

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA APLICADA

Lucas Lourenço Marostica

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EFEITO
ANITUMORAL DE TRATAMENTOS COMBINADOS DE UM
DERIVADO DA CUCURBITACINA B COM FÁRMACOS
ANTINEOPLÁSICOS FRENTE A TUMOR DE PULMÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências

Orientadora: Prof(a). Dr(a).
Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Marostica, Lucas Lourenço

AValiação IN VITRO E IN VIVO DO EFEITO ANTITUMORAL DE
TRATAMENTOS COMBINADOS DE UM DERIVADO DA CUCURBITACINA B
COM FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS FRENTE A TUMOR DE PULMÃO /
Lucas Lourenço Marostica ; orientadora, Cláudia Maria
Oliveira Simões - Florianópolis, SC, 2016.

180 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Cucurbitacinas. 3.
Câncer. 4. Morte celular. 5. Tumor xenográfico de pulmão.
I. Simões, Cláudia Maria Oliveira . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências. III. Título.

"Avaliação *in vitro* e *in vivo* do efeito antitumoral de tratamentos combinados de um derivado da cucurbitacina B com fármacos antineoplásicos frente à tumor de pulmão"

Por

Lucas Lourenço Marostica

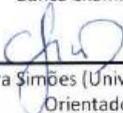
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (02/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



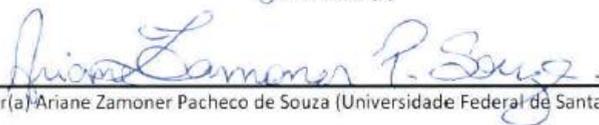
Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

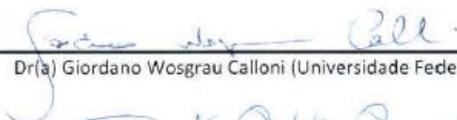
Banca examinadora:



Dr(a) Claudia Maria Oliveira Simões (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Giordano Vosgrau Calloni (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Ricardo Castilho Garcez (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Eduardo Cremonese Filippi Chiela (Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- videoconferência)



Dr(a) Elaine Amaral Leite (Universidade Federal de Minas Gerais)

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
Ademar e Vera, e o meu irmão Leonardo,
que me apoiam incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, quero agradecer de maneira especial minha orientadora, Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, por toda a confiança, ideias e condições que possibilitaram o desenvolvimento desta tese de doutoramento. Estes últimos quatro anos trabalhando em equipe, com toda certeza, contribuíram e muito na minha formação profissional e também humana.

Agradecimentos especiais também aos meus pais, Ademar e Vera, e meu irmão Leonardo, que sempre estiveram juntos em todos os momentos estimulando-me a superar os desafios e também comemorando as conquistas.

Aos colegas do LVA/UFSC: Ana Dominot, Ana Zeredo, Annelise de Carvalho, Ariadne Cabral da Cruz, Camila Schissi, Carlos Quiroz, Caroline Rigotto, Clarissa Feltrin, Debora Argenta, Dóris Souza, Elisabet Serrano, El-Mahdy Mohamed ElMahdy, Fabiana Geller, Francielle Cardoso, Gislaine Fongaro, Henrique Herbst, Izabella Thaís, Jadel Kratz, Lara Persich, Lucas Garcia, Laurita Boff, Maria Elisa, Mariana Nascimento, Mariana Pilotto, Marina Teixeira, Naira Schneider, Paula Brambila, Talitha Caldas, Thiago Caon, Vanessa Moresco, Vitor Chaves e à Professora Célia Barardi, pela amizade, aprendizados e desafios superados em conjunto. Agradecimento especial para a Lara, aluna de iniciação científica participante deste estudo, que sempre esteve disposta a aprender, colaborar e nos estimular com seu bom humor.

Aos amigos e colegas do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP, CCB, UFSC) e do Departamento de Ciências Farmacêuticas (CIF, CCS, UFSC), pelos aprendizados que compartilhamos.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuários (LAMEB), Bibiana, Dênis e Vanessa, pela disponibilidade e ajuda durante a realização de experimentos no LAMEB I.

Aos colegas da Faculdade de Farmácia, UFMG: Ana, Aina, Batista, Caroline, Dalila, Délia, Fernanda, Flávia, Gabriel, Jeniffer, Léo, Lívica, Liziane, Mariana, Marina, Marcela, Marjorie, Mayara, Michelle e

Renata, pela amizade, aprendizado e disponibilidade em ajudar-me a continuar o trabalho em outro laboratório com outra rotina e com um novo modelo experimental. Agradecimento especial para a Juliana que me auxiliou nas análises histológicas, e também para a Sávía, que possibilitou todo o suporte e parceria para os experimentos com cultivo celular. Aos Professores Drs. Gilson Ramaldes e Elaine Leite pelas ideias, apoio e experiências compartilhadas nos intervalos de almoço e durante os seminários de laboratório.

Ao Prof. Dr. Geovanni Cassali e seu aluno Breno Salgado pela gentileza de disponibilizar o Laboratório de Patologia Comparada/UFMG para a realização das análises histológicas e histomorfométricas, além da atenção dispensada para a análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel (CIF, CCS, UFSC), pela colaboração fornecendo o derivado semissintético da cucurbitacina e pelo suporte ao longo do desenvolvimento desta tese.

Agradecimento especial aos Profs Drs. Mônica Cristina de Oliveira e André Barros, que me receberam na UFMG com muita organização, dedicação e profissionalismo. A Profa. Mônica foi essencial ao facilitar minha adaptação em Minas Gerais, além de coordenar todos os planejamentos experimentais com muita harmonia e confiança. O Prof. André foi um importante parceiro, estando presente em todos os experimentos realizados, além de ajudar-me a analisar os dados obtidos com muita clareza, objetividade e dedicação.

Às agências de fomento FAPESC, FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro e a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado durante estes quatro anos.

A todos os meus amigos gaúchos, catarinenses e mineiros, meu sincero agradecimento por acompanharem minha trajetória com muito companheirismo, e belas e divertidas experiências vivenciadas.

E, sobretudo, agradeço a Deus por ser tão maravilhoso comigo, colocando pessoas especiais em minha vida e, principalmente, por conduzir meus passos, abrindo-me portas e iluminando sempre o meu caminho.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha
mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade
continua misterioso diante de meus olhos”*
Isaac Newton

RESUMO

O câncer de pulmão é um dos tumores malignos mais comuns e com maior taxa de mortalidade, indicando a necessidade da busca por intervenções terapêuticas mais eficientes. As cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos poli-hidroxiados, reconhecidas como compostos com promissora atividade antitumoral. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos antitumorais de um novo derivado semissintético da cucurbitacina B, a DACE, em esquemas de tratamento combinado com três fármacos antineoplásicos: cisplatina, irinotecano e paclitaxel, frente a uma linhagem de células de câncer de pulmão humano (A549). A DACE apresentou efeito sinérgico com todos os fármacos testados e as combinações mais efetivas induziram bloqueio da fase G2/M do ciclo celular por modular a expressão de p53 e survivina, além de induzir alterações na homeostase do citoesqueleto e morte celular via apoptose. Os tratamentos combinados inibiram completamente o potencial clonogênico das células A549, sem interferir na proliferação de fibroblastos saudáveis de pulmão humano (MRC-5). A DACE inibiu a migração e invasão das células A549, sendo que os tratamentos combinados modularam vias de sinalização relacionadas com os processos de migração celular e metástase. O efeito antiproliferativo da DACE associado com os fármacos foi potencializado pela L-butionina-sulfoximina, e atenuado pela N-acetilcisteína, indicando possível envolvimento da via oxidativa neste efeito. Os efeitos citotóxicos dos tratamentos combinados também foram reduzidos por um inibidor de caspases, indicando que a morte celular via apoptose é dependente da ação de caspases. Após esta etapa, foi selecionada a associação mais promissora [DACE+paclitaxel (PAC)] para ser testada com modelo xenográfico ectópico de tumor de pulmão com células A549. Após trinta dias da inoculação das células tumorais nos animais, pode ser observado o desenvolvimento dos tumores, os quais foram detectados e monitorados por meio de imagens cintilográficas com a administração do radioisótopo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Após o tratamento dos animais, foi observado que a associação DACE+PAC foi o esquema de tratamento mais promissor porque inibiu o crescimento dos tumores e reduziu a massa tumoral residual viável do tecido tumoral, em comparação com os tratamentos individualmente. Além disso, o tratamento combinado não induziu danos compatíveis com hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. O conjunto destes dados comprova que a associação DACE+PAC exerceu ação antitumoral mais promissora, tanto *in vitro* como *in vivo*, com baixa toxicidade para tecidos não tumorais, sendo esse esquema também menos susceptível ao desenvolvimento de resistência.

Palavras-chave: cucurbitacinas, citotoxicidade, apoptose, sinergismo, células A549, tumor xenográfico de pulmão, paclitaxel, imagens cintilográficas.

ABSTRACT

In addition to the higher mortality rate, lung cancer is also one of the most common malignant tumors, which increases the need for more effective therapeutic interventions. Cucurbitacines are tetracyclic triterpenoids polyhydroxy recognized as compounds which present promising antitumor activity. The aim of this study was to evaluate the antitumor effects of a new semi-synthetic derivative of cucurbitacin B, DACE, combined with three anticancer drugs: cisplatin, irinotecan and paclitaxel, against a cell line of human lung cancer cells (A549). DACE showed synergistic effects with all drugs tested and the most active combinations induced antiproliferative effects by cell cycle G2/M arrest, modulated the p53 and survivin expression, as well as induced alterations in cytoskeletal homeostasis and led to cell death via apoptosis. The combined treatments completely inhibited the clonogenic potential of A549 cells and did not harm the cell proliferation of nontumoral human lung fibroblasts (MRC-5). DACE treatment also inhibits migration and invasion of A549 cells, and the combined treatments modulate signaling pathways related to cell migration and metastasis processes. The antiproliferative effect of DACE associated with the drugs was enhanced by L-butionine sulfoximine, and attenuated by N-acetylcysteine, indicating a possible involvement of oxidative pathway in these effects. The cytotoxic effects of the combined treatments were also reduced by a caspase inhibitor, indicating an activity caspase-dependent cell death. Therefore, the most promising combination [DACE + Paclitaxel (PAC)] was selected to be evaluated with an ectopic xenograft model of A549 lung cancer cells. Thirty days after the tumor cell inoculation in the animals, the tumor development was detected and monitored through scintigraphic images with the radioisotope ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ administration. After the treatment of the animals, the combined scheme with PAC + DACE was the most promising treatment regimen because it inhibited tumor growth and reduced residual viable tumor tissue, when compared to the individual treatments. Furthermore, the combined treatment did not induce damage compatible with hepatotoxicity and nephrotoxicity. In summary, the set of these data shows that the combined therapy with DACE + PAC showed both in vitro and in vivo most promising antitumor activity, with low toxicity to nontumor tissues, and the development of resistance to the combined treatment was less likely to occur.

Keywords: cucurbitacines, cytotoxicity, apoptosis, synergism, A549 cells, xenograft lung tumor, paclitaxel, scintigraphic images.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| Figura 1. Principais características das células tumorais | 33 |
| Figura 2. Distribuição dos tipos de câncer, de acordo com o sexo: estimativas para 2016 e 2017 no Brasil | 37 |
| Figura 3. Etapas do processo de metástase | 41 |
| Figura 4. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose | 44 |
| Figura 5. Tipos de morte celular programada não apoptótica | 46 |
| Figura 6. Fármacos alvo-específicos para o tratamento de tumores de pulmão do tipo células não pequenas | 53 |
| Figura 7. Modelos xenográficos para estudo de tumores | 55 |
| Figura 8. Complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ com seus coligantes | 61 |
| Figura 9. Esqueleto básico das cucurbitacinas | 63 |
| Figura 10. Processo de semissíntese da DACE a partir do precursor, a cucurbitacina B | 68 |

CAPÍTULO II – Artigo 1 publicado - Efeitos antiproliferativos de um derivado da cucurbitacina B com fármacos antitumorais em células A549 de tumor de pulmão

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Reagents, conditions and synthesis of DACE | 93 |
| Figure 2. ChemGPS-NP analysis of DACE (pink) together with the NCI reference data set of anticancer drugs | 116 |
| Figure 3. DACE combined with CIS, IRI, and PAC showed potential synergistic cell growth inhibition and dependent manner of ROS generation on A549 cells | 117 |
| Figure 4. DACE combined with drugs completely reduced clonogenic survival, induces G2/M cell cycle arrest, and apoptosis on A549 cells. Combined treatments did not harm the proliferative potential of nontumoral lung cells (MRC-5) | 119 |
| Figure 5. DACE combined with drugs induces morphological alterations of F-actin on cytoskeleton and nuclear morphological alterations | 121 |
| Figure 6. DACE is a potential inhibitor of cell migration and cell invasion and combinations of DACE with drugs modulates proliferation, cell death, and migration pathways on A549 cells | 123 |

CAPÍTULO III - Artigo 2 publicado - Estabelecimento de um modelo xenográfico de tumor de pulmão humano e sua detecção com o agente ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎

- Figure 1. Xenograft lung cancer experimental model at 30 days after inoculation of non-small cell lung cancer cell line (A549) into nude female BALB/c mice 137
- Figure 2. Scintigraphic images (256 x 256 x 16 matrix size) obtained at 1 and 4 h after ^{99m}Tc-HYNIC-βAla- Bombesin₍₇₋₁₄₎ intravenous administration (7.4 MBq) into lung tumor-bearing mice anesthetized with ketamine and xylazine 138

CAPÍTULO IV - Efeito antitumoral da terapia combinada do DACE com paclitaxel em modelo xenográfico de tumor de pulmão humano

- Figura 1. Esquema representativo do protocolo experimental dos tratamentos 142
- Figura 2. Variação percentual dos volumes tumorais xenográficos de pulmão, em camundongos Balb/c nudes após diferentes tratamentos 148
- Figura 3. Imagens representativas dos tumores nos animais após término dos tratamentos 150
- Figura 4. Imagens cintilográficas representativas de tumores xenográficos de pulmão humano, antes e após os tratamentos 152
- Figura 5. Valores de razão entre a relação alvo/não alvo final e inicial obtidos por meio de imagens cintilográficas de camundongos Balb/c nude com tumor de pulmão submetidos a diferentes tratamentos 153
- Figura 6. Variação do peso corporal de camundongos Balb/c nudes com tumor xenográfico de pulmão, após diferentes tratamentos 156
- Figura 7. Fotografia ilustrativa da reação cutânea observada após administração intravenosa caudal dos tratamentos 157
- Figura 8. Fotomicrografias (400x) representativas de preparações histológicas coradas com hematoxilina-eosina do tecido hepático de camundongos Balb/c nude fêmeas com tumor xenográfico de pulmão, após diferentes tratamentos 159
- Figura 9. Fotomicrografias (400x) representativas de preparações histológicas coradas com hematoxilina-eosina do tecido renal de camundongos Balb/c nude fêmeas com tumor xenográfico de pulmão, após diferentes tratamentos 160

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Modelos pré-clínicos utilizados para o desenvolvimento de fármacos para tratamento de tumores de pulmão | 57 |
|---|----|

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – Artigo 1 publicado - Efeitos antiproliferativos de um derivado da cucurbitacina B com fármacos antitumorais em células A549 de tumor de pulmão

| | |
|--|-----|
| Table 1. Cell proliferation inhibition of DACE on different cancer cell lines | 99 |
| Table 2. Cell proliferation inhibition of DACE and chemotherapy drugs on A549 cells | 99 |
| Table 3. Synergistic antiproliferative effects of the most effective combinations of DACE with selected chemotherapy drugs on A549 cells | 100 |

CAPÍTULO IV - Efeito antitumoral da terapia combinada do DACE com paclitaxel em modelo xenográfico de tumor de pulmão humano

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Resultados obtidos relativos às doses totais, variação dos volumes relativos dos tumores (VRT) e de inibição do crescimento (IC) dos tumores xenográficos de pulmão, em camundongos Balb/c nudes, após diferentes tratamentos | 146 |
| Tabela 2. Análise dos marcadores bioquímicos das funções hepática e renal no soro de camundongos Balb/c nudes com tumor xenográfico de pulmão, após diferentes tratamentos | 161 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{99m}Tc - tecnécio 99m

^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ - complexo do radioisótopo Tecnécio⁹⁹ conjugado com bombesina através do ácido hidrazinonicotínico

A549 - linhagem de células de tumor de pulmão humano do tipo não pequenas

ALK - anaplastic lymphoma kinase/ cinase de linfoma anaplástico

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

APAF1- apoptotic protease activating factor 1/ fator ativador de protease apoptótica

ATCC - American Type Culture Collection

BBN - bombesina

Bcl-2 - proteína apoptótica

Bcl-xL - proteína antiapoptótica

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CO₂ - dióxido de carbono

CPCNP - câncer de pulmão de células não pequenas

CPCP - câncer de pulmão de células pequenas

DACE - derivado semissintético da cucurbitacina B

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDDA - ethylenediaminediacetic acid/ ácido etilendiamino-N,N'-diacético

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid/ ácido etilendiaminotetracético

EGF - epidermal growth factor/ fator de crescimento epidermal

EGFR - epidermal growth factor receptor/ receptor do fator de crescimento epidermal

EPM - erro padrão da média

ERK - extracellular signal-regulated kinase/ cinase regulada por sinal extracelular

EROs - espécies reativas de oxigênio

GGT - gamaglutamiltransferase

GRP - gastrin-releasing peptide/ peptídeo liberador de gastrina

GRPr - gastrin-releasing peptides receptors/ receptores de peptídeos liberadores de gastrina

HIV - Human immunodeficiency virus/vírus da imunodeficiência humana

HPV - Human papiloma virus/ vírus do papiloma humano
HYNIC - hydrazinonicotinic acid/ ácido hidrazinonicotínico
IC - inibição do crescimento
INCA - Instituto Nacional do Câncer
IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares
IV - intravenosa
KeV - unidade de medida de energia/elétron-volt
Kg - quilograma
MAPK - mitogen-activated protein kinases/ proteínas cinases ativadas por mitógenos
MBq - megabecquerel
Mcl-1 - proteína antiapoptótica
MEC - matriz extracelular
MMPs - matrix metalloproteinases/ metalloproteinases de matriz extracelular
MRC5 - linhagem de células não tumorais de pulmão fetal humano
MTRV - massa tumoral residual viável
mTOR - mammalian target of rapamycin/ proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NCI - National Cancer Institute, USA/ Instituto Nacional do Câncer, EUA
NF- κ B - nuclear factor kappa beta/ fator nuclear kappa beta
NSCLC - non-small cell lung cancer/ câncer de pulmão de células não pequenas
PAC - paclitaxel
PBS - phosphate-buffered saline/ solução de tampão fosfato
PET - positron emitted tomography/ tomografia por emissão de pósitron
PI3K - phosphatidylinositol 3-kinase/ fosfatidilinositol 3-cinase
SCLC - small cell lung cancer/ câncer de pulmão de células pequenas
SPECT - single photon emission computed tomography/ tomografia computadorizada por emissão de fóton único
STAT3 - signal transducer and activator of transcription 3/ sinal transdutor e ativador de transcrição 3
TNF - tumor necrosis factor/ fator de necrose tumoral
TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand/ ligante indutor de apoptose relacionada ao TNF
VEGF - vascular endothelial growth factor/ fator de crescimento de endotélio vascular
VRT - volume relativo do tumor

Sumário

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 27 |
| CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 32 |
| 1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO | 32 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 32 |
| 2.1 Câncer | 32 |
| 2.1.1 Considerações gerais | 32 |
| 2.1.2 Carcinogênese | 35 |
| 2.1.3 Epidemiologia | 36 |
| 2.1.4 Câncer de pulmão..... | 38 |
| 2.1.5 Metástase e invasão..... | 40 |
| 2.1.6 Morte celular e alvos terapêuticos..... | 43 |
| 2.1.7 Tratamentos para o câncer de pulmão | 49 |
| 2.1.7.1 Cisplatina | 51 |
| 2.1.7.2 Irinotecano | 51 |
| 2.1.7.3 Paclitaxel..... | 52 |
| 2.1.7.4 Terapias alvo-específicas..... | 52 |
| 2.2 Modelos animais para estudo de tumores de pulmão | 53 |
| 2.3 Imagens cintilográficas com o radiofármaco tecnécio-99m conjugado com bombesina em modelos animais de tumor | 58 |
| 2.4 Cucurbitacinas..... | 62 |
| REFERÊNCIAS | 69 |

| | |
|---|-----|
| 3 OBJETIVOS | 87 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 87 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 87 |
| | |
| CAPÍTULO II – EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS E SINÉRGICOS DE UM DERIVADO SEMISSINTÉTICO DA CUCURBITACINA B COM FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EM CÉLULAS A549 DE TUMOR DE PULMÃO | 90 |
| 1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO | 90 |
| 2. ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO <i>CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY</i> | 91 |
| | |
| CAPÍTULO III – ESTABELECIMENTO DE UM MODELO XENOGRÁFICO DE TUMOR DE PULMÃO HUMANO E SUA DETECÇÃO COM O RADIOISÓTOPO ^{99m}Tc-HYNIC-βALA-BOMBESINA₍₇₋₁₄₎ | 126 |
| 1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO | 126 |
| 2. ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO <i>NUCLEAR MEDICINE COMMUNICATIONS</i> | 127 |
| | |
| CAPÍTULO IV – EFEITO ANITUMORAL DA TERAPIA COMBINADA DO DERIVADO SEMISSINTÉTICO DA CUCURBITACINA B (DACE) COM PACLITAXEL EM MODELO XENOGRÁFICO DE TUMOR DE PULMÃO | 140 |
| 1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO | 140 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 140 |
| 2.1 Material..... | 140 |
| 2.2 Cultivo celular..... | 140 |

| | |
|---|------------|
| 2.3 Animais | 141 |
| 2.4 Implante das células A549 nos camundongos para o desenvolvimento dos tumores | 141 |
| 2.5 Avaliação da atividade antitumoral | 142 |
| 2.6 Imagens cintilográficas do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ nos animais com tumor de pulmão | 143 |
| 2.7 Investigação da toxicidade subcrônica dos tratamentos | 144 |
| 2.7.1 Monitoramento do peso dos animais | 144 |
| 2.7.2 Estudo de marcadores bioquímicos..... | 145 |
| 2.7.3 Avaliação histológica dos órgãos..... | 145 |
| 2.8 Análises estatísticas..... | 145 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 145 |
| 3.1 Avaliação da atividade antitumoral | 145 |
| 3.2 Imagens cintilográficas do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em camundongos Balb/c nudes com tumor xenográfico de pulmão, antes e após os tratamentos | 151 |
| 3.3 Investigação da toxicidade subcrônica dos tratamentos..... | 155 |
| 3.3.1 Monitoramento do peso dos animais | 155 |
| 3.3.2 Avaliação histológica dos tecidos hepático e renal após os diferentes tratamentos..... | 158 |
| 3.3.3 Estudo dos marcadores bioquímicos das funções hepática e renal | 161 |
| DISCUSSÃO GERAL..... | 163 |

| | |
|---|------------|
| CONCLUSÕES | 169 |
| PERSPECTIVAS | 171 |
| REFERÊNCIAS | 172 |
| APÊNDICE I..... | 179 |
| ANEXO A - Comprovante de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais | 180 |

INTRODUÇÃO

O termo câncer representa um conjunto de diferentes alterações patológicas, caracterizadas, principalmente, por proliferação celular acelerada com possibilidade de disseminação das células tumorais para outros órgãos e/ou tecidos (OMS, 2015). Trata-se de uma patologia de problemática mundial, sendo responsável por aproximadamente 13% das mortes anuais em todo o mundo, número esse muito similar ao dos sete milhões de óbitos anuais relacionados com a síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV+/AIDS). Estima-se que, até 2020, serão diagnosticados de 15 a 17 milhões de novos casos de câncer, a cada ano, sendo a maioria em países em processo de desenvolvimento (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2013). O câncer de pulmão é um dos principais tipos de câncer, sendo a causa majoritária de mortalidade por câncer, em homens e mulheres, em nível mundial, com 1,3 milhão de mortes ao ano. Nos Estados Unidos da América, o câncer de pulmão representa 1/3 de todos os óbitos por câncer (LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION, 2015). Os dados para o ano de 2016, válidos também para 2017 no Brasil, estimam, aproximadamente, 17.730 casos novos de câncer de pulmão em homens e 10.890 em mulheres (INCA, 2015).

As estimativas de mortalidade relacionadas ao câncer para os próximos anos são preocupantes e recomendam a necessidade da busca por intervenções preventivas e terapêuticas mais eficientes. Diversos grupos de pesquisa têm buscado e proposto avanços relevantes para auxiliar na pesquisa, desenvolvimento e inovação (P&D&I) de novos fármacos com ação antitumoral, a fim de aperfeiçoar a eficácia e a seletividade dos tratamentos. Tais avanços foram obtidos com a aplicação de modernas técnicas moleculares e a otimização de estratégias de síntese orgânica, fornecendo substâncias farmacologicamente mais ativas e com menor toxicidade para as células não tumorais. Inseridos neste contexto, os produtos naturais constituem fonte abundante e diversificada de compostos com atividades farmacológicas promissoras, incluindo a ação antitumoral. Os compostos obtidos por síntese ou semissíntese orgânica também apresentam a vantagem de serem protótipos para novas moléculas, com melhor perfil terapêutico (KEEP et al., 2011; FOX; MYUNG, 2012).

O Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, sob a coordenação da Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, tem continuamente avaliado os efeitos citotóxicos (frente a linhagens de células saudáveis e tumorais) e a potencial atividade antiviral de produtos naturais e sintéticos. A equipe do Laboratório tem buscado, desde o início das suas atividades, padronizar e implementar metodologias diferenciadas, a fim

de complementar os estudos realizados, aplicando a prática da multidisciplinaridade e permitindo uma formação dinâmica dos recursos humanos envolvidos. Neste contexto, metodologias que permitem avaliar vias de morte celular e elucidar o mecanismo de ação citotóxica envolvendo diferentes células tumorais já foram estabelecidas no Laboratório, tendo em vista a importância de se definir o tipo, as vias de sinalização e o perfil de morte das células tumorais para cada potencial composto inédito estudado.

Esta Tese de Doutorado foi dividida em quatro capítulos. O **Capítulo I** apresenta uma revisão bibliográfica sobre o tema do estudo. No **Capítulo II** estão descritos e discutidos os resultados que permitiram a elucidação do mecanismo de ação sinérgica *in vitro* das combinações da DACE com os três fármacos já citados. Esses dados foram compilados no formato de um artigo já publicado no periódico "Chemical Research In Toxicology". No **Capítulo III** estão apresentados os resultados do estabelecimento de um modelo xenográfico de tumor de pulmão humano em camundongos da linhagem Balb/C nudes e sua detecção com o radioisótopo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ através de imagens cintilográficas. Esses dados também foram compilados e publicados no periódico "Nuclear Medicine Communications". No **Capítulo IV** estão apresentados e discutidos os resultados da avaliação dos efeitos antitumorais da terapia combinada DACE+paclitaxel no modelo animal que foi estabelecido previamente. Os resultados apresentados nos capítulos III e IV foram obtidos durante o estágio sanduíche realizados na Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a supervisão da Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira. Após a apresentação do capítulo IV, todos os resultados obtidos foram discutidos criticamente. A seguir, seguem as conclusões e as perspectivas da tese.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica geral sobre o tema em estudo desta tese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

2.1.1 Considerações gerais

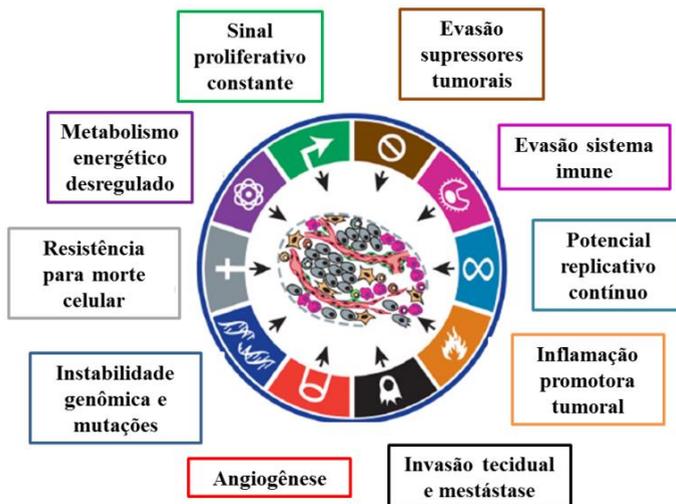
O relato mais antigo e conhecido sobre o câncer, localizado no Egito, há aproximadamente 3.000 anos a.C, foi escrito em um papiro. Este relato constituiu parte de um livro egípcio referente à cirurgia do trauma, que relatava oito casos de tumores de mama, tratados por cauterização na época. A origem da palavra câncer foi descrita primeiramente pelo médico grego Hipócrates, com o significado de “caranguejo”, devido às características similares associadas ao crescimento infiltrativo do câncer e ao modo como esse crustáceo se locomove no solo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

O desenvolvimento e a progressão do câncer envolvem várias etapas, que podem ser desencadeadas, principalmente, por fatores ambientais e/ou genéticos. Células tumorais podem ser geradas a partir de mutação direta, através da ativação de oncogenes, e/ou mediante a inativação de genes supressores de tumores. Tais processos resultam em proliferação celular descontrolada, resistência aos mecanismos de morte celular, e potencial disseminação de células tumorais para outros órgãos e/ou tecidos (OMS, 2015). Portanto, o termo câncer refere-se a um conjunto complexo de alterações fisiopatológicas, em que as células transformadas exibem alterações morfológicas características, tais como tamanho de núcleo aumentado, nucléolos proeminentes, morfologia irregular, cromatina nuclear frouxa e citoplasma escasso. Estas alterações podem ser utilizadas, inclusive, com a finalidade de avaliação e definição do estágio e tipo específico do câncer em questão para seu diagnóstico (AGUS et al., 2013).

Conforme descrito anteriormente, o câncer é um conjunto de alterações complexas no metabolismo celular normal, que se transforma num estado patológico e descontrolado, conforme a progressão da doença. As alterações morfológicas observadas nas células tumorais geralmente estão acompanhadas de outras alterações patológicas celulares. Alterações do ciclo celular, modificações de marcadores de superfície celular, potencial proliferativo contínuo, resistência aos

mecanismos antiproliferativos e/ou de morte celular, evasão do sistema imune e secreção de fatores angiogênicos e metastáticos são alguns exemplos de alterações patológicas das células tumorais, que favorecem o desenvolvimento e a progressão do câncer (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Na Figura 1 estão descritas as principais alterações patológicas das células tumorais.

Figura 1. Principais características das células tumorais.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Os tumores podem ser classificados como benignos ou malignos, ou sofrerem transformação benigna para maligna, conforme a progressão da doença. Tumores benignos geralmente apresentam crescimento lento e são localizados em tecidos ou órgãos específicos, por não apresentarem capacidade metastática. Ao contrário desses, os tumores malignos possuem crescimento rápido e potencial invasivo, disseminando as células tumorais para outros órgãos e/ou tecidos (YAMAGUCHI; WYCKOFF; CONDEELIS, 2005).

A hereditariedade ou predisposição genética constitui fator importante para a evolução do câncer; entretanto, a maioria dos casos

está diretamente relacionada com exposição a fatores ambientais acumulados aos quais os pacientes foram e estão expostos. Estes fatores ambientais são externos ao organismo, como por exemplo, compostos químicos presentes em alimentos e defensivos agrícolas, tabagismo, exposição à radiação, e contato com organismos infecciosos, como os oncovírus. Associados aos fatores ambientais e genéticos, a atuação de hormônios e o status do sistema imune também podem contribuir para a progressão do câncer (ASHKENAZI, 2008; BENSON, LIAU, 2008).

As alterações patológicas celulares e as mutações no DNA ocorrem, no geral, com frequência estimada de uma em cada 20 milhões, por gene e por divisão celular. Desse modo, a população humana, em todo o mundo, deveria apresentar taxas de frequências similares de câncer; entretanto, as taxas de incidência variam bastante. Além disso, pode-se inferir que determinadas populações sejam portadoras de um grande número de genes de susceptibilidade ao câncer e que o ambiente no qual estas populações vivem contribuem para as taxas de incidência dos mesmos. Apesar disso, o fato dos genes estarem distribuídos de forma desigual entre as populações não explica as diferenças nas taxas de incidência de câncer no mundo. Por exemplo, a incidência de câncer de estômago é seis a oito vezes maior entre os japoneses, quando comparado aos norte-americanos. No entanto, filhos de imigrantes japoneses, que se estabeleceram na América do Norte, apresentam taxas de incidência de câncer de estômago comparáveis às da população norte-americana. Assim, o risco de desenvolver este tipo de câncer parece ter um forte componente ambiental, associado com a presença da bactéria *Helicobacter pylori*. Já o uso excessivo de álcool tem sido associado aos cânceres de mama, fígado e boca. O tabagismo aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de cânceres de pulmão, boca e garganta, em homens e mulheres (HEJMADI, 2010; EUA/NCI, 2015). Com relação aos cânceres de nasofaringe, colo do útero, sarcoma de Kaposi e hepático, o aumento do risco está diretamente relacionado com a presença de agentes infecciosos como o vírus Epstein-Barr, o papilomavírus humano (HPV), os vírus herpéticos, e o vírus da hepatite B (HBV), respectivamente (EUA/NCI, 2015).

O diagnóstico do câncer pode ocorrer em qualquer faixa etária; no entanto, é conhecido e comprovado que, em indivíduos idosos, a incidência é maior. Nesta etapa da vida, as alterações do sistema imune associadas ao envelhecimento, o acúmulo de mutações genéticas, uma maior exposição ambiental a agentes carcinogênicos, e alterações hormonais podem ser fatores contribuintes, justificando a maior incidência de câncer nestes indivíduos (HEJMADI, 2010).

2.1.2 Carcinogênese

O termo carcinogênese, que possui o mesmo significado da palavra oncogênese, refere-se ao início do desenvolvimento de um tumor. O tempo necessário para que um conjunto de células tumorais prolifere e constitua um tumor pode ser lento ou rápido, dependendo das características biológicas de cada tipo de tumor (BABA; CÂTOI, 2007). O processo de carcinogênese é dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão. As etapas de iniciação e promoção constituem etapas iniciais, compreendendo processos desde a fixação de um agente carcinógeno no DNA cromossômico de células saudáveis até a transformação e aparecimento de uma massa de células tumorais transformadas. A terceira fase da carcinogênese, denominada de progressão, caracteriza a transformação de um tumor de caráter benigno para um estágio maligno (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A **iniciação** da carcinogênese é estimulada pela atuação de um ou mais agentes cancerígenos no DNA de células saudáveis, induzindo lesões no material genético, que podem ser reparadas ou reproduzidas. Os mecanismos biológicos de reparação podem inibir ou permitir a evolução deste processo, pois a fase de iniciação evolui quando as células são incapazes de reparar as lesões no DNA cromossômico. Portanto, o “início” de uma célula tumoral depende da sua compatibilidade genética e da ativação de diferentes fatores cancerígenos, os quais podem atuar de modo isolado ou associado. Neste processo, os fatores cancerígenos ambientais (vírus oncogênicos, radiação, agentes químicos e outros) promovem um efeito genotóxico irreversível quando os processos de reparação de danos ao DNA são ineficientes. Após a célula ser “iniciada”, começa a apresentar uma alteração irreversível do material genético, com potencial para a proliferação de um clone de células tumorais. A iniciação é um processo rápido, e as células “iniciadas” podem permanecer continuamente neste estado por longos períodos de tempo, sem produzir efeitos adversos passíveis de reconhecimento e destruição pelas células do sistema imune (BABA; CÂTOI, 2007).

O segundo estágio da carcinogênese, conhecido como estágio de **promoção**, constitui a etapa na qual ocorrem alterações genéticas crônicas das células “iniciadas”, sendo que estas alterações promovem a transformação neoplásica e o aparecimento de células tumorais com capacidade de crescimento autônomo. A promoção de um tumor está diretamente associada a fatores epigenéticos que alteram, direta ou

indiretamente, a expressão do DNA genômico (BABA; CÂTOI, 2007; TAYLOR; LADANYI, 2011).

A fase de **progressão** caracteriza o estágio final do processo de carcinogênese, quando ocorre a proliferação descontrolada e irreversível das células alteradas geneticamente. Neste estágio, o câncer já está desenvolvido num dado órgão e/ou tecido, e continua evoluindo até a observação das primeiras manifestações clínicas da doença (INCA, 2015). Na fase de progressão, as células tumorais apresentam rearranjos genéticos e alterações de cariótipo. Nesta fase, o tumor é fenotipicamente caracterizado pela proliferação celular acelerada e constante, alterações bioquímicas e morfológicas que favorecem as características tumorais já descritas na Figura 1, contribuindo diretamente para a progressão do câncer com o agravamento da doença (BABA; CÂTOI, 2007).

2.1.3 Epidemiologia

O câncer é um problema de saúde global, tanto de países desenvolvidos como de países em desenvolvimento, sendo responsável por aproximadamente 13% dos óbitos totais no mundo, número esse semelhante ao dos sete milhões de mortes anuais provocadas pela infecção pelo HIV/AIDS (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2013). Recentemente, a incidência de câncer na população aumentou significativamente. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, até 2030, aproximadamente 27 milhões de novos diagnósticos de câncer, sendo que a incidência de câncer no mundo teve aumento de 20% na última década. Além disso, o número global de mortes por câncer aumentará em torno de 45% no período compreendido de 2007 a 2030, caso medidas preventivas não sejam amplamente aplicadas. Outros dados importantes indicam que foram relatadas 8,2 milhões de mortes por câncer em 2012, sendo que 60% dessas mortes ocorreram na África, Ásia, Américas do Sul e Central, e 30% desses casos poderiam ter sido evitados (OMS, 2015). Portanto, quando analisados em conjunto, estes dados são extremamente preocupantes e reforçam a necessidade de melhorias de medidas preventivas e busca por agentes terapêuticos mais efetivos.

No Brasil, as estimativas para os anos de 2016 e 2017, indicam o diagnóstico de aproximadamente 1,2 milhões de novos casos de câncer em todo o país. Conforme ilustrado na Figura 2, os tumores mais comuns na população brasileira do sexo masculino, exceto os tumores do tipo pele não melanoma, são: próstata (61,8%); traqueia, brônquios e

pulmão (17,4%); cólon e reto (16,8%); e estômago (13%). Para a população brasileira do sexo feminino, os tumores com diagnóstico mais frequente são: mama (56,2%); cólon e reto (17,1%); colo do útero (15,8%); e traqueia, brônquio e pulmão (10,5%) (BRASIL/INCA, 2015).

Figura 2. Distribuição dos tipos de câncer, de acordo com o sexo: estimativas para 2016 e 2017 no Brasil.



Fonte: Adaptado de INCA (2015).

Em relação ao câncer de pulmão, no Brasil e para os anos de 2016 e válidos também para 2017, estima-se, aproximadamente, o diagnóstico de 17.730 novos casos de câncer de pulmão em homens e 10.890 em mulheres. Com exceção dos tumores de pele do tipo não melanoma, o câncer de pulmão nos homens aparece como o segundo mais frequente nas regiões Sul e Centro-Oeste. Nas regiões Sudeste, Nordeste e Norte, é o terceiro tipo de tumor mais incidente. Para as mulheres, é o terceiro mais frequente na região Sul, enquanto que nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste é o quarto tipo mais incidente. Já na região Norte, é o quinto tipo de tumor mais frequente em pacientes do sexo feminino (BRASIL/INCA, 2015). No entanto, é necessário ressaltar que muitos casos são subnotificados e/ou classificados como de causas mal conhecidas.

Em relação a outros países, como os Estados Unidos da América (EUA), os números são ainda mais preocupantes. Para 2015, foram

estimados 221.200 novos casos e 158.040 mortes por câncer de pulmão, sendo que mais de 1/4 de todas as mortes por câncer nos EUA são por câncer de pulmão (27%) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Além disso, entre as mulheres, o câncer de pulmão é responsável por quase 1/3 de todas as mortes por câncer nos EUA, com taxa superior a dos cânceres de mama e os ginecológicos somados (LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION, 2015).

2.1.4 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão foi considerado uma doença de incidência rara até o início do século XX. Desde então, sua ocorrência aumentou de forma rápida e progressiva, e esta neoplasia tornou-se a mais frequente na população mundial. O câncer de pulmão é classificado em dois grupos, conforme as características histopatológicas das células tumorais: câncer de pulmão de células pequenas (CPCP; SCLC, *small cell lung cancer*) e câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP; NSCLC, *non-small cell lung cancer*) (BRASIL/INCA, 2015).

O CPCNP é o mais frequente, sendo responsável por aproximadamente 85% dos casos de câncer de pulmão diagnosticados. Ele, geralmente, acomete as grandes vias aéreas, tais como os brônquios primários e/ou secundários, estando fortemente correlacionado com o tabagismo (KRANS, 2014). Quando comparados aos não fumantes, os tabagistas têm propensão de 20 a 30 vezes maior para desenvolver câncer de pulmão (BRASIL/INCA, 2015).

Os tipos mais comuns de CPCNP são o carcinoma de células escamoso (30%), geralmente detectado nos brônquios; o carcinoma de grandes células (10-20%), que pode acometer qualquer segmento do pulmão; e os adenocarcinomas (30-35%), que geralmente se desenvolvem nas bordas dos pulmões, mas também podem ocorrer nas células das vias respiratórias. Embora existam outros subtipos de CPCNP, em conjunto, esses três subtipos representam 80% dos casos de CPCNP diagnosticados (LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION, 2015). Apesar de o CPCP ser o tipo menos frequente (15% dos casos), seu prognóstico geralmente é mais preocupante, pois normalmente causa metástases (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

A maioria dos casos de câncer de pulmão está diretamente relacionada com o tabagismo. A exposição a outros agentes carcinogênicos, como inseticidas, hidrocarbonetos policíclicos, asbesto, arsênio, gás radônio, óxido de nitrogênio e fatores como sedentarismo,

histórico familiar e hábitos alimentares também contribuem para o desenvolvimento do câncer de pulmão. De modo geral, o câncer de pulmão apresenta uma razão de mortalidade/incidência superior a 80% porque a maioria dos casos é diagnosticada tardiamente quando já apresenta metástases, o que dificulta o tratamento e reduz significativamente o tempo de sobrevivência dos pacientes (HAN; ROMAN, 2010). É comprovado que alterações genéticas e epigenéticas, após a exposição aos carcinógenos, causam a ativação de vias oncogênicas e inativação dos genes supressores de tumor e que, após seu aparecimento, o tumor é sustentado por estímulos de crescimento resultantes da expressão diferencial de fatores de crescimento e peptídeos regulatórios provenientes do próprio tecido tumoral e das células adjacentes (AYOOLA et al., 2012). A progressão do CPCNP é estimulada por mutações genéticas, as quais são predominantemente causadas pela exposição a agentes cancerígenos. Assim, tumores de pacientes fumantes apresentam cerca de 10 mutações por megabase de DNA enquanto que os tumores de pessoas que nunca foram tabagistas possuem 10 X menos mutações. As mutações mais relevantes são as detectadas no receptor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor* - EGFR) e na cinase de linfoma anaplásico (*Anaplastic Lymphoma Kinase* - ALK). As células tumorais podem também desenvolver mutações independentes, o que caracteriza a heterogeneidade intra e intertumoral. Além disso, os tumores se adaptam ao ambiente produzindo fatores de crescimento para facilitar a evasão do sistema imune (GRIDELLI et al., 2015).

No início da progressão da doença, os pacientes geralmente são assintomáticos ou até mesmo apresentam sintomas amenos, que podem ser confundidos com outras patologias do sistema respiratório, sendo este outro fator que contribui para o diagnóstico tardio desta neoplasia (HAN; ROMAN, 2010). O surgimento de metástases ocorre muito precocemente no câncer de pulmão, motivo pelo qual é tão letal e complicado para tratar. Os locais mais acometidos por metástase do câncer de pulmão incluem as glândulas suprarrenais, fígado, encéfalo e ossos. Os pulmões também são alvos importantes onde comumente outros tumores metastáticos podem crescer, já que é um órgão bastante vascularizado, o que facilita a disseminação de metástases pulmonares (VAPORCIYAN et al., 2000; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Em função destas características, o câncer de pulmão permanece caracterizado como uma doença altamente letal, com razão mortalidade/incidência (M/I) de aproximadamente 86%, como já citado

anteriormente. A taxa de sobrevivência média cumulativa total em cinco anos varia entre 13 e 21% nos países desenvolvidos, e entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento. O consumo regular de vegetais e frutas tem demonstrado efeito protetor e de prevenção do câncer de pulmão, principalmente porque esses alimentos contêm carotenoides (pigmentos vermelhos e amarelos), que apresentam propriedades antioxidantes. No entanto, o controle do consumo de tabaco e seus derivados permanecem como a principal iniciativa para prevenir e reduzir a incidência deste tipo de tumor (BRASIL/INCA, 2015).

2.1.5 Metástase e invasão

A capacidade das células tumorais migrarem para outros órgãos e/ou tecidos a partir da localização anatômica de origem é denominada de **metástase** e, portanto, uma característica de tumores malignos. As células que atuam no processo de metástase são descritas como células metastáticas e demonstram peculiaridades morfológicas quando comparadas aos tumores primários; porém, nem todas as células dos tumores primários possuem potencial metastático. Para efetivamente desenvolver metástases e disseminar as células tumorais pelo organismo através da circulação sanguínea e/ou linfática, as células tumorais primárias precisam modular a expressão de proteínas que favorecem eventos celulares como a migração e invasão teciduais (FRIEDL et al., 2012).

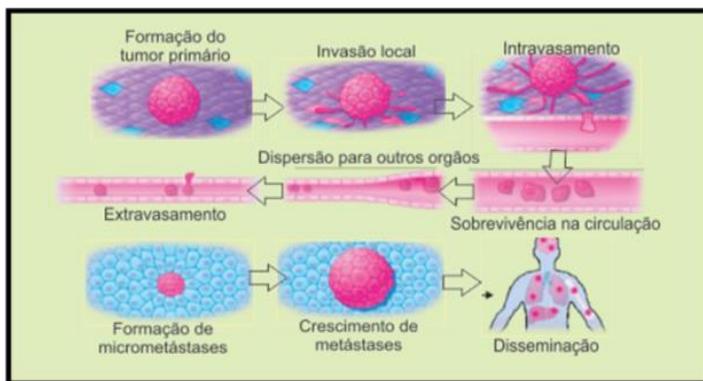
A disseminação das células tumorais no processo de metástase não é um processo aleatório, mas sim dependente de microambientes que sejam compatíveis para o seu crescimento, o que favorece o processo descrito como padrão de colonização metastática. O câncer de próstata, por exemplo, demonstra maior potencialidade em gerar metástases ósseas, enquanto que os sarcomas apresentam focos de metástases principalmente nos pulmões. Estes são exemplos de padrão de colonização metastática. Portanto, cada tipo de tumor tem um comportamento específico para o desenvolvimento de metástases, sendo que a formação de metástases geralmente ocorre em estágios mais avançados e com pior prognóstico do câncer. Os pulmões foram descritos com sendo um dos principais órgãos alvo para metástases. A presença de metástases no parênquima pulmonar e oriundas de câncer extratorácico é responsável por aproximadamente de 20 a 54% dos óbitos. Análises histopatológicas de autópsias demonstraram que os tumores de mama, cólon, rim, útero, melanoma, tireoide, sarcoma ósseo,

ovário e testículo são os sítios primários mais comuns para as metástases pulmonares (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006).

Uma provável explicação para a elevada prevalência de metástases pulmonares se deve ao fato de que o sangue circula através do coração e posteriormente pela totalidade da rede capilar pulmonar. As lesões pulmonares metastáticas iniciam o desenvolvimento nas pequenas arteríolas pulmonares, e disseminam através das junções oclusivas do endotélio dos vasos sanguíneos pulmonares e da membrana basal subjacente. Quando instaladas no parênquima pulmonar, as células tumorais metastáticas podem sobreviver e proliferar neste microambiente complexo e dinâmico, que apresenta matriz extracelular organizada com células especializadas para a respiração, fatores essenciais que possibilitam suporte para a evolução das metástases pulmonares (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006).

O processo de metástase é descrito como um conjunto de eventos sequenciais e interligados de modo complexo e dinâmico (GEIGER; PEEPER, 2009). As etapas da cascata metastática são: (1) proliferação contínua das células tumorais; (2) perda da adesão célula-célula; (3) aquisição de capacidade invasiva; (4) início da migração da massa tumoral primária; (5) rompimento da membrana vascular basal; (6) intravasamento nos vasos sanguíneos adjacentes; (7) sobrevivência no sistema circulatório e evasão do sistema imune; (9) extravasamento no local alvo de metástase e (10) invasão no tecido local, para constituir um novo tumor e reiniciar o ciclo (Figura 3).

Figura 3. Etapas do processo de metástase.



Fonte: Adaptado de Robert (2013).

Quando um tumor primário prolifera e apresenta crescimento contínuo torna-se necessário também um aporte sanguíneo maior para manter suas necessidades metabólicas, sendo este processo descrito como angiogênese. Os novos vasos sanguíneos também atuam como rota de fuga para as células tumorais, pelo qual as células deixam o tumor e entram no sistema circulatório, processo descrito como intravasamento. As células tumorais podem também invadir o sistema circulatório indiretamente, via sistema linfático, e alcançar os linfonodos, onde também podem proliferar e disseminar metástases (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002). Outro fator importante e complexo é a relação entre a vascularização e a colonização metastática. O processo de angiogênese, estimulado por condições de hipóxia nos tumores, é regulado pela atuação balanceada de fatores angiogênicos e antiangiogênicos. Um dos fatores angiogênicos mais estudado e caracterizado é o VEGF, (*Vascular Endothelial Growth Factor*), que estimula a proliferação, migração e a organização de células endoteliais para gerar novos vasos capilares. Em adição ao seu papel na angiogênese, o VEGF regula também a permeabilidade vascular, a proliferação de células tumorais e a formação de um nicho metastático adequado para o tumor (STEEG; THEODORESCU, 2008). Após alcançar o sistema circulatório, as células tumorais precisam permanecer viáveis na circulação até o momento em que possam atingir um novo alvo, ocorrendo assim o extravasamento destas a partir da circulação para o tecido alvo. Após o extravasamento, as células retomam a proliferação, desenvolvendo micrometástases pré-angiogênicas, sendo este crescimento favorecido pela angiogênese para que um tumor macroscópico seja formado (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002).

Para a organização do microambiente tumoral, a etapa inicial envolvida é a remodelação da matriz extracelular (MEC), para favorecer a invasão tecidual. Este evento é considerado essencial na formação desta rede dinâmica, que suporta a iniciação e proliferação do tumor no novo local (WEBER; KUO, 2012). A estrutura da MEC é remodelada por enzimas denominadas metaloproteinases (MMPs), que são enzimas cuja atividade possibilita hidrolisar macromoléculas da MEC e favorecer o extravasamento das células tumorais, sendo essenciais para o processo de metástase (OVERALL; KLEIFELD, 2006). Estas moléculas não permitem apenas a entrada e passagem de células tumorais para outros tecidos, como também favorecem a migração de células endoteliais para a MEC, o que resulta em neovascularização e contribuição para a evolução da massa tumoral (WEBER; KUO, 2012). No processo de

metástase, as células tumorais invadem o tecido alvo através da invasão com células individuais, grupos compactos de células ou mesmo através de filamentos alongados conectando as células tumorais para os tecidos saudáveis (FRIEDL et al., 2012).

Em 2012, um estudo inédito descreveu pela primeira vez a relação direta dos exossomos derivados de tumores com a progressão tumoral e metástase. Neste estudo, exossomos derivados de células de melanoma estimularam o potencial metastático de tumores primários por direcionar, de modo permanente, progenitores da medula óssea com a função de suporte para o crescimento tumoral e metástase, devido a reprogramação destes progenitores para um fenótipo pró-angiogênico (PEINADO et al., 2012). Recentemente, também foi demonstrado o envolvimento de exossomos na comunicação intercelular e sinalização para a formação de nichos pré-metastáticos em experimentos com células de tumor pancreático. Neste estudo, os exossomos derivados de células de adenocarcinoma ductal de pâncreas induziram ao desenvolvimento de nichos pré-metastáticos no fígado por inibir a migração de macrófagos (COSTA-SILVA et al., 2015).

2.1.6 Morte celular e alvos terapêuticos

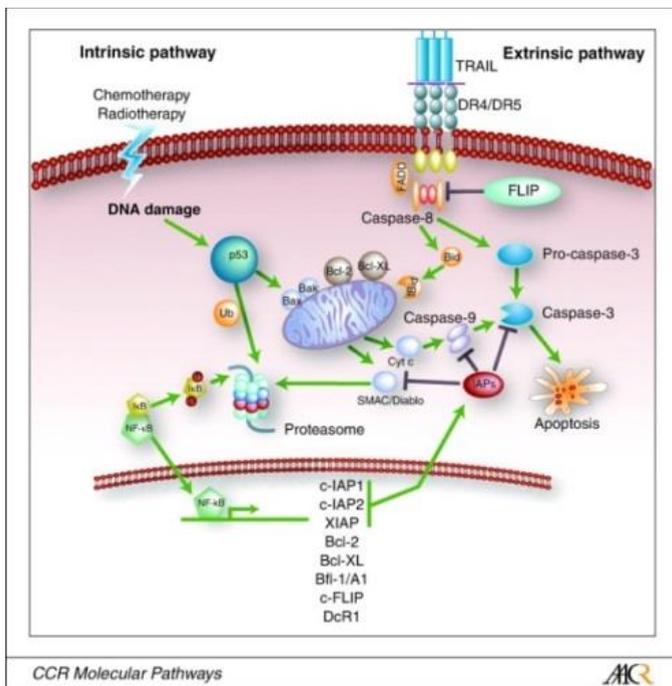
As células monitoram constantemente sua homeostase, o que inclui o balanço da modulação das vias de proliferação e morte celular. Caso este monitoramento detecte danos ou desequilíbrio, sistemas celulares são ativados para determinar se a proliferação celular deve parar e reparar as vias envolvidas ou, até mesmo, se o dano para as células for grave, elas poderão ativar as vias de indução de morte celular. Portanto, a homeostase celular é o equilíbrio entre a divisão e a morte celular, sendo que o número de células em um tecido saudável permanece constante. Caso este equilíbrio seja alterado, as células podem sofrer divisão e proliferação mais aceleradas que a taxa de morte celular, o que favorece o desenvolvimento e a progressão do câncer (HEJMADI, 2010).

De modo geral, os mecanismos de morte celular são controlados por famílias de proteínas, que podem ser específicas ou compartilhadas por diferentes vias. Dentre os diferentes tipos de morte, apoptose e autofagia são muito importantes no controle de diversos tipos de câncer, especialmente do câncer de pulmão (SHIVAPURKAR et al., 2003; JABOIN; HWANG; LU, 2009).

O termo **apoptose** (do grego: *apo* - separação e *ptosis* - queda) inicialmente foi utilizado para descrever a queda das folhas das árvores

no outono, sendo um tipo de morte programada (INDRAN et al., 2011). A morte celular por apoptose é um evento presente em vários processos fisiológicos, incluindo a renovação de células saudáveis, organogênese, atuação do sistema imunológico e no desenvolvimento embrionário (HEJMADI, 2010). A apoptose inicia quando a célula percebe algum sinal pró-apoptótico, sofrendo compactação e segregação da cromatina, condensação do citoplasma e encolhimento celular, fragmentação do núcleo, fragmentação celular (*blebbing* da membrana) e, finalmente, divisão em corpos apoptóticos, sendo estes reconhecidos e fagocitados pelos macrófagos. Tais efeitos são descritos como alterações morfológicas das células apoptóticas. A sinalização das células para a fagocitose se dá pela translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana plasmática celular, indicando as células a serem fagocitadas (INDRAN et al., 2011). O processo apoptótico pode atuar por duas vias: intrínseca ou extrínseca (Figura 4).

Figura 4. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.



Fonte: Adaptado de De Vries; Gietema; De Jong (2006).

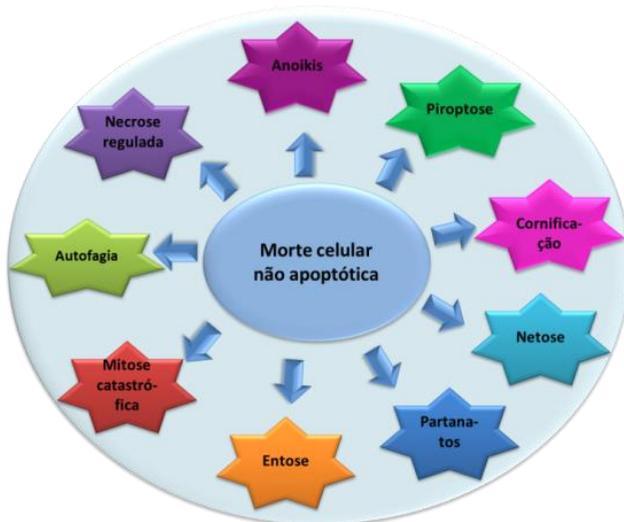
Na via extrínseca, moléculas sinalizadoras de morte, como FasL (ligante de Fas), TNF (fator de necrose tumoral) e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) se ligam aos receptores de morte, na membrana celular, causando a clivagem e ativação da proteína caspase-8, que ativa a clivagem da caspase-3, que é efetora da morte celular por apoptose (ZIEGLER; KUNG; KIERAN, 2008). Na via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, ocorre ativação de fatores independentes da ligação aos receptores, tais como falta de nutrientes, hipóxia, danos ao DNA, ativação de oncogenes, radiação ultravioleta, elevação de cálcio intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A via intrínseca é regulada pela família de proteínas Bcl-2, cujos membros apresentam na sua estrutura um ou múltiplos domínios homólogos de Bcl-2 (domínio BH3). Neste processo, a membrana externa da mitocôndria é permeabilizada, extravasando citocromo *c* e outras proteínas pró-apoptóticas para o citosol, promovendo a formação do apoptosoma. O apoptosoma é um complexo proteico que contém além do citocromo *c*, também o fator ativador de protease apoptótica (APAF1) e a caspase-9, que quando clivada ativa a caspase-3 efetora, destruindo as estruturas subcelulares, organelas e genoma, conforme ilustrado na Figura 4 (BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005).

Recentemente, foi descrito que a apoptose não é o único mecanismo de morte celular programada e implicada na eliminação de células malignas. Além dessa via, nove processos distintos foram relatados por atuarem na eliminação de células aberrantes no organismo humano. De acordo com a dependência da ativação de caspases, eles podem ainda ser divididos em dois subgrupos (Figura 5) (ORLIKOVA; DICATO; DIEDERICH, 2013).

O termo **autofagia** (do grego *auto-* próprio e *fagia* - alimentação) é um processo dinâmico, que envolve a degradação e a reciclagem de organelas citoplasmáticas e de proteínas (KATSUYA; SATOSHI; HIROYASU, 2009). O mecanismo tem início quando um sinal indutor de autofagia, chamado pró-autofágico, é reconhecido pela célula. Fármacos antitumorais, toxinas, hipóxia ou deficiência de nutrientes são alguns fatores que induzem sinais pró-autofágicos. Assim, a autofagia está envolvida tanto em processos fisiológicos como patológicos, tais como manutenção da homeostase do organismo, desenvolvimento de órgãos e tecidos, diferenciação celular, neurodegeneração, infecção e câncer. No processo de autofagia, pode ocorrer uma intensa vacuolização citoplasmática com aumento do fluxo autofágico caracterizando a “morte celular autofágica” (ZHOU et al., 2012). Três

tipos de autofagia foram descritas: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Durante a ativação da via autofágica, ocorre o desenvolvimento de uma estrutura inicial, chamada de fagóforo, através do alongamento da vesícula autofágica. Após a formação do fagóforo, ocorre a formação de complexos proteicos que promovem o englobamento final dos componentes celulares, formando vesículas chamadas de autofagossomos. Na sequência, ocorre a fusão, na qual os autofagossomos se fundem com os lisossomos formando as estruturas funcionais da autofagia, os autofagolisossomos, também chamado de autolisossomas. No interior dos autolisossomas, o ambiente ácido e as enzimas lisossomais promovem a degradação e a digestão dos componentes celulares (LORIN et al., 2013). Conseqüentemente, a modulação da autofagia vem sendo descrita como um alvo terapêutico promissor para o tratamento de diversos tipos de tumor. Vários fármacos, tais como tamoxifeno, trióxido de arsênio, rapamicina, lítio e carbamazepina já demonstraram efeitos indutores de autofagia em células tumorais. Como exemplo, pode-se citar o inibidor de mTOR, rapamicina, que foi associado com a redução de 90% de tumores de pulmão induzidos por agentes carcinogênicos, em modelos murinos (YANG et al., 2011).

Figura 5. Tipos de morte celular programada não apoptótica.



Fonte: Adaptado de Orlikova; Dicato; Diederich (2013).

É importante ressaltar que os dois tipos de morte descritos são modulados de forma interligada, através de diferentes vias de sinalização. Uma destas vias é a PI3K/Akt/mTOR, considerada um importante alvo terapêutico no câncer, que pode estar envolvida tanto nos processos de apoptose como de autofagia (SU; MEI; SINHA, 2013). Outras vias de sinalização envolvidas nestes dois processos foram descritas recentemente, sugerindo uma relação altamente regulada entre autofagia e via apoptótica extrínseca. Como exemplo, pode-se citar a proteína marcadora de carga autofágica p62/SQSTM 1, que liga-se a caspase-8 e permite sua ativação, aumentando a apoptose mediada por TRAIL. Outro exemplo é a proteína beclina-2, pertencente a uma família de proteínas antiapoptóticas, superexpressas em muitos tipos de tumores, e que contribuem para a resistência aos tratamentos quimioterápicos. As proteínas da família Bcl-2, que inibem a apoptose, também inibem autofagia. O mecanismo deste efeito dualístico reflete o fato de que as proteínas Bcl-2/Bcl-xL podem ligar-se e interromper a função da proteína autofágica beclina (YANG, et al., 2011). Neste contexto, a autofagia pode funcionar como um modo alternativo de morte em células resistentes à apoptose, conforme já descrito para tumores resistentes a determinados protocolos de tratamento com fármacos indutores de morte celular via apoptose (SU; MEI; SINHA, 2013).

Vias de sinalização celular relevantes para diversos fatores, tal como a proliferação celular, são conhecidas por funcionarem de forma errônea em células tumorais e incluem as vias do NF- κ B, Akt, MAPK e p53, dentre outras. É importante ressaltar que a sinalização celular é uma rede complexa com circuitos de realimentação negativos ou positivos, também regulados por mecanismos compensatórios. Geralmente, nas células tumorais, a desregulação de múltiplas vias de sinalização ocorre simultaneamente (SARKAR et al., 2009).

Uma destas vias de sinalização é a via da PI3K (*fosfoinositol-3-cinase*), relacionada com a regulação do crescimento, proliferação e sobrevivência das células. Esta via é ativada via *downstream* (receptores abaixo da via) por diferentes fatores de crescimento, por ligação direta com esses receptores, ou pela ativação da via de sinalização da Ras. A via da PI3K ainda pode favorecer a sobrevivência celular, através da ativação da Akt, uma cinase abaixo da sua via. A Akt, por sua vez fosforila e ativa um grande número de alvos, incluindo a família anti apoptótica Bcl2, além de regular a expressão de diversos genes (ARYA; WHITE, 2015). A via da Akt desempenha um papel crítico na sinalização de sobrevivência das células de mamíferos, e encontra-se

comumente desregulada em vários tipos de câncer. A Akt é ativada através da ligação de um fosfolípido e fosforilação em Thr308 pelo PDK1, ou em Ser473 pelo PDK2. As funções da via da Akt ativada incluem a promoção da sobrevivência celular por inibição da apoptose, através da inativação de diversos fatores pró-apoptóticos, incluindo Bad, fatores de transcrição *Forkhead*, e caspase-9, além de estimular a angiogênese. A ativação desregulada dessa via também pode estimular a invasão e metástase de células tumorais (HSIEH et al., 2012). Além disso, foi descrito que a Akt ativada (p-Akt-2) tem sido encontrada em 43 a 90% dos casos de câncer de CPCNP e, diante deste dado, acredita-se que a via da Akt seja um alvo atraente para a prevenção e/ou tratamento do câncer de pulmão do tipo CPCNP (SARKAR et al., 2009; HEAVEY; O'BYRNE; GATELY, 2014).

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) constituem uma superfamília de proteínas do tipo serina/treonina, ativadas por estímulos como fatores de crescimento, como EGF (*Epidermal Growth Factor*) (JOHNSON; DOHLMAN; GRAVES, 2005). Entre os grupos caracterizados como MAPKs, destacam-se: a cinase regulada extracelularmente (ERK), proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), também conhecida como cinase Jun N-terminal (JNK) e a via p38. A ativação dos receptores ErbB por fatores de crescimento também desencadeia a ativação da via de sinalização JAK/STAT. A Janus cinase (JAK) é uma família de proteínas tirosina cinase, que fosforilam STATs (sinais transdutores e ativadores de transcrição), localizados na membrana plasmática das células tumorais. Após serem fosforilados, os STATs são translocados para o núcleo onde ativam a transcrição gênica. A ativação por fatores de crescimento (EGF) de uma tirosina cinase intracelular (Src) também induz a fosforilação de STATs e, conseqüentemente, sua atividade transcricional. Sob ação do EGF, o receptor ErbB1 é translocado ao núcleo em algumas células tumorais, onde liga-se ao DNA contribuindo para a ativação transcricional de genes (GARCIA et al., 2001; LIN et al. 2001). Entre os genes ativados por esta via destacam-se aqueles que codificam a expressão de proteínas anti-apoptóticas, tais como Mcl-1 e BCL-xL, e os reguladores do ciclo celular ciclina D1 e c-Myc, desempenhando um papel importante na proliferação e sobrevivência de células tumorais, migração celular, transformação oncogênica, evasão do sistema imune e favorecimento do desenvolvimento de nicho metastático (YU et al., 2014).

Em razão destas vias de sinalização normalmente atuarem de modo desregulado nos mais variados tipos de câncer, elas são consideradas um alvo molecular promissor na prevenção e na terapia de tumores, onde

tais proteínas encontram-se superexpressas. Inibidores diretos de dois intermediários de uma mesma via ou de duas vias de sinalização diferentes podem representar uma abordagem terapêutica bastante efetiva em termos terapêuticos (MCCUBREY et al., 2012).

Os principais mecanismos de reparo controlam a diferenciação celular, o reparo de dano ao DNA, a regulação do ciclo celular e a inibição da proliferação celular por indução de morte celular, predominantemente, por apoptose, necrose, autofagia, senescência ou quiescência (HEJMADI, 2010). Os principais mecanismos de morte celular apresentam características similares, e em 2012, o Comitê Norte-Americano de Nomenclatura em Morte Celular propôs um conjunto de informações para classificar os tipos de morte celular. Os tipos de morte celular podem ser classificados através de definições e metodologias moleculares. A partir desta classificação de 2012, que se aplica tanto *in vivo* quanto *in vitro*, os tipos de morte celular podem ser estudados por uma série de características bioquímicas específicas, que podem ser quantificadas. Os principais tipos de morte celular descritos foram: apoptose intrínseca dependente e independente de caspases, apoptose extrínseca por receptores de morte ou dependente de receptores, cornificação, entose, autofagia, mitose catastrófica, necroptose, senescência, partanatos, anoikis, piroptose e netose (Figura 5) (GALLUZZI, et al., 2015).

2.1.7 Tratamentos para o câncer de pulmão

O tratamento do câncer depende de vários fatores, tais como o tamanho do tumor, idade do paciente, localização do tumor e o tipo de células tumorais presentes. Para cada tipo e classificação de câncer existem abordagens terapêuticas específicas, sendo estas abordagens: a excisão cirúrgica para remoção de tumores, que é eficaz caso o paciente não apresente metástases; a radioterapia; e a quimioterapia. Também podem ser aplicadas as terapias adjuvantes, tais como a imunoterapia e a fototerapia dinâmica. Todas estas abordagens terapêuticas evoluíram significativamente nas últimas décadas devido à melhor compreensão da biologia da transformação maligna e dos mecanismos regulatórios da proliferação tanto de células normais como tumorais (BORGHAEIA; SMITHA; CAMPBELL, 2009; DE ALMEIDA et al., 2005). Quando o câncer é detectado em estágio inicial e sem metástases, pode ser tratado com sucesso apenas com remoção cirúrgica e/ou radioterapia. Entretanto, quando detectado em estágios mais avançados, inclusive com quadros de metástase, a cirurgia e radioterapia combinadas

geralmente não são efetivas. Assim, é necessário um tratamento sistêmico, como a quimioterapia, que se baseia na aplicação de medicamentos específicos, por via intravenosa e/ou via oral (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002).

Os quimioterápicos disponíveis para o tratamento dos diferentes tipos de câncer são classificados conforme seu mecanismo de ação. A maioria destes fármacos atua reduzindo a atividade proliferativa das células tumorais, modulando mais especificamente o ciclo celular (fármacos ciclo-celular específicos), enquanto que outros fármacos são indutores da morte de células que não estejam em estado de proliferação, sendo descritos como fármacos ciclo-celular não específicos (DE ALMEