goniotalamina, por via oral, são promissores, já que os animais *IL-10 KO* desenvolvem lesões similares às da Doença de Crohn, o que demonstra a capacidade preventiva da goniotalamina na progressão inflamatória e tumoral e que aumenta ainda mais o interesse de sua aplicação em modelos de câncer associados à inflamações crônicas.

Figura 44 - Fotomicrografias dos cortes histológicos obtidos dos cólons de animais dos grupos WT controle, WT tratado, KO controle, KO tratado. Coloração hematoxilina e eosina, Giemsa.



Fotomicrografias dos cortes obtidos dos cólons dos grupos WT controle, WT tratado, KO controle, KO tratado. A) grupo WT controle, 10X e 40X, coloração HE. B) grupo WT controle, 10X, Giemsa. C) grupo WT tratado com *rac*-GTN 30 mg/kg v.o., 10X e 40X, coloração HE, apresentando morfologia glandular normal, conteúdo mucoso nas células epiteliais e caliciformes, ausência de sinais patológicos, coincidindo com os dados apresentados na Tabela 6. D) grupo WT tratado, 10X, Giemsa. E) grupo KO veículo, observa-se diminuição da espessura total da parede intestinal, distorção da arquitetura glandular típica, com importante infiltrado inflamatório distribuído pela lâmina própria (*) e na base da glândula, próxima à capa submucosa. Surgem zonas com células displásicas (↑), 10X e 40X, HE. F) grupo KO controle, 10X, Giemsa. G) grupo KO tratado com *rac*-GTN 30 mg/kg v.o., 10X e 40X, coloração HE, havendo manutenção da arquitetura normal, presença de numerosas células caliciformes e epiteliais mucosecretoras, ausência de erosões superficiais. H) grupo KO tratado, 10X, Giemsa.

A fim de avaliar como o processo inflamatório pode contribuir para progressão tumoral em doenças inflamatórias intestinais, é importante entender os componentes desse

ambiente inflamatório. A fase ativa da doença é associada com um massivo infiltrado inflamatório no tecido, como foi observado nos animais do grupo *KO* controle. Macrófagos e células T são os componentes celulares chave para o estabelecimento da inflamação crônica intestinal, através da produção de citocinas que perpetuam a inflamação e o remodelamento tecidual (O'Connor *et al*, 2010). Nos animais tratados com goniotalamina, pode-se observar a manutenção da arquitetura do tecido, sendo um indício de modulação da resposta inflamatória.

Na doença de Crohn a resposta predominante é proveniente de células Th1. Tais células, quando ativas, secretam IL-12, IL-18 e IFN, o que leva macrófagos a liberarem TNF α , IL-6 e IL-1 β , de maneira semelhante ao que ocorre no mecanismo de colite induzida por TNBS (O'Connor *et al*, 2010). A IL-10 possui papel crítico na modulação da resposta imune: promove o desenvolvimento da resposta imune humoral, inibindo o desenvolvimento de respostas do tipo Th1, por limitar a capacidade dos macrófagos em produzir IL-12 (Sellon *et al*, 1998). Dessa forma, o mecanismo de ação da goniotalamina nesse modelo poderia ser semelhante ao proposto para modelo de colite induzida por TNBS, ou seja, sobre a produção das citocinas efetoras.

Com o objetivo de avaliar a influência da goniotalamina sobre a expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios/tumorais e de morte celular, extraiu-se o RNA total dos cólons dos animais e a expressão gênica relativa foi avaliada e quantificada através da ferramenta *real-time* PCR. Os genes avaliados foram:

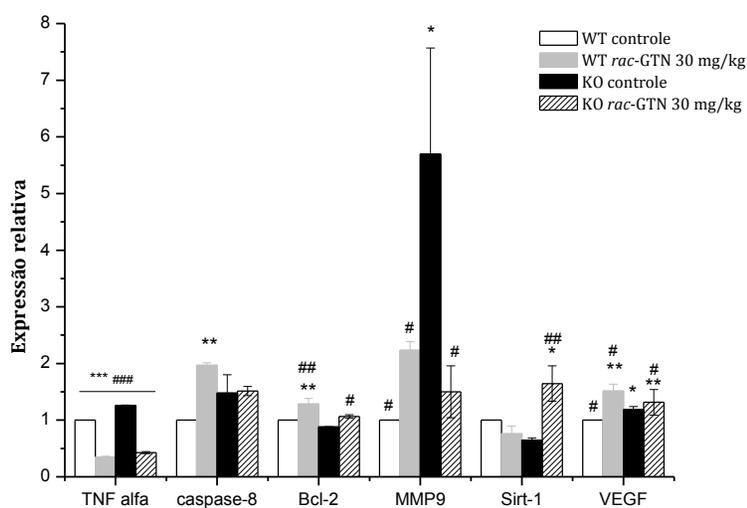
- TNF α : citocina pró-inflamatória resultante da resposta mediada por Th1 e liberada por macrófagos ativos.
- GAPDH: (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) proteína constitutiva, participa do sexto passo da glicólise. É utilizada aqui para normalização dos dados obtidos para outros genes não-constitutivos.
- Caspase 8: proteases efetoras na via extrínseca da apoptose.
- VEGF: fator de crescimento vascular – fator relacionado à angiogênese.
- MMP-9: metaloproteinase 9 – enzima que atua na degradação de um grupo particular de proteínas da matriz extracelular, está envolvida no processo de invasão e metástase.

- Sirtuina 1 (Sirt-1): é uma proteína deacetilase NAD-dependente (nicotinamida adenina dinucleotídeo-dependente), que contribui para a regulação celular, atuando em processos como câncer, inflamação e diabetes. Atua diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF α .

- Bcl-2: membro da família *B-cell lymphoma-2*, que atua no balanço entre o surgimento de novas células e a morte de células antigas. Quando os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 estão superexpressos, a apoptose é inibida.

O resultado da expressão gênica relativa foi normalizado com a expressão do gene para a proteína constitutiva GADPH (Figura 45).

Figura 45 - Expressão gênica relativa para citocinas e proteínas envolvidas no processo inflamatório e na progressão tumoral



Expressão gênica relativa para citocinas e proteínas envolvidas no processo inflamatório e na progressão tumoral. Reação da polimerase em cadeia (PCR) em tempo real foi realizada para quantificar os níveis de RNA mensageiro de genes importantes no desenvolvimento de câncer de cólon a partir de inflamação. A expressão do gene GADPH foi utilizada para normalizar os dados, que foram expressos em relação ao grupo WT controle. ANOVA, $p < 0,001$. * diferença estatística em relação ao grupo WT controle. # diferença estatística em relação ao grupo KO controle. *, # $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$; ***, ### $p < 0,001$.

Nessa análise destaca-se a superexpressão do gene que codifica a metaloproteinase 9 (MMP-9), havendo diferença estatística entre a expressão deste gene no grupo *KO* controle e nos outros grupos experimentais, com destaque ao grupo *KO* tratamento (Figura 45). Metaloproteinases compõem uma família de enzimas proteolíticas associadas com a degradação da matriz extracelular, incluindo a membrana basal, que é um tipo especializado de matriz composta por colágeno tipo IV, lamininas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Tais membranas servem como barreira entre os diferentes compartimentos teciduais e danos estruturais nessas membranas estão relacionados à invasividade tumoral (Nelson *et al*, 2000). Além da característica de facilitar a invasão tecidual, as metaloproteinases estão envolvidas também na manutenção de um microambiente que facilita o crescimento tumoral e o processo de angiogênese (Nelson *et al*, 2000; Weinberg, 2008).

Metaloproteinases também regulam processos que levam à proliferação celular, no sentido que sua atividade proteolítica muitas vezes facilita a interação entre fatores de crescimento e seus receptores, libera fatores de crescimento e mitogênicos que estavam ligados a componentes da matriz, permitindo dessa forma que eles atuem promovendo a proliferação e também regulam sinais para apoptose e invasão (McCawley & Matrisian, 2001). Além disso, sua ação proteolítica libera fatores angiogênicos e cria espaço para a inserção de novos vasos no tecido (Weinberg, 2008).

A MMP-9 está proeminentemente envolvida na progressão do câncer. É produzida por macrófagos associados ao tumor em resposta a uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e mitógenos (Stamenkovic, 2000). Esta MMP juntamente com a MMP-2 é essencial para a “alavanca angiogênica” durante a progressão tumoral (Rundhaug, 2005). Sua expressão pode ser regulada pelo TNF α em células do estroma, via NF- κ B, sendo assim terapias que interfiram com a expressão de TNF α ou com a via do NF- κ B também vão interferir na produção de MMPs (Rundhaug, 2005). Talvez esse seja o mecanismo disparado pela goniotalamina, já que nesse estudo há inibição da expressão de TNF α em animais tratados.

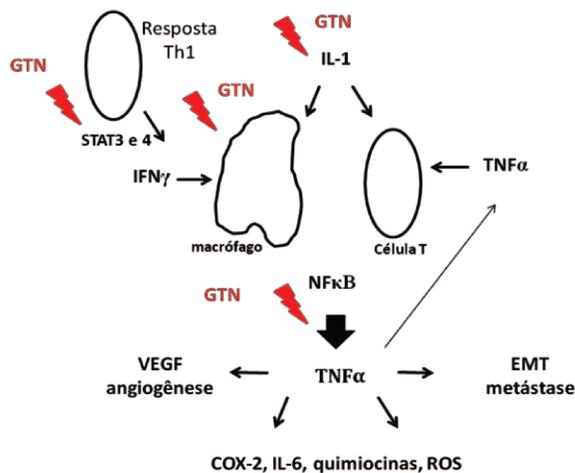
A expressão relativa de TNF α é maior no grupo *KO* controle que nos outros grupos, sendo que tratamento com goniotalamina inibe inclusive sua expressão em animais WT,

sendo um importante indício de sua atuação sobre a síntese dessa proteína (Figura 45). Inicialmente, o TNF α é produzido por macrófagos ativados e células T, induzidos por uma série de estímulos patológicos e inclusive pelo próprio TNF α , que regula sua própria produção através de *feedback* positivo. Essa citocina induz a produção de outros mediadores inflamatórios e proteases que orquestram a reposta inflamatória, entre eles IL-1, IL-6, COX-2, quimiocinas, VEGF, metaloproteinases, proteínas antiapoptóticas.

A cascata de atividade do TNF α em geral passa pelo fator de transcrição NF- κ B, cuja ativação é regulada pelo TNF α , mas que também pode regular a produção dessa mesma citocina (Karin & Greten, 2005). Células tumorais também produzem TNF α , que no ambiente tumoral atua como um promotor endógeno do crescimento tumoral, além de estar relacionado aos diferentes passos da carcinogênese (Aggarwal *et al*, 2006; Balkwill, 2006). Na fase de iniciação tumoral, o TNF α atua sinalizando para a produção de mediadores que levam à produção de ROS, favorecendo a instabilidade genômica e portanto mutações, que podem atingir genes importantes no controle da divisão e proliferação celular (Karin & Greten, 2005; Hanahan & Weinberg, 2011). Durante a promoção tumoral, o TNF α atua como mitógeno e fator de sobrevivência, além de sinalizar para a produção de VEGF e assim favorecer a angiogênese (Kundu & Surh, 2008; Grivennikov & Karin, 2010). Já na fase de progressão tumoral, o TNF α sinaliza para o processo de transição epitélio-mesenquimal, que marca a primeira fase do processo metastático (Huber *et al*, 2005).

Dessa forma, a baixa expressão para TNF α nos animais tratados com goniotalamina explica a atividade anti-inflamatória apresentada não apenas no modelo de colite espontânea em animais *knockout* IL-10, mas também nos outros modelos, além da atividade antiproliferativa, já que inibindo essa citocina, inibe-se o desenvolvimento tumoral. O mecanismo de tal inibição poderia ser sobre a transcrição do gene para TNF α , inibindo-se fatores de transcrição que regulam esse processo, tais como o NF- κ B, ou sobre a sinalização para sua produção, como inibição da ativação de macrófagos, inibição da produção e sinalização de IL-1, IFN γ e modulação da resposta imune Th1 (Esquema 5).

Esquema 5 – Algumas cascatas que levam à produção de TNF α e possíveis alvos da goniotalamina



Algumas cascatas que levam à produção de TNF α e possíveis alvos da goniotalamina. A resposta Th1 ativa os fatores de transcrição STATs 3 e 4, que regulam a produção de mediadores que estimulam a ativação de macrófago, como o IFN γ . Além disso, a IL-1 também estimula essas células a produzirem fatores que ativam o fator de transcrição NF- κ B, que por sua vez controla a expressão de diversos genes envolvidos em inflamação, angiogênese, metástase. STAT (*Signal transducer and activator of transcription*), EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*), IFN (*interferon*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), NF- κ B (*nuclear factor κ B*), ROS (*reactive oxygen species*).

A caspase 8 é uma cisteína protease envolvida na via apoptótica extrínseca, ou seja, que responde aos estímulos externos à célula mediante receptores de membrana, tais como receptor Fas ou TRAIL (Hanahan & Weinberg, 2011). Nesta via, não há influência direta sobre fatores presentes na membrana mitocondrial, sendo a relação indireta mediante a ativação da enzima BID (enzima pró-apoptótica da família Bcl-2), que é clivada, levando ao dano mitocondrial e à ativação de caspases subsequentes. Alternativamente a caspase 8 ativada pode ativar diretamente a caspase 3 efetora (Li *et al*, 1998; Fulda, 2009).

Nos animais WT tratados com goniotalamina a expressão do gene para caspase 8 é maior em relação aos animais KO controle e WT controle, porém no animais KO tratados não há alteração para a expressão desse gene. Alguns estudos mostram que a via apoptótica dependente de caspase-8 não está alterada em indivíduos com doença de Crohn

(Peppelenbosch & van Deventer, 2004), porém estudos mais recentes mostram que animais *knockout* para caspase 8 desenvolvem inflamação espontânea na região do íleo. Essa ação está relacionada com sua função na regulação da necroptose nas células epiteliais intestinais e consequente manutenção da homeostase imunológica no intestino (Günther *et al*, 2011).

Provavelmente, o aumento de expressão de caspase 8 nos animais WT tratados com goniotalamina seja uma ação direta sobre a ativação de apoptose, caracterizando um mecanismo de morte exercido pela molécula. Como exposto anteriormente, um dos alvos da goniotalamina poderia ser o NF- κ B, que entre outras ações, regula a transcrição de fatores antiapoptóticos. Se há falhas na atividade do NF- κ B, o TNF α presente localmente no tecido passa a exercer seu papel pró-apoptótico via receptores TNFR1, que ativa caspase 8 (Balkwill, 2009). Portanto, no caso do tratamento com a goniotalamina, essa via poderá estar ativada.

Por outro lado, tanto os animais *KO* quanto os WT tratados com goniotalamina apresentaram aumento na expressão do gene para Bcl-2, uma proteína antiapoptótica. O fato de haver superexpressão de caspase 8 nos animais WT tratados com goniotalamina explicaria o aumento de Bcl-2 nesses animais, pois havendo sinal para a apoptose e que seja independente da via mitocondrial, poderia haver indução da expressão de Bcl-2 para contrabalancear esse efeito. De fato, a caspase 8 é mediadora da via apoptótica extrínseca, podendo ativar diretamente a caspase 3, efetora, sem necessariamente sinalizar para as proteínas da família Bcl-2 (Galluzzi *et al*, 2012).

Um fato que explicaria tais condições contraditórias em animais tratados com goniotalamina é sua possível capacidade de induzir apoptose via liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estudos recentes apontam o papel terapêutico das ROS na indução de morte celular com maior seletividade para células tumorais; isso porque células tumorais já apresentam níveis de ROS superiores aos das células normais e interferir no balanço de ROS é diminuir o limiar entre o efeito anti-apoptótico e proliferativo dessas substâncias e aumentar o potencial tóxico dessas espécies, levando células tumorais à morte por apoptose (Trachootham *et al*, 2009). Inayat-Hussain *et al* (2010), em seu último estudo acerca da atividade antiproliferativa da goniotalamina, demonstrou que a concentração de GSH (glutationa) é inversamente proporcional ao número de células viáveis quando

tratadas com goniotalamina. Além disso, quando houve tratamento prévio com antioxidante, a morte celular induzida pela GTN foi inibida, havendo também inibição desse processo quando as células foram pré-tratadas com inibidor de caspases (Z-VAD), apontando para morte celular dependente de caspase. Neste mesmo estudo, os autores mostram que a morte celular promovida pela GTN é independente de Bcl-2.

O aumento de ROS nas células tumorais pode ativar mecanismos de defesa a fim de manter a homeostase celular: eventualmente pode haver ativação do fator de transcrição NF- κ B, que regula a transcrição de diversos genes antiapoptóticos, entre eles o da proteína Bcl-2 e ainda o do VEGF (Trachootham *et al*, 2009). Outros estudos mostraram que o aumento nos níveis de caspases em geral está acompanhado de aumento dos níveis de Bcl-2 (Zhvotovskiy & Orrenius, 2006). De fato, nos tecidos tratados com goniotalamina, há aumento dessas proteínas, podendo ser reflexo da tentativa de manutenção da homeostase. Apesar de parecer agressivo, estudos acerca da indução de morte celular via liberação de ROS como terapia vem aumentando e mostram ser eficazes, como é o exemplo da β -Lapachona e da piplartina (Trachootham *et al*, 2009; Raj *et al*, 2011).

Outra maneira de as células se adaptarem ao aumento de ROS é aumentar os níveis de glicólise. Aliás, o aumento das taxas de glicólise é considerado um *hallmark* de células tumorais, sendo conhecido como efeito Warburg (Kondoh *et al*, 2007). O metabolismo glicolítico em células tumorais está aumentado, pois em geral em tumores sólidos as taxas de glicose são muito baixas, havendo também muitas áreas de hipóxia. Portanto o efeito Warburg promove eficiência na utilização de glicose em um ambiente onde a glicose é limitada, sendo uma adaptação metabólica (Kondoh *et al*, 2007). Embora a glicólise aeróbica seja altamente ineficiente para a produção de ATP, é uma reação anaplerótica que supre metabólicos intermediários críticos para a produção de biomassa (aminoácidos, lipídios, nucleotídeos), o que é fundamental em células que se proliferam rapidamente (Martinez-Pastor & Mostoslavsky, 2012).

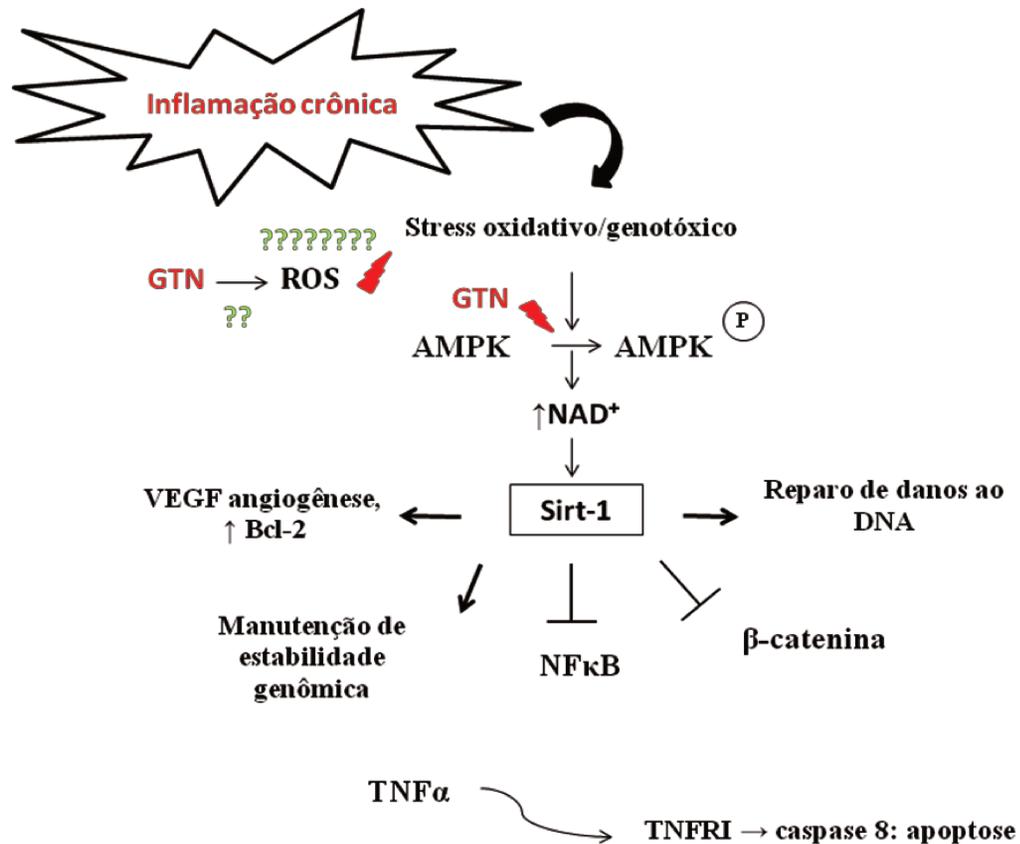
Em um ambiente de stress oxidativo e falta de nutrientes, ativação de mecanismos que propiciem a homeostase celular é fundamental para evitar a transformação celular. Nesse sentido, membros da família de proteínas deacetilases NAD-dependentes, as sirtuínas, são importantes, pois atuam no controle de qualidade da célula, regulando o

metabolismo energético, funcionando como adaptadores do stress (oxidativo, genotóxico e metabólico), através da detecção de mudanças nos níveis intracelulares de NAD^+ (Webster *et al*, 2012). A Sirt-1, uma das sirtuinas mais estudadas, está envolvida com os processos de gliconeogênese, reparo de DNA e manutenção da estabilidade genômica (Bosh-Presegué & Vaquero, 2011).

Recentemente, vários estudos acerca da relação entre sirtuinas e câncer foram publicados, questionando se elas possuem um papel anti ou pró-tumoral, pois na tentativa de estabelecer a homeostase, uma das vias ativadas culmina na inibição de p53 e de apoptose, favorecendo a tentativa de reparo do DNA ao invés do processo apoptótico, além de ativação de fatores envolvidos com a angiogênese (Bosh-Presegué & Vaquero, 2011; Webster *et al*, 2012). Porém, os trabalhos recentes confirmam seu papel antitumoral, reforçado pela ação inibitória da Sirt-1 sobre o NF- κ B em situações de grande stress oxidativo, favorecendo ainda a apoptose mediada por TNF α , além de inibição de β -catenina, que está intimamente envolvida com a proliferação celular (Bosh-Presegué & Vaquero, 2011; Martinez-Pastor & Mostoslavsky, 2012).

Nos animais *KO* tratados com goniotalamina há aumento de expressão para Sirt-1, reforçando a hipótese de que nesses indivíduos há stress oxidativo/genômico/metabólico: com aumento de ROS, há ativação de Sirt-1, que poderia ser mediado pela goniotalamina. A ação protetora da Sirt-1 sobre o dano ao DNA e na manutenção da estabilidade genômica suportaria os baixos scores nos animais tratados. Além disso, se Sirt-1 inibe NF- κ B, há inibição de TNF α , favorecendo o processo apoptótico mediado pela baixa concentração de TNF α que atuará localmente, via receptores TNFR1-caspase 8, via apoptótica extrínseca. Como Sirt-1 possui um papel ambíguo, pode haver ativação de VEGF e Bcl-2 (Esquema 6).

Esquema 6 - Possível ação da goniotalamina sobre o stress oxidativo e ativação de sirtuina-1



Possível ação da goniotalamina sobre o stress oxidativo e ativação de sirtuina-1. Inflamações crônicas geram stress oxidativo e genotóxico, que via fosforilação da AMPK eleva os níveis de NAD⁺, o que leva a ativação de sirtuina-1. A sirt-1, por sua vez, ativa mecanismos de reparo do DNA, estimula a angiogênese, mantêm a estabilidade genômica, inibe o NF-κB e a β-catenina. Ao inibir o NF-κB, o TNFα presente no tecido está livre para ativar o programa de apoptose extrínseca via caspase 8. AMPK: (adenosine monophosphate activated protein kinase). NAD (nicotinamide adenine dinucleotide). TNFR1 (tumor necrosis factor receptor I).

Tais hipóteses poderão ser comprovadas pelos resultados sobre a ativação de NF-κB no tecido, que estão sendo realizados pelo grupo da prof. Dra. Virginia Motilva. Além disso, ainda estão sendo concluídos estudos de imunohistoquímica para β-catenina, que poderão fornecer maiores informações sobre a proliferação existente nesse tecido e também

estudos com detecção de AMPK, uma proteína quinase envolvida na ativação de Sirt-1. Estes dados serão analisados, unidos e publicados em breve.

6 – Avaliação do tipo de morte celular induzido pela goniotalamina sobre a linhagem HT-29

Após observar que a goniotalamina apresentava atividade em modelo de colite induzida e espontânea, avaliou-se o tipo de morte celular induzido em células tumorais humanas de cólon, HT-29, por citometria de fluxo.

6.1 Anexina

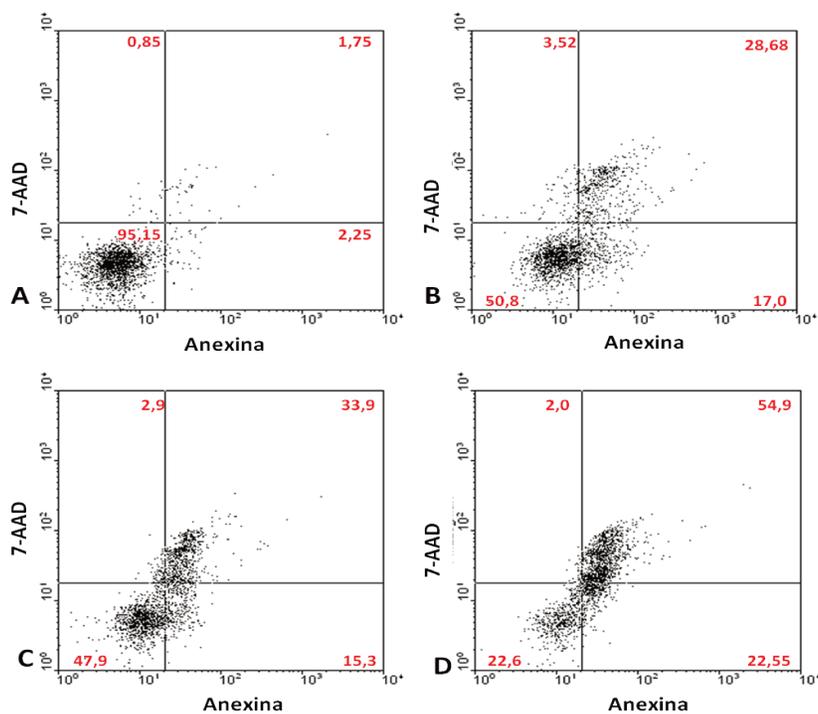
Para tanto, inicialmente as células foram tratadas com *rac*-GTN nas concentrações de 10, 15 e 20 µg/mL, por 24 horas. Dados preliminares revelaram que em 48 horas de tratamento a goniotalamina inibe totalmente o crescimento da linhagem HT-29 na concentração de 3,0 µg/mL (15,5 µM, Tabela 4), portanto foram avaliadas concentrações maiores para 24 horas de exposição.

As células em fase inicial da apoptose apresentam externalização de fosfatidilserina sem rompimento de membrana. Portanto, existe marcação com a anexina V, sem marcação com 7-AAD (já que o 7-AAD só entra nas células cujas membranas não estejam íntegras). Células em apoptose tardia apresentam rompimento de membrana e, portanto, há dupla marcação, enquanto que células marcadas apenas com 7-AAD são células acometidas pelo processo necrótico ou outros processos diferentes da apoptose.

Nesse primeiro experimento, observa-se indução de morte celular concentração-dependente, sendo que em 10 µg/mL e em 15 µg/mL a atividade foi semelhante: a viabilidade celular ficou em torno de 45%, havendo indução de apoptose, com detecção das fases inicial e tardia (Figura 46). Já a concentração de 20 µg/mL foi mais potente, havendo apenas 22,6% de células viáveis após 24 horas e mais da metade da população já em fase de apoptose tardia. É interessante apontar que mesmo na maior concentração não há

indução significativa de necrose, podendo-se afirmar que a *rac*-GTN induz morte celular por apoptose na linhagem HT-29.

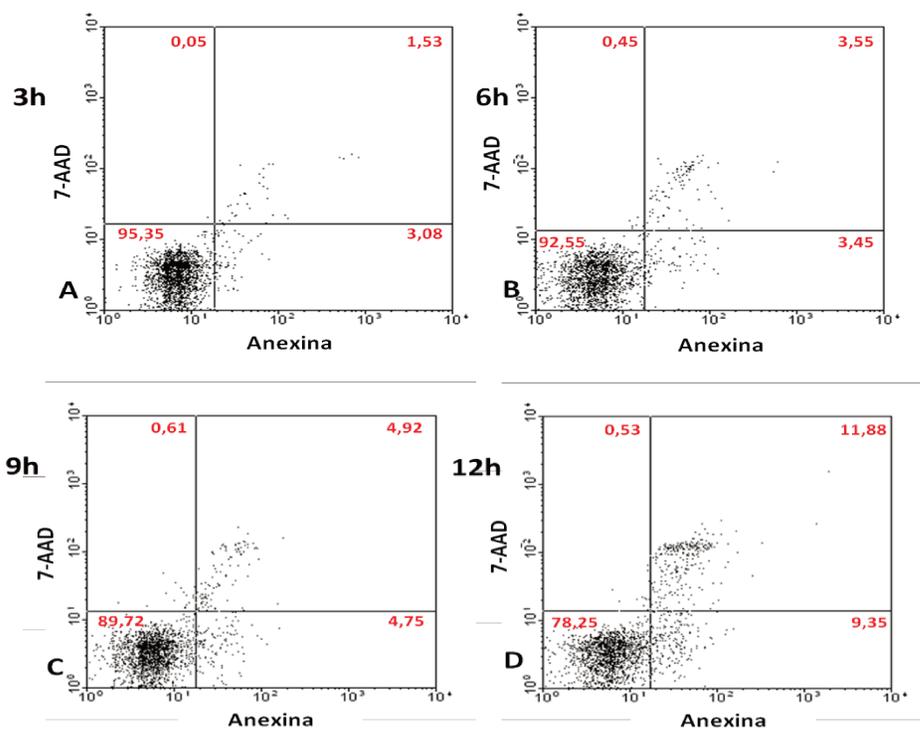
Figura 46 - Avaliação do tipo de morte celular induzido pela goniotalamina em células HT-29, após 24 horas de tratamento



Avaliação do tipo de morte celular induzido pela *rac*-GTN na linhagem HT-29, através de ensaio da anexina V por citometria de fluxo. As células foram tratadas com *rac*-GTN nas concentrações de 10, 15 e 20 µg/mL por 24 horas. Os valores em vermelho indicam a porcentagem de células em cada estágio. A: controle DMSO. B: *rac*-GTN 10 µg/mL. C: *rac*-GTN 15 µg/mL. D: *rac*-GTN 20 µg/mL.

Como a goniotalamina nas concentrações de 10 e 15 µg/mL atua de maneira semelhante, decidiu-se dar continuidade aos estudos de mecanismos com a menor concentração (10 µg/mL). No segundo experimento, foram realizadas leitura das células após 3, 6, 9 e 12 horas de tratamento com *rac*-GTN 10 µg/mL (Figura 47).

Figura 47 - Avaliação do tipo de morte celular induzido pela goniotalamina em células HT-29, após tempos crescentes de tratamento



Avaliação do tipo de morte celular induzido pela *rac*-GTN na linhagem HT-29, através de ensaio da anexina V por citometria de fluxo. As células foram tratadas com *rac*-GTN na concentração de 10 µg/mL por 3, 6, 9 e 12 horas. Os valores em vermelho indicam a porcentagem de células em cada estágio.

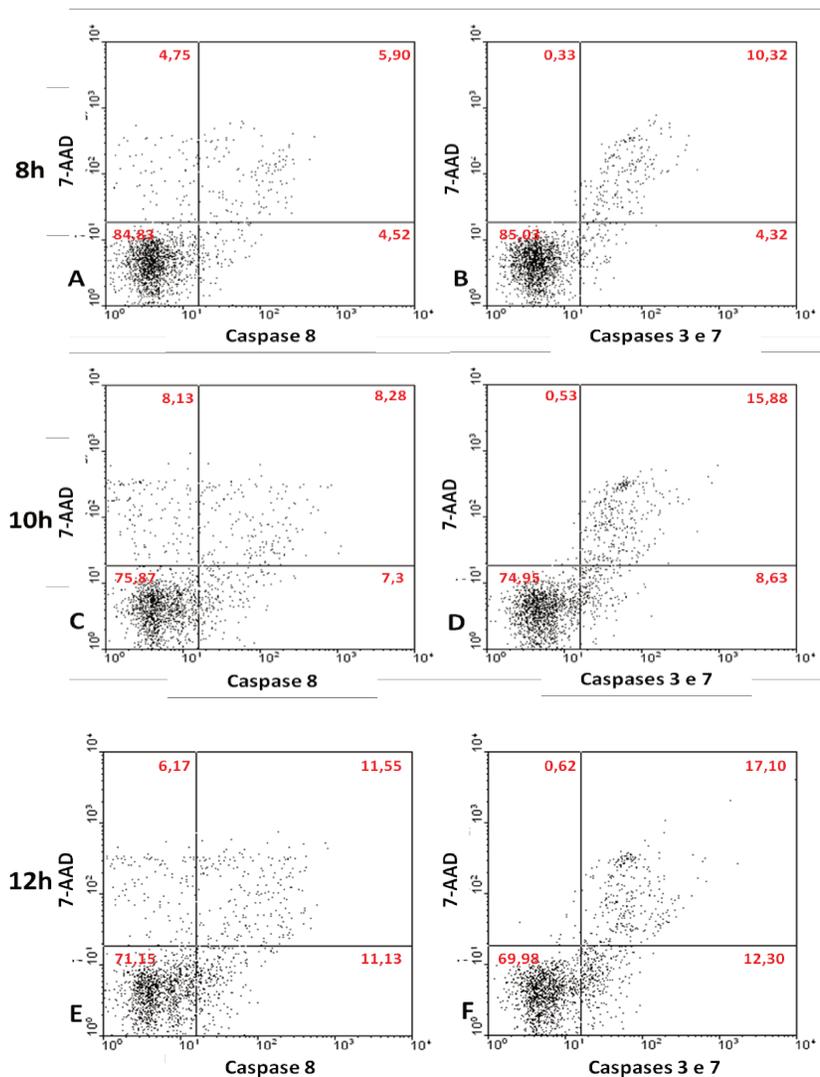
As leituras em diferentes tempos foram realizadas com o objetivo de definir o melhor intervalo de tempo para avaliação da ativação de caspases nas células HT-29 tratadas com 10 µg/mL de *rac*-GTN. Observou-se que a porcentagem de células em apoptose inicial e tardia é crescente ao longo do tempo, sendo que dentre os intervalos estudados, o de 9 a 12 horas é onde há maior indução do processo apoptótico (Figura 47). Dessa forma, a avaliação de caspases se deu nesse intervalo de tempo (Figura 48).

6.2 Caspase 8 e caspase 9

As caspases têm papel central no processo de morte celular por apoptose. Essas enzimas compõem a família enzimática responsável pelo início da cascata apoptótica

(caspases-2, -8, -9, -10), execução do processo propriamente dito (-3, -6, -7) e processamento de citocinas (-1, -4, -5, -11 a -14). Nesse estudo, avaliou-se a ativação das caspases iniciadoras 8 e 9, além de caspases efetoras 3 e 7.

Figura 48 - Avaliação da ativação de caspase 8 pela goniotalamina em células HT-29, após tempos crescentes de tratamento



Avaliação da indução de morte celular por ativação de caspase 8, 3 e 7 pela *rac*-GTN na linhagem HT-29, por citometria de fluxo. As células foram tratadas com *rac*-GTN na concentração de 10 µg/mL por 8, 10 e 12 horas. Os valores em vermelho indicam a porcentagem de células em cada estágio.

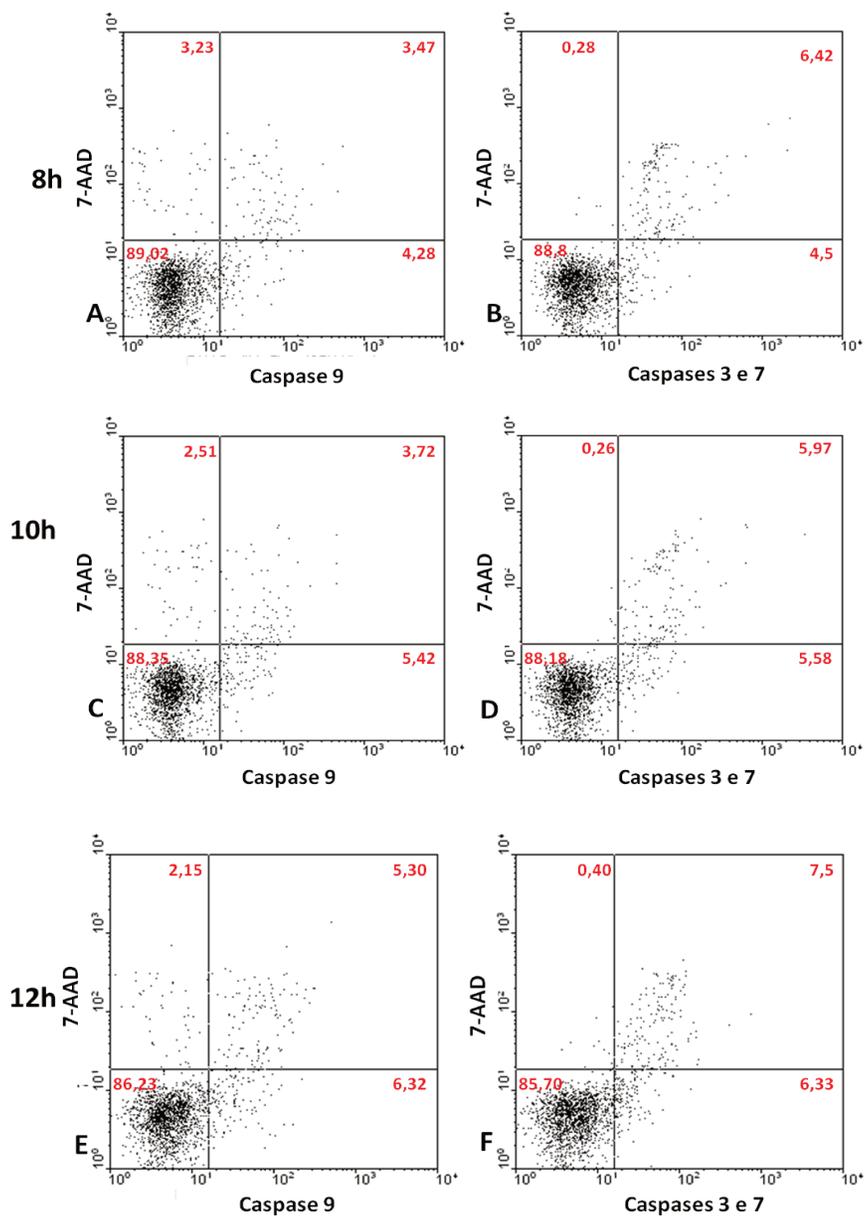
A indução de caspase 8 foi tempo dependente, sendo que no menor tempo avaliado (8 horas) observou-se a ativação de caspases 3 e 7, que são caspases efetoras, evidenciando o processo apoptótico tardio. Além disso, há células marcadas com 7-AAD, o que confirma o processo apoptótico avançado em algumas células (Figura 48).

A apoptose mediada pela caspase 8 é a chamada apoptose extrínseca, cuja ativação se dá por estímulo externo à célula (TNF α , ligante FAS/CD95L, ligantes da superfamília TNF) mediante ativação de receptores de superfície, conhecidos como *death receptors* (FAS/CD95, TNFR1 e TRAIL receptor). A sinalização via caspase 8 pode ativar diretamente a cascata da caspase 3 ou sinalizar para a cascata mitocondrial, ativando proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2→caspase 9→caspase 3 (Galluzzi *et al*, 2012). A fim de observar qual a via de sinalização induzida pela goniotalamina, sua atividade foi avaliada sobre a ativação da caspase 9 (Figura 49).

A indução de caspase 9 também foi tempo dependente e em menor porcentagem que a indução de caspase 8. Por haver ativação dessas duas caspases iniciadoras, pode-se supor que a cascata apoptótica induzida pela goniotalamina na linhagem HT-29 é mediada por sinal externo com interferência na mitocôndria.

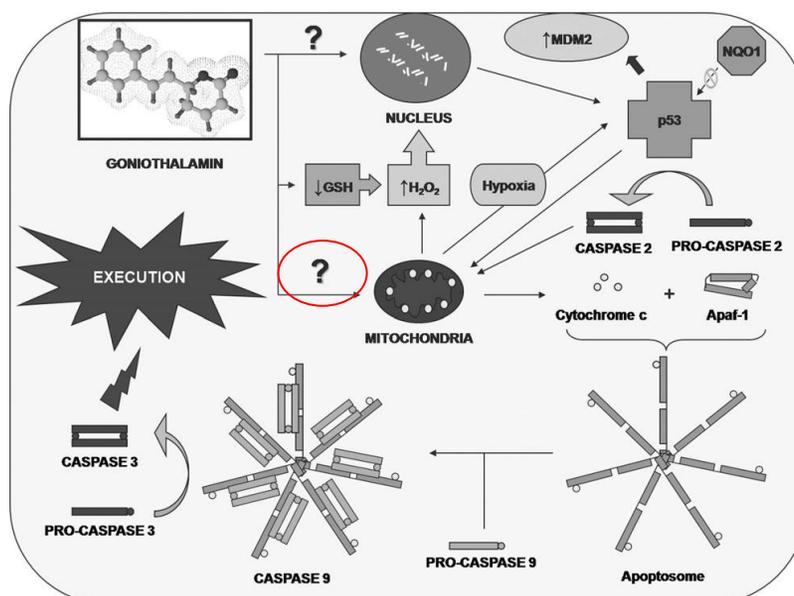
De fato, estudos realizados com as linhagens de leucemia Jurkat e HL-60 mostram que a goniotalamina induz apoptose via indução de dano ao DNA e produção de ROS com envolvimento da mitocôndria. Segundo essa hipótese, a goniotalamina leva a dano ao DNA, o que ativa a proteína pró-apoptótica p53, que atua na mitocôndria levando a liberação de citocromo *c*, com ativação de caspase 9, 3 e então apoptose. Além disso, através de conjugação com a GSH e consequente inativação dessa, a goniotalamina leva à produção de ROS, que reforça a sinalização sobre a mitocôndria, além de também promover dano ao DNA (Inayat-Hussain *et al*, 2010; Chan *et al*, 2010). Com os resultados obtidos nesse trabalho, pode-se sugerir que na linhagem HT-29 a goniotalamina induz apoptose mediante ativação de caspase 8, que pode atuar diretamente na mitocôndria e ativar a via intrínseca, podendo ser esse o mecanismo não decifrado no esquema proposto por Chan *et al* (2010) sobre a ação direta da goniotalamina na mitocôndria (elipse vermelha, na Figura 50). Agora, fica a pergunta: qual o sinal externo induzido pela goniotalamina é responsável pelo disparo do programa de apoptose extrínseca?

Figura 49 - Avaliação da ativação de caspase 9 pela goniotalamina em células HT-29, após tempos crescentes de tratamento



Avaliação da indução de morte celular por ativação de caspase 9, 3 e 7 pela *rac*-GTN na linhagem HT-29, por citometria de fluxo. As células foram tratadas com *rac*-GTN na concentração de 10 µg/mL por 8, 10 e 12 horas. Os valores em vermelho indicam a porcentagem de células em cada estágio.

Figura 50 – Possível mecanismo de ação da goniotalamina para indução de apoptose intrínseca



Representação esquemática para a indução de apoptose intrínseca pela goniotalamina em células musculares lisas da artéria coronária, proposta por Chan *et al* (2010). A goniotalamina, ao reagir com a GSH leva à liberação de ROS, que produzem dano ao DNA. Esse dano ativar a p53, que atua ativando a morte celular por apoptose. Além disso, a goniotalamina atua diretamente na mitocôndria, disparando o processo apoptótico intrínseco, via liberação de citocromo c e então ativação de caspases 9 e 3. Modificado de Chan *et al*. Goniotalamin Induces Coronary Artery Smooth Muscle Cells Apoptosis: The p53-Dependent Caspase-2 Activation Pathway (2010). *Toxicol Sci*, 116(2), 533–548. GSH (glutationa). MDM (*murine Double minute oncogene*). APAF-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*).

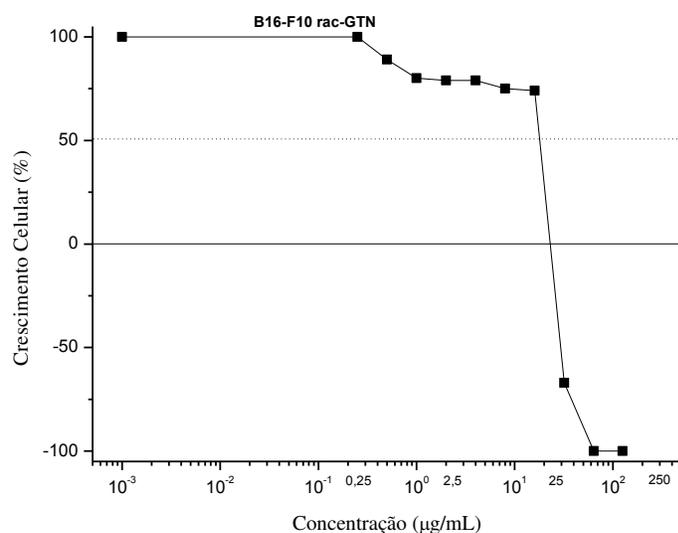
Evasão dos processos de morte celular é um dos *hallmarks* de células tumorais. Inúmeros são os mecanismos dos quais as células tumorais lançam mão para evitar esse processo e terapias que revertam tal característica são importantes no tratamento do câncer. O fato da goniotalamina induzir apoptose na linhagem HT-29 é um indício de seu potencial antitumoral, pois essa linhagem expressa diversos oncogenes relacionados à proliferação celular e regulação de vias de comunicação intracelular, tais como *myc*, *fos*, *myb* e *ras* (ATCC, 2012).

7 – Avaliação da atividade da goniotalamina em modelos *in vitro* e *in vivo* de melanoma

7.1 Atividade antiproliferativa *in vitro* sobre a linhagem de melanoma murino B16-F10

Para avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* da goniotalamina sobre a linhagem murina B16-F10 foi realizada uma avaliação nas concentrações de 0,25; 0,5; 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 126 µg/mL em tratamento de 24 horas (Figura 51).

Figura 51 - Atividade antiproliferativa *in vitro* da *rac*-GTN sobre a linhagem B16-F10



Atividade antiproliferativa da *rac*-GTN sobre a linhagem de melanoma murino B16-F10. Tratamento de 24 horas em dez concentrações: 0,25; 0,5; 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 126 µg/mL.

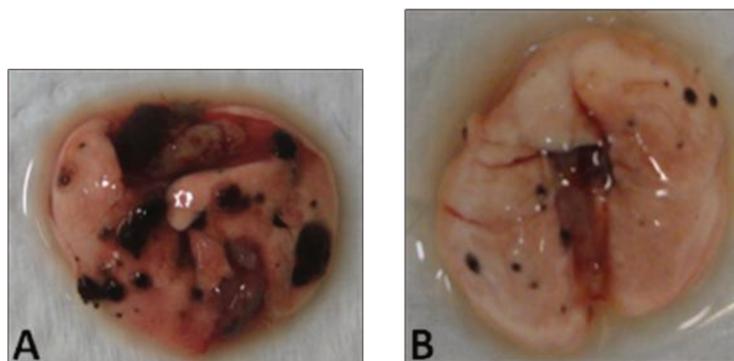
A *rac*-GTN inibe totalmente o crescimento tumoral dessa linhagem na concentração de 23,13 µg/mL (TGI), sendo que os valor de LC₅₀ é de 31,14 µg/mL. Novamente, a concentração de goniotalamina que inibe totalmente o crescimento se manteve entre 0,25 – 25 µg/mL e concentrações maiores que 64 µg/mL levam à 100% de morte celular.

7.2 Avaliação da atividade sobre o desenvolvimento metastático do melanoma B16-F10

Como a goniotalamina já havia sido avaliada em modelos de câncer, inflamação e carcinogênese espontânea, decidiu-se fazer um experimento preliminar em modelo metastático, que inclusive está em fase de padronização no laboratório.

Esse é um modelo interessante, pois as células de melanoma, quando na circulação, preferencialmente se acumulam no pulmão e em 21 dias de experimento já se observa grande quantidade de melanina nesse órgão (Zhang *et al*, 2011) (Figura 52).

Figura 52 - Fotografia de metástase pulmonar da linhagem B16-F10, com produção de melanina



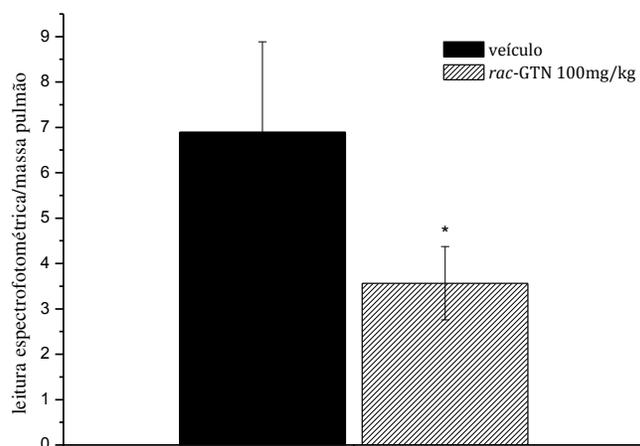
Fotografia de metástase pulmonar após 21 dias de experimento, com produção de melanina. A) Grupo controle negativo. B) Grupo tratado com *rac*-GTN 100mg/kg.

Foi utilizada a dose de 100 mg/kg de *rac*-GTN, que foi ativa em modelos de câncer e inflamação. Nesse experimento preliminar a GTN reduziu em 48,3% a quantidade de melanina/massa pulmonar (Figura 53).

Essa redução da produção de melanina por células B16-F10 alocadas no pulmão indica indiretamente que existem menos células nos pulmões dos animais tratados. A partir desses resultados, surgem duas hipóteses: ou a goniotalamina inibe vias que propiciam a

metástase tumoral ou ela interfere na viabilidade dessas células *in vivo*, havendo assim menos metástase pulmonar.

Figura 53 - Concentração de melanina em relação à massa pulmonar



Leitura espectrofotométrica da quantidade de melanina em relação à massa pulmonar nos grupos controle negativo (salina 0,9% + tween 80) e grupo tratado com *rac*-GTN, 100 mg/kg, três vezes por semana, por 21 dias. ANOVA * $p < 0,05$.

Metástase é um dos aspectos mais críticos da carcinogênese, sendo que mais de 90% das causas de morte ligadas ao câncer ocorre em casos de tumores metastáticos. Esse processo depende de uma estreita colaboração entre o tumor e os elementos de seu estroma (Derynck *et al*, 2001). Dentre esses elementos estão diversas citocinas, como $TNF\alpha$, IL-1 e IL-8, bem como quimiocinas, que levam à ativação de fatores de transcrição como o $NF-\kappa B$ e o STAT3, que modulam a expressão de genes para proteínas envolvidas diretamente com metástase e proliferação (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Como em outros experimentos já realizados, a goniotalamina poderia atuar inibindo alguma dessas cascatas e então regulando negativamente a expressão dos fatores pró-metastáticos, ativando inclusive vias pró-apoptóticas. Para resolver essa questão, novos testes deverão ser

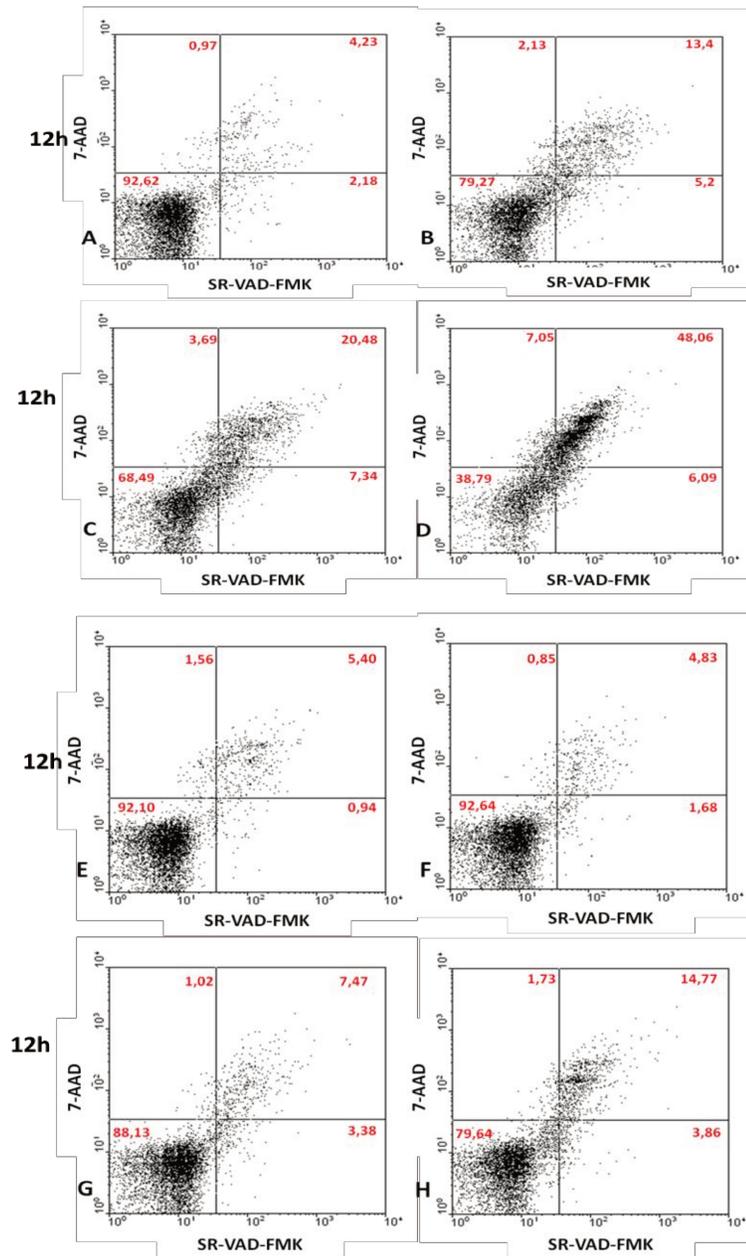
realizados avaliando-se a capacidade de inibição de migração celular, dosagens dos níveis de metaloproteinases, IL-8 e outras quimiocinas.

7.3 Avaliação do tipo de morte celular induzido pela goniotalamina sobre a linhagem SK-MEL-2 e SK-MEL-2 transfectada com Bcl-X_L

Com o objetivo de avaliar se no processo de morte celular induzido pela goniotalamina há envolvimento das proteínas da família Bcl-2, avaliou-se a indução de morte celular em células tumorais de melanoma humano (SK-MEL-2) transfectadas ou não com o gene para Bcl-X_L, através de *kit* para multicaspases, por citometria de fluxo. Utilizou-se *rac*-GTN nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL, tratamentos de 12 e 24 horas (Figuras 54 e 55).

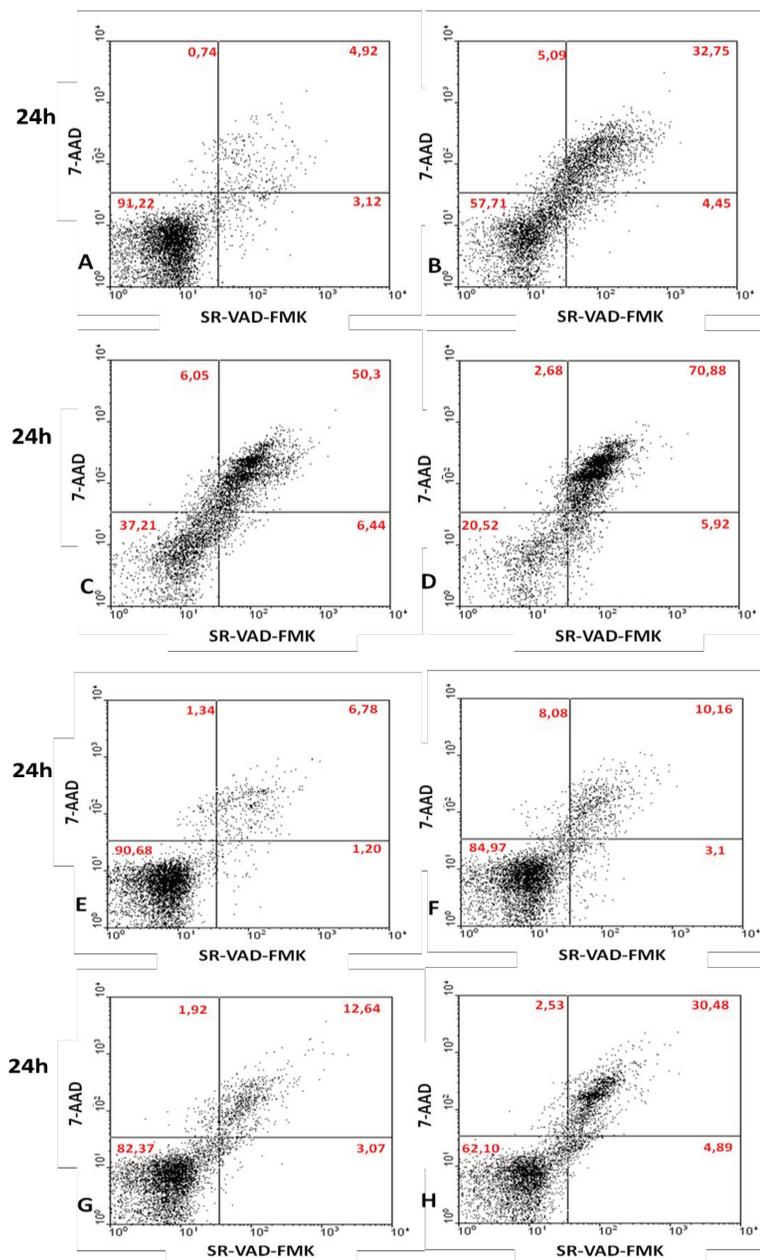
A goniotalamina, nas diferentes concentrações, induz apoptose na linhagem SK-MEL-2, o que é traduzido pela marcação das células com o SR-VAD-FMK, um inibidor inespecífico de caspases. Nos tratamentos de 12 horas, a diminuição de viabilidade chega a 61,2 % com o tratamento de 20 µg/mL, sendo que o tratamento com a menor concentração já é suficiente para diminuir em 20,7% a viabilidade celular (Figura 54). Com 24 horas de tratamento esse efeito é ainda mais expressivo, com diminuição de 42,3% da viabilidade celular na menor concentração (Figura 55). É importante observar que mesmo com 12 horas de tratamento com qualquer uma das concentrações de *rac*-GTN avaliadas, a maior concentração de células acometidas pelo processo apoptótico já se encontra duplamente marcada, ou seja, em processo de apoptose tardia (Figura 54).

Figura 54 - Avaliação da ativação de caspases pela goniotalamina em células SK-MEL-2, transfectadas ou não com Bcl-X_L, após 12 horas de tratamento



Avaliação da indução de morte celular por ativação de caspase 3 e 7 pela *rac*-GTN na linhagem SK-MEL-2, transfectada ou não com Bcl-X_L, por citometria de fluxo. As células foram tratadas com *rac*-GTN na concentração de 5, 10 e 20 μg/mL por 12 horas. Os valores em vermelho indicam a porcentagem de células em cada estágio. A, B, C, D: SK-MEL-2 normal, sendo A (controle DMSO), B, C, D (5, 10 e 20 μg/mL respectivamente). E, F, G, H: SK-MEL-2 Bcl-X_L sendo E (controle DMSO), F, G, H (5, 10 e 20 μg/mL respectivamente).

Figura 55 - Avaliação da ativação de caspases pela goniotalamina em células SK-MEL-2, transfetadas ou não com Bcl-X_L, após 24 horas de tratamento.

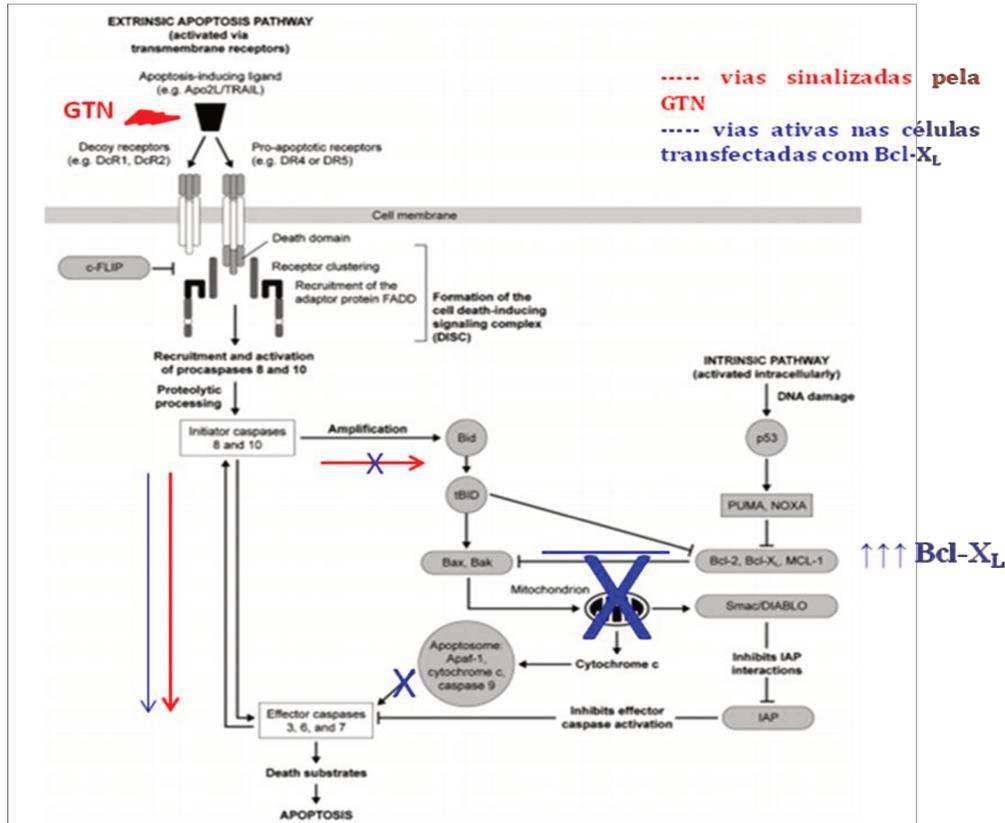


Avaliação da indução de morte celular por ativação de caspase 3 e 7 pela *rac*-GTN na linhagem SK-MEL-2, transfetada ou não com Bcl-X_L, por citometria de fluxo. As células foram tratadas com *rac*-GTN na concentração de 5, 10 e 20 μg/mL por 24 horas. Os valores em vermelho indicam a porcentagem de células em cada estágio. A, B, C, D: SK-MEL-2 normal, sendo A (controle DMSO), B, C, D (5, 10 e 20 μg/mL respectivamente). E, F, G, H: SK-MEL-2 Bcl-X_L sendo E (controle DMSO), F, G, H (5, 10 e 20 μg/mL respectivamente).

Já na linhagem transfectada com Bcl-X_L a atividade da goniotalamina é menos potente: nas células tratadas com a maior concentração há diminuição máxima de 20,36% e 37,90% na viabilidade celular após 12 e 24 horas de tratamento respectivamente, havendo, portanto, menos células acometidas pelo processo apoptótico (Figuras 54 e 55). Esses resultados sugerem que a via apoptótica induzida pela goniotalamina nas linhagens SK-MEL-2 é principalmente a via extrínseca, havendo ativação da via intrínseca para amplificação do sinal apoptótico.

As proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L) são responsáveis por conferir resistência à morte celular e estão relacionadas a inúmeros processos de resistência à quimioterapia (Adam & Cory, 2007). Sua atuação é consequência da ligação às proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bax, Bak), prevenindo sua ativação e por atuação nos canais da membrana externa da mitocôndria impedindo a saída de citocromo *c* e assim o desencadeamento do processo apoptótico (Ashkenazi, 2008; Weinberg, 2008). A razão entre Bcl-2 e Bax ou Bcl-X_L e Bak é um fator decisivo na ativação do processo de morte celular (Choi *et al*, 2006). Dessa forma, pode-se sugerir que em condições normais (SK-MEL-2 não transfectada), a razão existente entre Bcl-2 e Bax-Bad seja favorável à manutenção da sinalização promovida pela goniotalamina à favor da apoptose, havendo disparo da via extrínseca, com ativação da via intrínseca para amplificar o sinal. Já no caso de superexpressão de Bcl-X_L (SK-MEL-2 transfectada), essa razão provavelmente desfavorece o processo apoptótico, havendo bloqueio da interação entre Bax-Bak e a mitocôndria e assim não há sinalização para a via intrínseca, somente a extrínseca (Figura 56).

Figura 56 - Hipótese para a indução de apoptose pela goniotalamina nas linhagens SK-MEL-2 e SK-MEL-2/Bcl-X_L



Hipótese para a indução de apoptose pela *rac*-GTN nas linhagens SK-MEL-2 e SK-MEL-2 transfectada com Bcl-X_L. A goniotalamina poderia ativar a via apoptótica extrínseca, que levaria à ativação direta de caspases efetoras e à amplificação da resposta mediante ativação da via apoptótica intrínseca. No caso de aumento de expressão das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, nesse caso a Bcl-X_L, há inibição da ativação de Bax e Bak, havendo somente o sinal extrínseco, o que diminuiria a porcentagem de células em apoptose. Figura modificada de Ashkenazi, A (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. Cytokine & Growth Factor Reviews 19:325-331.

De fato, a via extrínseca pode agir diretamente sobre as caspases efetoras ou ainda amplificar seu sinal e disparar a cascata apoptótica intrínseca. Para avaliar tal mecanismo, outros experimentos serão realizados avaliando-se a ativação de caspases 8 e 9 pela goniotalamina nessas linhagens de melanoma.

Observações gerais acerca da atividade pró-apoptótica da goniotalamina

Com base nos experimentos realizados nesse trabalho de doutorado pode-se concluir que a goniotalamina apresenta atividade pró-apoptótica, ao menos nas três linhagens aqui avaliadas. O sinal que inicia essa cascata ainda deve ser explorado, podendo ser a liberação de ROS, como propõem Inayat-Hussain *et al* em diversos trabalhos, com base na diminuição de GSH e na indução de dano ao DNA, que levarão ao disparo do programa de apoptose extrínseca e intrínseca. O fato de haver indução de expressão do gene para caspase 8 no estudo com animais *knockouts* para IL-10 aliado ao fato de haver indução de caspase 8 nos estudos com HT-29 permitem sugerir que há ainda um sinal externo produzido pela goniotalamina que leva ao disparo inicial da cascata apoptótica extrínseca, com ativação da cascata apoptótica intrínseca. A ativação de caspase 8 leva a ativação de caspases executores 3 e 7, que sinalizam para a morte celular ou ainda a caspase 3 pode clivar e ativar a proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, a Bid, que migra para o canal mitocondrial fazendo com que ele se abra e libere citocromo *c*, com ativação de caspase 9, amplificando os sinais pró-apoptóticos do programa extrínseco pelo recrutamento de elementos do programa intrínseco. Corroborando com essa hipótese estão os resultados que mostram a ativação de caspase 9 em HT-29 e o fato de que na linhagem de SK-MEL-2 que expressa mais Bcl-X_L há diminuição da resposta apoptótica, porém não eliminação total do sinal. Ainda que menor, há diminuição da porcentagem de células viáveis e é importante notar que as células comprometidas não possuem marcação exclusiva de 7-AAD, o que exclui a morte por necrose, levando à sugestão de que nessas células a goniotalamina sinaliza para o programa de apoptose extrínseco, que agirá independentemente da mitocôndria.

8 - Considerações finais

Câncer é um conjunto de doenças.

Tumores sólidos são como órgãos e órgãos necessitam de suprimento e suporte do estroma circundante.

Células tumorais não trabalham sozinhas, mas contam com aliados que as circundam, as células acessórias.

O tumor é mantido por um ambiente dinâmico e complexo, que atua em prol da proliferação e sobrevivência.

Esses fatos mostram que a biologia tumoral não pode mais ser tratada levando-se em consideração somente as características das células tumorais, mas sim englobar as contribuições do microambiente que circunda o tumor. Um conjunto de doenças não pode ser tratado com uma terapia, mas sim com um conjunto de terapias que contemple múltiplos mecanismos: terapias multialvos. Mesmo porque a origem de um tumor não é “*single*”, mas “*multi*”: não é a mutação de um gene, mas de quatro ou sete. As células tumorais não apenas resistem aos processos de apoptose, mas também são capazes de se proliferar de maneira autosustentada, evitando sinais supressores de tumor, induzindo angiogênese, invadindo e produzindo metástases. O tumor, através de ferramentas como a instabilidade genômica, mutações e inflamação, manipula o metabolismo energético a seu favor, sem induzir imunidade. Ou seja: é necessário barrar múltiplos mecanismos para conter o desenvolvimento tumoral.

A goniotalamina racêmica apresenta atividade antiproliferativa, anti-inflamatória, antinociceptiva, induz apoptose, previne o desenvolvimento de inflamação crônica aparentemente sem toxicidade nas doses efetivas. Os resultados obtidos até aqui apontam para uma molécula promissora, com ação multialvos, não somente sobre as células tumorais, mas também sobre o ambiente tumoral, modulando a tumorigênese. Além disso, sua síntese é simples, em três etapas com rendimento excelente, possuindo assim um ótimo perfil para aplicação em terapias combinatórias.

Conclusões

Conclusões

- A rota sintética assimétrica e racêmica da goniotalamina é passível de ser realizada em larga escala, o que permite a avaliação da goniotalamina em modelos experimentais *in vivo* e de longa duração.

- A goniotalamina em suas formas de racemato e enantiomericamente puras apresenta atividade antiproliferativa *in vitro*, em concentrações na ordem de μM , sendo que os resultados obtidos para *rac*-GTN são comparáveis aos de seus enantiômeros. Esses dados, aliados ao ótimo rendimento da rota sintética favoreceram a inserção da goniotalamina racêmica nos estudos *in vivo*.

- A *rac*-GTN induziu morte por apoptose nas linhagens tumorais humanas de cólon (HT-29) e de melanoma (SK-MEL-2), com ativação das vias intrínseca e extrínseca. O envolvimento da via mitocondrial não é essencial para a ativação apoptótica, o que foi confirmado com a linhagem SK-MEL-2 transfectada com Bcl-X_L, pois a atividade apoptótica da *rac*-GTN nessa linhagem foi reduzida, porém não foi anulada, o que permite concluir que a via intrínseca é ativada para amplificação do sinal apoptótico e não como via principal.

- A atividade antiproliferativa observada *in vitro* foi confirmada *in vivo*, através da redução do crescimento tumoral nos modelos de tumor sólido e ascítico de Ehrlich e melanoma B16-F10. Essa ação sistêmica não produziu sinais aparentes de toxicidade nas doses efetivas.

- A goniotalamina reduziu o edema de pata produzido por diversos agentes inflamatórios e apresentou atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção produzidos também por processos inflamatórios.

- A relação entre a atividade anti-inflamatória e anticâncer da goniotalamina foi confirmada pela redução do processo inflamatório e tumoral em modelos de colite induzida por TNBS e de colite espontânea que evolui para carcinogênese.

- A diminuição da expressão de TNF α e de MMP-9, mediadores comuns da inflamação e câncer, reforça essa relação.

- Os resultados obtidos e o perfil multi-alvos apresentado pela goniotalamina sugerem sua avaliação em terapias combinatórias para tratamento de processos inflamatórios crônicos e de câncer.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

Adams JM, Cory S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26: 1324-1337.

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link?. *Biochem Pharmacol*, 72: 1605-1621.

Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin. Cancer Res*, 15: 425–430.

Ashkenazi A. (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19(3-4): 325-331.

ATCC: The essentials of life science research. <http://www.atcc.org> acessado no dia 19/03/2012

Baguley BC. (2002). A brief history of cancer chemotherapy. In: Baguley BC & Kerr D. *Anticancer drug development*. Academic press.

Balkwill F, Mantovani A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357: 539-545.

Balkwill F. (2006). TNF α in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 25: 409-416.

Balkwill F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*, 9(5): 361-371.

Balunas MJ, Jones WP, Chin YW, Mi Q, Farnsworth NR, Soejarto DD, Cordell GA, Swanson SM, Pezzuto JM, Chai HB, Kinghorn AD. (2006). Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project. *Chem Biodivers*, 3: 897-915.

Barcelos RC, Pastre JC, Caixeta V, Vendramini-Costa DB, Carvalho JE, Pilli RA. (2012). Synthesis of methoxylated goniotalamin, aza-goniotalamin and γ -pirones and their *in vitro* evaluation against human cancer cells. *Bioorg Med Chem*, 20(11): 3635-3651.

Barnes PJ. (2010b). Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 120: 76–85.

Berg DJ, Davidson N, Kühn R, Müller W, Menon S, Holland G, Thompson-Snipes L, Leach MW, Rennick D. (1996). Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are

associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest*, 98(4): 1010-1020.

Bergami-Santos PC, Mariano M, Barbuto JAM. (2004). Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sci*, 75: 245-255.

Bertagnolli M, Viner JL, Hawk ET. (2008). Cyclooxygenase-2 as a target for cancer prevention and treatment. In: *Molecular Targeting in Oncology (Cancer Drug Discovery and Development)*. Editors: Kaufman HL, Wadler S, Antman K. Springer Sciences. USA.

Bincoletto C, Eberlin S, Figueiredo CA, Luengo MB, Queiroz ML. (2005). Effects produced by royal jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *Int Immunopharmacol*, 5: 679-688.

Bissell MJ, Hines WC. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med*, 17(3): 320-329.

Bosch-Presegué L, Vaquero A. (2011). The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer*, 2(6): 648-662.

Breakman A, Singh KE, Polotskaia A, Kundu N, Bargonetti J. (2011). A p53-independent role of Mdm2 in estrogen-mediated activation of breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res*, 13(1): R3.

Brown NJ, Roberts II LJ. (2001). Histamine, Bradykinin, and their antagonists. In Goodman & Gilman's - *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. Ed. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. McGraw-Hill-International Edition.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4): 611-622.

Campanholle G, Landgraf RG, Borducchi E, Semedo P, Wang PHM, Amano MT, Russo M, Pacheco-Silva A, Jancar S, Camara NOS. (2010). Bradykinin inducible receptor is essential to lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Eur J Pharmacol*, 634: 132-137.

Campos MM, Calixto JB. (1995). Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br J Pharmacol*, 114(5): 1005-1013.

Carvalho WA, Carvalho RDS, Rios-Santos F. (2004). Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: Avanços terapêuticos. *Rev Bras Anestesiol*, 54(3): 448-464.

Chabner BA, Roberts TG Jr. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*, 5(1): 65-72.

Chan KM, Rajab NF, Siegel D, Din LB, Ross D, Inayat-Hussain SH. (2010). Goniiothalamine induces coronary artery smooth muscle cells apoptosis: The p53-dependent caspase-2 activation pathway. *Toxicol Sci*, 116: 533–548.

Chen WY, Wu CC, Lan YH, Chang FR, Teng CM, Wu YC. (2005). Goniiothalamine induces cellcycle-specific apoptosis by modulating the redox status in MDA-MB-231 cells. *Eur J Pharmacol*, 522(1-3): 20-29.

Cheung KL, Khor TO, Huang MT, Kong AN. (2010). Differential *in vivo* mechanism of chemoprevention of tumor formation in azoxymethane/dextran sodium sulfate mice by PEITC and DBM. *Carcinogenesis*, 31(5): 880-885.

Choi HJ, Yee SB, Park SE, Im E, Jung JH, Chung HY, Choi YH, Kim ND. (2006). Petrotetrayndiol A induces cell cycle arrest and apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells through cytochrome c-mediated activation of caspases. *Cancer Lett*, 232: 214–225.

Cirino G, Peers SH, Flower RJ, Browning JL, Pepinsky RB. (1989). Human recombinant lipocortin 1 has acute local anti-inflammatory properties in the rat paw edema test. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(9): 3428-3432.

Claudino RF, Kassuya CA, Ferreira J, Calixto JB. (2006). Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E2-induced mouse paw edema. *J Pharmacol Exp Ther*, 318(2): 611-618.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30: 1073-1081.

Costa R, Fernandes ES, Menezes-de-Lima Jr O, Campos MM, Calixto JB. (2006). Effect of novel selective non-peptide kinin B1 receptor antagonists on mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*, 27: 2967–2975.

Coussens LM, Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420: 860-867.

Cragg GM, Newman DJ. (1999). Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest*, 17:153-163.

Cragg GM, Newman DJ. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*, 100(1-2): 72-79.

Cragg GM, Newman DJ. (2009). Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev*, 8: 313–331.

Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev*, 109: 3012-3043.

- Cromer WE, Mathis JM, Granger DN, Chaitanya GV, Alexander JS. (2011). Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 17: 578-593.
- de Fátima A, Kohn LK, Antonio MA, de Carvalho JE, Pilli RA. (2005) R-Goniothalamine: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. *Bioorg Med Chem*, 13 (8): 2927-2933.
- de Fátima A, Kohn LK, Carvalho JE, Pilli RA. (2006). Cytotoxic activity of (S)-goniothalamine and analogues against human cancer cells. *Bioorg Med Chem*, 14 (3): 622-631.
- de Fátima A, Zambuzzi WF, Modolo LV, Tarsitano CA, Gadelha FR, Hyslop S, Carvalho JE, Salgado I, Ferreira CV, Pilli RA. (2008). Cytotoxicity of goniothalamine enantiomers in renal cancer cells: involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy. *Chem Biol Interact*, 176(2-3): 143-150.
- de Groot DJ, de Vries EG, Groen HJ, de Jong S. (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. *Crit Rev Oncol Hematol*, 61: 52–69.
- Decker S, Hollingshead M, Bonomi CA, Carter JP, Sausville EA. (2004). The hollow fiber model in cancer drug screening: the NCI experience. *Eur J Cancer*, 40(6): 821-826.
- Denny WA. (2001). The contribution of synthetic organic chemistry to anticancer drug development. In: Baguley BC, Kerr D. Anticancer drug development. Academic press.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet*, 29: 117-29.
- DeVita VT Jr, Chu E. (2008). A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res*, 68: 8643-8653.
- Di Lorenzo A, Fernandez-Hernando C, Cirino G, Sessa WC. (2009). Akt1 is critical for acute inflammation and histamine-mediated vascular leakage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 14552–14557.
- Dumitrescu L, Mai Huong DT, Van Hung N, Crousse B, Bonnet-Delpon D. (2010). Synthesis and cytotoxic activity of fluorinated analogues of Goniothalamus lactones. Impact of fluorine on oxidative processes. *Eur J Med Chem*, 45(7): 3213-3218.
- Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*, 18: 884-901.
- Faiçal S, Uehara MH. (1998). Systemic effects and withdrawal syndrome in chronic users of corticosteroids. *Rev Assoc Med Bras*, 44(1): 69-74.
- Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. (1990). Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation*, 14(1): 125-132.

Fröde TS, Souza GE, Calixto JB. (2001). The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, 13: 162–168.

Frogne T, Benjaminsen RV, Sonne-Hansen K, Sorensen BS, Nexø E, Laenkholm AV, Rasmussen LM, Riese DJ II, de Cremoux P, Stenvang J, Lykkesfeldt AE. (2009). Activation of ErbB3, EGFR and Erk is essential for growth of human breast cancer cell lines with acquired resistance to fulvestrant. *Breast Cancer Res Treat*, 114(2): 263-275.

Fulda S. (2009). Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett*, 281(2): 128-133.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. (2011). Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19: 107-120.

Gatenby RA, Gillie, RJ.(2008). A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nature Rev. Cancer*, 8:56-61.

Giner-Larza EM, Mániz S, Giner-Pons RM, Carmen Recio M, Ríos JL. (2000). On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A₂ activity of extracts from lanostane-rich species. *J Ethnopharmacol*, 73(1-2): 61-69.

Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Hovell AM, Landgraf RG, Matheus ME, Pinto Ada C, Fernandes PD. (2008). Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich. *J Ethnopharmacol*, 119(1): 179-184.

Gomes-Santos AC, Moreira TG, Castro-Junior AB, Horta BC, Lemos L, Cruz DN, Guimarães MAF, Cara DC, McCafferty DM, Faria AMC. (2012). New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. *Clin Dev Immunol*, in press.

Gordaliza M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol*, 9: 767-776.

Gordon DJ, Barbie DA, D'Andrea D, Pellman D. (2011). In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, Eds. *Cancer: Principles & Practice of Oncology: Primer of the Molecular Biology of Cancer*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Graeser R, Esser N, Unger H, Fichtner I, Zhu A, Unger C, Kratz F. (2010). INNO-206, the (6-maleimidocaproyl hydrazone derivative of doxorubicin), shows superior antitumor efficacy

compared to doxorubicin in different tumor xenograft models and in an orthotopic pancreas carcinoma model. *Invest New Drugs*, 28: 14-19.

Grisham MB, Beniot JN, Granger DN. (1990). Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. *Methods Enzymol*, 186: 729-742.

Grivennikov SI, Karin M. (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21(1): 11-19.

Günther C, Martini E, Wittkopf N, Amann K, Weigmann B, Neumann H, Waldner MJ, Hedrick SM, Tenzer S, Neurath MF, Becker C. (2011). Caspase-8 regulates TNF α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*, 477(7364): 335-339.

Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.

Hanahan D, Coussens LM. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3): 309-322.

Hogenesch H, Nikitin AY. (2012). Challenges in pre-clinical testing of anti-cancer drugs in cell culture and in animal models. *J Control Release*, in press.

Holbeck SL. (2004). Update on NCI *in vitro* drug screen utilities. *Eur J Cancer*, 40: 785-793.

Hollingshead MG, Alley MC, Camalier RF, Abbott BJ, Mayo JG, Malspeis L, Grever MR. (1995). *In vivo* cultivation of tumor cells in hollow fibers. *Life Sci*, 57(2): 131-141.

Huber MA, Kraut N, Beug H. (2005). Molecular requirements for epithelial- mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 548-558.

Inayat-Hussain SH, Osman AB, Din LB, Ali AM, Snowden RT, MacFarlane M, Cain K. (1999). Caspases-3 and 7- are activated in goniiothalamine-induced apoptosis in human Jurkat T-cells. *FEBS Lett*, 456(3): 379-383.

Inayat-Hussain SH, Annuar BO, Din LB, Ali AM, Ross D. (2003). Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniiothalamine in HL-60 leukemia cells. *Toxicol In vitro*, 17(4): 433-439.

Inayat-Hussain SH, Chan KM, Rajab NF, Din LB, Chow SC, Kizilors A, Farzaneh F, Williams GT. (2010). Goniiothalamine-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis via caspase-2 independent and Bcl-2 independent pathways in Jurkat T-cells. *Toxicol Lett*, 193(1): 108-114.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). (2012) <http://www.inca.gov.br> acesso em 24/04/2012.

Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-EUA). (2012). <http://www.cancer.gov> acesso em 19/03/2012.

Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. (2004). Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 50(2): 81-92.

Kanneganti M, Mino-Kenudson M, Mizoguchi E. (2011). Animal models of colitis-associated carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*, 342637.

Kansra S, Yamagata S, Sneade L, Foster L, Ben-Jonathan N. (2005). Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Mol Cell Endocrinol*, 239: 27–36.

Karin M, Greten FR. (2005). NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 5: 749-759.

Keck GE, Geraci LS. (1993). Catalytic asymmetric allylation (CAA) reactions. II. A new enantioselective allylation procedure. *Tetrahedron Lett*, 34(49): 7827-7828.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. (2010). Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141: 52-67.

Kleeb SR, dos S Rizzo M, Dagli ML, Frussa-Filho R. (1999). Haloperidol increases spreading and nitric oxide production in macrophages from tumor-bearing mice: a possible mechanism for its antitumoral effect. *Int J Immunopharmacol*, 21(9): 575-580.

Ko YM, Wu TY, Wu YC, Chang FR, Guh JY, Chuang LY. (2011). Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor- α -related pathways in MCF-7 cells. *J Ethnopharmacol*, 137(3): 1283-1290.

Kondoh H, Leonart ME, Bernard D, Gil J. (2007). Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization. *Histol Histopathol*, 22: 85-90.

Kumar S, Rajkumar V. (2006). Thalidomide and lenalidomide for the treatment of multiple myeloma. *Eur J Cancer*, 42: 1612-1622.

Kundun JK, Surh YJ. (2008). Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res*, 659(1-2): 15-30.

Lam L, Hu X, Aktary Z, Andrews DW, Pasdar M. (2009). Tamoxifen and ICI 182,780 increase Bcl-2 levels and inhibit growth of breast carcinoma cells by modulating PI3K/AKT, ERK and IGF-1R pathways independent of ER α . *Breast Cancer Res Treat*, 118(3): 605-621.

Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro MAS, Lima TCM. (2008). Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 5ª. Ed– Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM.

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. (2003). IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. *J Immunol*, 170: 3369-3376.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediate the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4): 491-501.

Li H, Fan X, Houghton JM. (2007). Tumor Microenvironment: The Role of the Tumor Stroma in Cancer. *J Cell Biochem*, 101: 805-815.

Litchfield JT Jr, Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther*, 96(2): 99-113.

Lombardi M, Castoria G, Migliaccio A, Barone MV, Di Stasio R, Ciociola A, Bottero D, Yamaguchi H, Appella E, Auricchio F. (2008). Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *J Cell Biol*, 182: 327–340.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3(5): 330-338.

Mantovani A. (2007). Inflammation and cancer: the macrophage connection. *Medicina*, 67(2): 32–34.

Marquissolo C. (2009). Síntese e atividade biológica de análogos furânicos da goniotalamina. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.

Martinez-Pastor B, Mostoslavsky R. (2012). Sirtuins, metabolism and câncer. *Front Pharmacol*, 3: 22.

Mazon E, Esposito E, Di Paola R, Muià C, Crisafulli C, Genovese T, Caminiti R, Meli R, Bramanti P, Cuzzocrea R. (2008). Effect of tumour necrosis factor- α receptor-1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept. *Clin Exp Immunol*, 153(1): 136-149.

McCawley LJ, Matrisian LM. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol*, 13(5): 534-540.

Medzhitov R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140: 771-776.

Mi Q, Pezzuto JM, Farnsworth NR, Wani MC, Kinghorn AD, Swanson SM. (2009). Use of the *in vivo* Hollow Fiber assay in natural products anticancer drug discovery. *J Nat Prod*, 72: 573-580.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. (1991). Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J Natl Cancer Inst*, 83: 757-766.

Monteiro PA (2012). Atividade anticâncer de extratos e frações obtidos de *Croton campestris* A.St.-Hill. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.

Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration on the rat colon. *Gastroenterology*, 96(3): 795-803.

Murakami M, Taketomi Y, Sato H, Yamamoto. (2011). Secreted phospholipase A₂ revisited. *J Biochem*, 150(3): 233-255.

Nascimento FR, Cruz GV, Pereira PV, Maciel MC, Silva LA, Azevedo AP, Barroqueiro ES, Guerra RN. (2006). Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci*, 78: 2650-2653.

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*, 18: 1135-1149.

Nunes FP, Sampaio SC, Santoro ML, Sousa-e-Silva MC. (2007). Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon*, 49(8): 1090-1098.

O'Connor PM, Lapointe TK, Beck PL, Buret AG. (2011). Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 16: 1411-1420.

Oliveira C, Navarro-Xavier RA, Anjos-Vallota EA, Martins JO, Silveira VL, Goncalves LR, Araujo MS, Motta G, Sannomiya P, Oliva ML. (2010). Effect of plant neutrophil elastase inhibitor on leucocyte migration, adhesion and cytokine release in inflammatory conditions. *Br J Pharmacol*, 161: 899-910.

Oloris SCS, Dagli MLZ, Guerra JL. (2002). Effect of beta-Carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. *Life Sci*, 71: 717-724.

Pedernera AM, Guardia T, Calderón CEG, Rotelli AE, de la Rocha NE, Saad J R, López Verrilli MA, Aseff SG, Pelzer LE. (2010). Anti-inflammatory effect of *Acacia visco* extracts in animal models. *Inflammopharmacol*, 18: 253-260.

Penissi AB, Vera ME, Mariani ML, Rudolph MI, Cenal JP, de Rosas JC, Fogal TH, Tonn CE, Favier LS, Giordano OS. (2009). Novel anti-ulcer α,β -unsaturated lactones inhibit compound 48/80-induced mast cell degranulation. *Eur J Pharmacol*, 612, 122-130.

Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. (2004). T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(11): 1556-1558.

Pihie AH, Stanslas J, Din LB. (1998). Non-steroid receptor-mediated antiproliferative activity of styrylpyrone derivative in human breast cancer cell lines. *Anticancer Res*, 18(3A): 1739-1743.

Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. (2004). Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol*, 142(2): 331-338.

Quaglio AEV. (2011). HSP70, Heparanase e HPRT participam da resposta inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, São Paulo.

Raj L, Ide T, Gurkar AU, Foley M, Schenone M, Li X, Tolliday NJ, Golub TR, Carr AS, Shamji AF, Stern AM, Mandinova A, Schreiber SL, Lee SW. (2011). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature*, 475(7355): 231-234.

Rajab NF, Hamid ZA, Hassan H, Ali AM, Din LB, Inayat-Hussain SH. (2005). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of goniothalamin in leukemic cell lines. *Environ Mutagen Res*, 27: 161-164.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. (2007). *Farmacologia*. 6ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, 718.

Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. (2000). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol*, 387(1): 111-118.

Roberts RA. (1989). Bradykinin receptors: characterization, distribution and mechanisms of signal transduction. *Prog Growth Factor Res*, 1: 237-252.

Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A, Boyd MR. (1990). Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with

a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*, 82: 1113-1118.

Rundhaug JE. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 9(2): 267-285.

Sacoman JL, Monteiro KM, Possenti A, Figueira GM, Foglio MA, Carvalho JE. (2008). Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. *Braz J Med Biol Res*, 41: 411-415.

Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG. (1996). Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase in carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol*, 118: 829–838.

Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R. (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med*, 348: 883-890.

Santos ARS, Gadotti VM, Oliveira GL, Tibola D, Paszuck AP, Neto A, Spindola HM, Souza MM, Rodrigues ALS, Calixto JB. (2005). Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology*, 48: 1021–1034.

Segura JA, Barbero LG, Márquez. (2000). Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. *J Immunol Lett*, 74: 111-115.

Scheinin T, Butler DM, Salway F, Scallon B, Feldmann M. (2003). Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clin Exp Immunol*, 133(1): 38-43.

Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. (2010). Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*, 31: 37-49.

Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*, 66: 5224–5231.

Sheil B, MacSharry J, O’Callaghan L, O’Riordan A, Waters A, Morgan J, Collins JK, O’Mahony L, Shanahan F. (2006). Role of interleukin (IL10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knockout mice. *Clin Exp Immunol*, 144(2): 273-280.

Shi B, Liang J, Yang X, Wang Y, Zhao Y, Wu H, Sun L, Zhang Y, Chen Y, Li R, Zhang Y, Hong M, Shang Y. (2007). Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Mol Cell Biol*, 27(14): 5105-5119.

Shoemaker RH. (2006). The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer*, 6: 813-823.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82: 1107-1118.

Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. (2005). An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Gynecol Oncol*, 98: 141-145.

Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: na update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect*, 103, suplemento 7: 113-122.

Spindola HM, Servat L, Denny C, Rodrigues RA, Eberlin MN, Cabral E, Sousa IM, Tamashiro JY, Carvalho JE, Foglio MA. (2010). Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapane-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *BMC Pharmacol*, 10: 1.

Spindola HM, Vendramini-Costa DB, Rodrigues MT Jr, Foglio MA, Pilli RA, Carvalho JE. (2012). The antinociceptive activity of harmicine on chemical-induced neurogenic and inflammatory pain models in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 102(1): 133-138.

Stamenkovic I. (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*, 10(6): 415-433.

Stewart HL. (1959). The Cancer Investigator. *Cancer Res*, 19: 804-818.

Stewart JM, Gera L, Chan DC, York EJ, Simkeviciene V, Bunn PA Jr, Taraseviciene-Stewart L. (2005). Combination cancer chemotherapy with one compound: Pluripotent bradykinin antagonists. *Peptides*, 26: 1288-1291.

Stewart JM, Gera L. (2006). Bradykinin and Cancer. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*. Louisiana, USA: Ed. Abba Kastin.

Strober W, Ludvksson BR, Fuss IJ. (1998). The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. *Ann Intern Med*, 128(10): 848-856.

Sturlan S, Oberhuber G, Beinhauer BG, Tichy B, Kappel S, Wang J, Rogy MA. (2001). Interleukin-10-deficient mice and inflammatory bowel disease associated cancer development. *Carcinogenesis*, 22(4): 665-671.

Sundarraaj S, Kannan S, Thangam R, Gunasekaran P. (2012). Effects of the inhibition of cytosolic phospholipase A₂α in non-small cell lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138: 827-835.

Tai N, Kuwabara K, Kobayashi M, Yamada K, Ono T, Seno K, Gahara Y, Ishizaki J, Hori Y. (2010). Cytosolic phospholipase A₂ alpha inhibitor, pyrroxyphene, displays anti-arthritic and anti-bone destructive action in a murine arthritis model. *Inflamm Res*, 59: 53–62.

Talero E, Sánchez-Fidalgo S, Alarcón de La Lastra C, Illanes M, Calvo JR, Motilva V. (2008). Acute and chronic responses associated with adrenomedullin administration in experimental colitis. *Peptides*, 29: 2001-2012.

Temmink OH, Prins HJ, van Gelderop E, Peters GJ. (2007). The hollow fiber assay as a model for *in vivo* pharmacodynamics of fluoropyrimidines in colon cancer cells. *Br J Cancer*, 96(1): 61-66.

Teng MWL, Scheidt B, Duret H, Towne JE, Smyth MJ. (2011). Anti-IL-23 monoclonal antibody synergizes in combination with target therapies or IL-2 to suppress tumor growth and metastases. *Cancer Res*, 71: 2077-2086.

Tosato G, Segarra M, Salvucci O. (2010). Cytosolic Phospholipase A₂ and Cancer: A Role in Tumor Angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 102 (18): 1377-1379.

Trachootham D, Alexandre J, Huang P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, 8: 579–591.

Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IFJ. (2007). Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. *J Natl Cancer Inst*, 99: 1441-1454.

Vendramini-Costa DB, Castro IBD, Ruiz ALTG, Marquissolo C, Pilli RA, Carvalho JE. (2010). Effect of goniothalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorg Med Chem*, 18: 6742-6747.

Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. (2012). Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. *Curr Pharm Des*, 18 (26): 3831-3852.

Visser KE, Eichten A, Coussens LM. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, 6: 24-37.

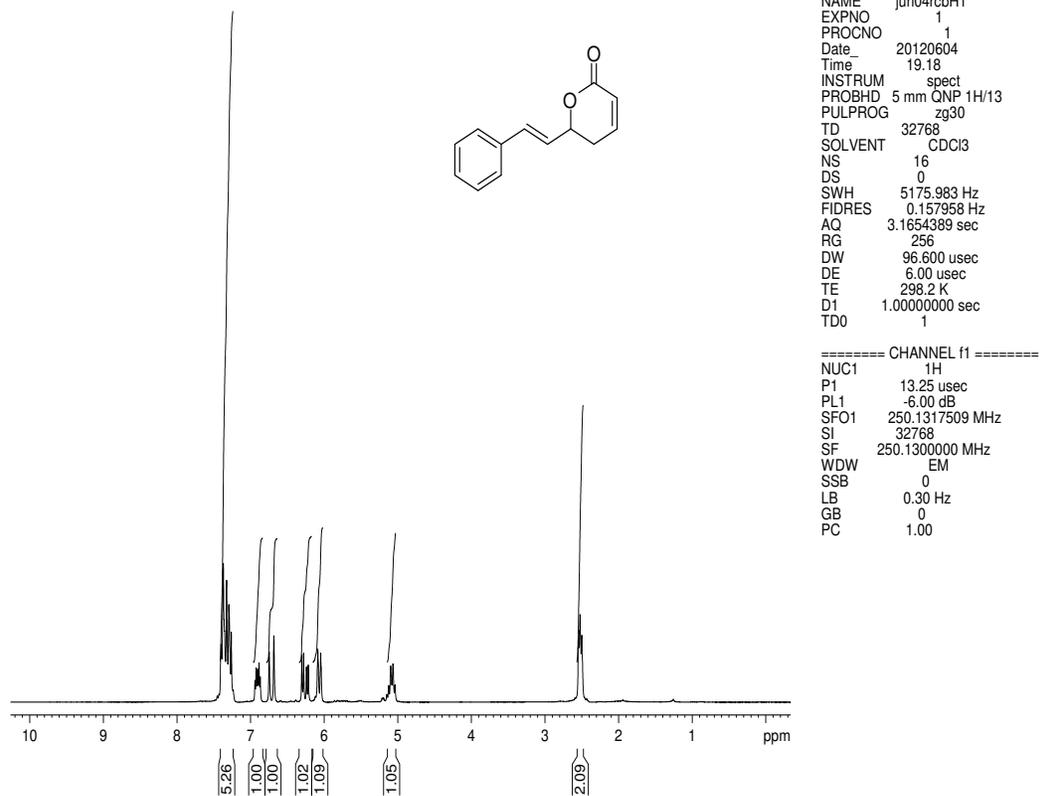
- Wach JY, Güttinger S, Kutay U, Gademann K. (2010). The cytotoxic styryl lactone goniiothalamine is an inhibitor of nucleocytoplasmic transport. *Bioorg Med Chem Lett*, 20(9): 2843-2846.
- Walczak H. (2011). TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev*, 244: 9-28.
- Wang D, Dubois RN. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*, 10: 181-193.
- Webster BR, Lu Z, Sack MN, Scott I. (2012). The role of sirtuins in modulating redox stressors. *Free Radic Biol Med*, 52(2): 281-290.
- Weinberg RA. (2008). *A biologia do câncer*. Porto Alegre: Artmed.
- Whiteside TL. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27: 5904-5912.
- Wiert C. (2007). Goniiothalamus species: a source of drugs for the treatment of cancers and bacterial infections? *Evid Based Complement Alternat Med*, 4(3): 299-311.
- Wilson MS, Ramalingam TR, Rivollier A, Shenderov K, Mentink-Kane MM, Madala SK, Cheever AW, Artis D, Kelsall BL, Wynn TA. (2011). Colitis and intestinal inflammation in IL10(-/-) mice results from IL-13R α 2-mediated attenuation of IL-13 activity. *Gastroenterology*, 140: 254-264.
- Winterbourn CC, Brennan SO. (1997). Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem J*, 326(Pt 1): 87-92.
- Witaicenis A, Luchini AC, Hiruma-Lima CA, Felisbino SL, Garrido-Mesa N, Utrilla P, Gálvez J, Di Stasi LC. (2011). Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylscutellin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine. *Chem Biol Interact*, 195(1): 76-85.
- Yao Z, Che XC, Lu R, Zheng MN, Zhu ZF, Li JP, Jian X, Shi LX, Liu JY, Gao WY. (2007). Inhibition by tyrosyleptide (YSL) on the invasion and adhesion of the mouse melanoma cell. *Mol Med*, 13(1-2): 14-21.
- Zhang JP, Qin HY, Wang L, Liang L, Zhao XC, Cai WX, Wei YN, Wang CM, Han H. (2011). Overexpression of notch ligand DIII1 in B16 melanoma cells leads to reduced tumor growth due to attenuated vascularization. (2011). *Cancer Lett*, 309(2): 220-227.
- Zhivotovsky B, Orrenius S. (2006). Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis*, 27(10): 1939-1945.

Anexos

Anexo 1

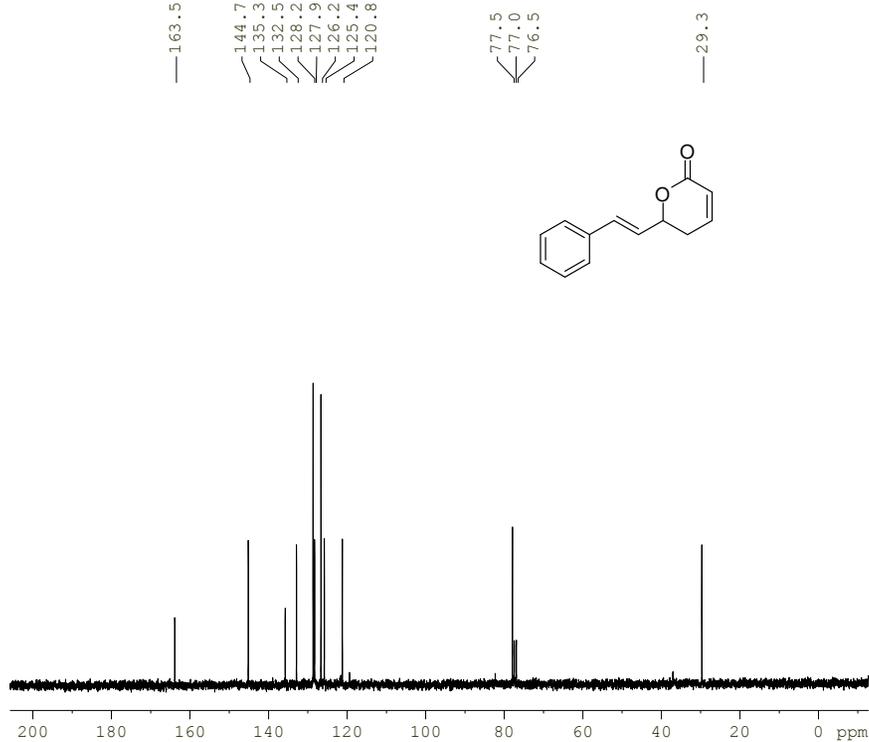
Espectros de ressonância magnética nuclear da goniotalamina

Rosi - CDCl₃ - 250 MHz - jun04rcbH1 - GNT racêmica



Espectro 1. ¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) da goniotalamina racêmica.

Rosi - CDCl3 - 250 MHz - jun04rcbC - GNT racêmica



NAME jun04rcbC1
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20120604
Time 19.10
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 16384
SOLVENT CDCl3
NS 10
DS 0
SWH 15060.241 Hz
FIDRES 0.919204 Hz
AQ 0.5439988 sec
RG 812.7
DW 33.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.2 K
D1 2.0000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 1.89999998 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 62.9015280 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 100.00 usec
PL2 -6.00 dB
PL12 11.56 dB
PL13 18.00 dB
SFO2 250.1310005 MHz
SI 32768
SF 62.8952390 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Espectro 2. ¹³C-RMN (62,5 MHz, CDCl₃) da goniotalamina racêmica.

Rosi - CDCl3 - 250 MHz - jun04rcbD - GNT racêmica



NAME jun04rcbD
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20120604
Time 19.04
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG dept135
TD 16384
SOLVENT CDCl3
NS 65
DS 4
SWH 15060.241 Hz
FIDRES 0.919204 Hz
AQ 0.5439988 sec
RG 1024
DW 33.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.2 K
CNST2 145.0000000
D1 2.00000000 sec
d2 0.00344828 sec
d12 0.00002000 sec
DELTA 0.00001273 sec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 10.00 usec
p2 20.00 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 62.9015280 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
P3 13.25 usec
p4 26.50 usec
PCPD2 100.00 usec
PL2 -6.00 dB
PL12 11.56 dB
SFO2 250.1310005 MHz
SI 32768
SF 62.8952390 MHz
WDW EM
SSB 0

Espectro 3. Dept 135 (62,5 MHz, CDCl₃) da goniotalamina racêmica.

Artigos publicados durante o doutorado.

Trabalho apresentando resultados parciais do projeto de doutorado.

Vendramini-Costa *et al*, (2010). Effect of goniotalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorg Med Chem*, 18: 6742-6747.

Bioorganic & Medicinal Chemistry 18 (2010) 6742–6747



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



Effect of goniotalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice

Débora Barbosa Vendramini-Costa^{a,b,c}, Ilton Barros Daltro de Castro^c, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz^b,
Cilene Marquissolo^c, Ronaldo Aloise Pilli^{a,c,*}, João Ernesto de Carvalho^{a,b}

^aPrograma de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^bDivisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, CP 6171, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^cDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNICAMP, CP 6154, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2010

Revised 19 July 2010

Accepted 22 July 2010

Available online 27 July 2010

Keywords:

Goniotalamin

Cancer

Mice

Ehrlich solid tumor

ABSTRACT

In this work the antiproliferative activity of goniotalamin (**1**), both in racemic and in its enantiomeric pure forms, in a solid tumor experimental model using laboratory animals is described. The antiedematogenic activity displayed by racemic **1** in the carrageenan edema model in mice together with the reduction of Ehrlich solid tumor model suggest a relationship between anticancer and antiinflammatory activities with the antiinflammatory activity favoring the antiproliferative activity itself.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Revisão sobre os mecanismos que suportam a relação câncer-inflamação. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. (2012). Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. *Curr Pharm Des*, 18(26): 3831-3852.

 **PubMed**

US National Library of Medicine
National Institutes of Health

[Display Settings:](#) Abstract [Send to:](#)

★ Performing your original search, **Vendramini-Costa**, in PubMed will retrieve 5 records.

[Curr Pharm Des](#), 2012 May 22. [Epub ahead of print]

Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer.

[Vendramini-Costa DB](#), [Carvalho JE](#).
Pharmacology and Toxicology Division, Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center, Campinas State University, Campinas-SP, Brazil.
carvalho_je@yahoo.com.br.

Abstract
Inflammation is part of the body's response to internal and external environmental stimuli that normally eliminate the aggressor agent and restore the tissue physiology. However, when it becomes chronic, it can cause several pathologies such as cardiovascular, diabetes, rheumatoid arthritis, Alzheimer's, lung, autoimmune diseases and cancer. Currently, epidemiological data indicate that over 25% of all cancers are related to chronic infections and other types of unresolved inflammation. Further evidence of this relationship is the fact that prolonged use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) has been associated with reduced risk for developing many types of cancers. Some randomized trials have shown that NSAIDs have protective action against colon adenomas, breast, prostate, and lung cancers. The inflammation present on tumor microenvironment is characterized by leukocyte infiltration, ranging in size, distribution and composition, as: tumor-associated macrophages (TAM), mast cells, dendritic cells, natural killer (NK) cells, neutrophils, eosinophils and lymphocytes. These cells produce a variety of cytotoxic mediators such as reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS respectively), serine and cysteine proteases, membrane perforating agents, matrix metalloproteinase (MMP), tumor necrosis factor α (TNF α), interleukins (IL-1, IL-6, IL-8), interferons (IFNs) and enzymes, as cyclooxygenase-2 (COX-2), lipooxygenase-5 (LOX-5) and phospholipase A2 (PLA2), which activate or are activated by transcription factors nuclear factor κ B (NF- κ B) and signal transducers and activators of transcription-3 (STAT3). Initially this paper will briefly review the main mediators present on tumor microenvironment, addressing the cytokines, chemokines, transcription factors, eicosanoid, and kinins and later, will present an overview of the role of inflammation in the different steps of carcinogenesis.

PMID: 22632748 [PubMed - as supplied by publisher]

 **LinkOut - more resources**

Trabalho realizado em parceria com o Instituto de Química-UNICAMP, parte do projeto temático “Biologia Química: Novos Alvos Moleculares Naturais e Sintéticos contra o Câncer. Estudos Estruturais, Avaliação Biológica e Modo de Ação”, Processo FAPESP nº 2009/51602-5.

Barcelos *et al.* (2012). Synthesis of methoxylated goniotalamin, aza-goniotalamin and γ -pyrones and their *in vitro* evaluation against human cancer cells. *Bioorg Med Chem*, 20(11): 3635-3651.

Bioorganic & Medicinal Chemistry 20 (2012) 3635–3651



Synthesis of methoxylated goniotalamin, aza-goniotalamin and γ -pyrones and their *in vitro* evaluation against human cancer cells

Rosimeire Coura Barcelos^a, Julio Cezar Pastre^a, Vanessa Caixeta^a, Débora Barbosa Vendramini-Costa^{b,c}, João Ernesto de Carvalho^{b,c}, Ronaldo Aloise Pilli^{a,b,*}

^a Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNICAMP, CP 6154, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, UNICAMP, CP 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^c Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, CP 6171, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2012

Revised 16 March 2012

Accepted 23 March 2012

Available online 1 April 2012

Keywords:

Goniotalamin

Cancer cells

Antiproliferative activity

γ -Pyrones

Dihydro- γ -pyrones

Aza-goniotalamin

ABSTRACT

The present work describes the preparation of three novel series of compounds based on the structure of goniotalamin, a natural styryl lactone which has been found to display cytotoxic and antiproliferative activities against a variety of cancer cell lines. A focused library of 29 novel goniotalamin analogues was prepared and evaluated against seven human cancer cell lines. While the γ -pyrones and the aza-goniotalamin analogues were less potent than the lead compound, 2,4-dimethoxy analogue **88** has shown to be more potent *in vitro* than goniotalamin against all cancer cell lines evaluated. Furthermore, it was more potent than doxorubicin against NCI-ADR/RES, OVCAR-03 and HT-29 while being less toxic to human keratinocytes (HaCat). The 3,5-dimethoxy analogue **90** and 2,4,5-trimethoxy analogue **92** also displayed promising antiproliferative activity when compared to goniotalamin (**1**). These results provide new elements for the design and synthesis of novel representatives of this family of natural compounds.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Trabalho realizado em parceria com o Instituto de Química-UNICAMP e a Divisão de Fitoquímica-CPQBA-UNICAMP.

Spindola *et al*, (2012). The antinociceptive activity of harmicine on chemical-induced neurogenic and inflammatory pain models in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 102(1): 133-138.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 102 (2012) 133–138



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh



The antinociceptive activity of harmicine on chemical-induced neurogenic and inflammatory pain models in mice

Humberto M. Spindola^a, Débora B. Vendramini-Costa^{a,b}, Manoel T. Rodrigues Jr.^b, Mary A. Foglio^{a,*}, Ronaldo A. Pilli^a, João E. Carvalho^a

^a CPQBA, University of Campinas, P.O. Box 6171, 13083-970 Campinas-SP, Brazil

^b Institute of Chemistry, University of Campinas, P.O. Box 6154 UNICAMP, Campinas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 September 2011
Received in revised form 29 March 2012
Accepted 31 March 2012
Available online 6 April 2012

Keywords:

Antinociception
Medicinal chemistry
 β -carboline

ABSTRACT

Harmicine is a β -carboline alkaloid isolated and identified as a major active compound present in many plant species and marine invertebrates. This alkaloid exhibits a wide spectrum of pharmacological activities, including antispasmodic, antipyretic, and anticancer properties. This report described the antinociceptive properties of harmicine by means of chemical experimental models in order to evaluate the use for pain relief. The results demonstrating the potential analgesic properties of harmicine administered intraperitoneally were shown with the writhing test, reducing writhes around 60% (1 mg/kg), and in the formalin test, where harmicine was more effective toward neurogenic (reducing reaction time around 60%, 1 mg/kg) than inflammatory (68% reduction, 10 mg/kg) pain responses. Furthermore, these effects may operate via vanilloid receptors as revealed by the capsaicin test (41% reduction, with 3 mg/kg), as well as via peripheral glutamate receptors as shown by the glutamate test (50% reduction, with 1 mg/kg). Moreover, the opioid antagonist naloxone hydrochloride did not interfere in the antinociceptive properties of harmicine in the writhing test, revealing that this effect may not have a relationship with the opioid systems. Concluding, this report highlights harmicine as a new candidate to be used as analgesic in the future. Therefore, further studies are being undertaken in order to understand the exact mechanisms involved with the antinociceptive properties of harmicine.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Trabalho realizado em parceria com o Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, Instituto de Biociências-UNESP, Botucatu.

Seito *et al.*, (2011). Antiproliferative activity of three methoxylated flavonoids isolated from *Zeyheria Montana* Mart. (Bignoniaceae) leaves. *Phytotherapy Res*, 25: 1447-1450.

PHYTOTHERAPY RESEARCH
Phytother. Res. 25: 1447–1450 (2011)
Published online 24 February 2011 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ptr.3438

Antiproliferative Activity of Three Methoxylated Flavonoids Isolated from *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) Leaves

Leonardo Noboru Seito,¹ Ana Lucia Tasca Goiz Ruiz,² Debora Vendramini-Costa,² Sirlene Valério Tinti,² João Ernesto de Carvalho,² Jairo Kenupp Bastos³ and Luiz Claudio Di Stasi^{1*}

¹Universidade Estadual Paulista – UNESP, Institute of Biosciences, Department of Pharmacology Laboratory of Phytomedicines, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil

²Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, P.O. Box 6171, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

³Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

The present study isolated three major active flavonoids, two flavones named 4',5,7-trimethoxy-luteolin (1) and 6-hydroxy-5,7-dimethoxyflavone (2) and the flavanone 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone (3) from *Zeyheria montana* dichloromethane leaf extract. Isolation and purification were conducted with the application of column chromatography and structures were assigned by spectral analysis. All compounds were evaluated for cytotoxic activities against human tumor cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (breast expressing phenotype multiple drug resistance), 786-0 (renal), NCI-H460 (lung, non-small cells), PC-3 (prostate), OVCAR-3 (ovarian), HT-29 (colon) and K562 (leukemia) *in vitro*. All compounds were active in different degrees on several tumor cell lines and flavanone 3 showed cytotoxicity against almost all cell lines, particularly against human NCI-ADR/RES and K562 cell lines. In conclusion, three antiproliferative compounds were isolated for the first time from *Zeyheria montana* and its leaves were characterized as an important source of methoxylated flavones and flavanone as potential antitumor compounds. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Zeyheria Montana*; Bignoniaceae; flavonoids; antiproliferative activity; flavones; flavanones.

Aprovações do Comitê de Ética no uso de animais de experimentação.



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1425-1**, sobre "**Atividade anticâncer e mecanismo de morte celular de derivados de estiril lactonas**" sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Débora Barbosa Vendramini Costa** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de **19 de dezembro de 2007**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1425-1**, entitled "**Anticancer activity and cell death mechanisms of stiril lactones derivates**", is in agreement with the Ethica Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Anima Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutiona Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on **december 19, 2007**.

Campinas, 19 de dezembro de 2007

Prof. Dr. Stephen Hyslop
Presidente em exercício

Fátima Alonso
Secretária Executiva



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

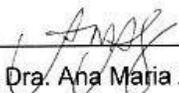
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2124-2, sobre "Atividade anticancer e mecanismos de morte celular de derivados de estiril-lactonas", sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Débora Barbosa Vandramini Costa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 03 de maio de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2124-2, entitled "Anticancer activity and cell death mechanisms of stiril lactones derivates", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 3, 2010.

Campinas, 03 de maio de 2010.



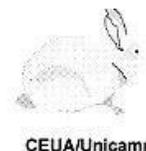
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

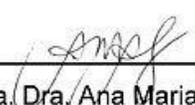
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2126-2**, sobre "Atividade antiinflamatória de derivados de estiril-lactonas em modelos de edema de pata e estudos de mecanismos de ação através de mediadores inflamatórios", sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Débora Barbosa Vandramini Costa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **03 de maio de 2010**.

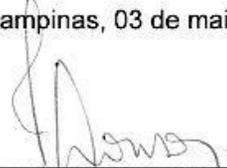
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2126-2**, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **May 3, 2010**.

Campinas, 03 de maio de 2010.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada "Goniotalamina: atividade antitumoral e anti-inflamatória":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 1423-1, 1425-1, 1435-1, 1417-1, 2126-2, 2124-1. Instituição: IB-UNICAMP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Débora B Vendramini Costa.
Aluna: Débora Barbosa Vendramini Costa

João Ernesto de Carvalho
Orientador: João Ernesto de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Ana Maria Aparecida Guaraldo
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura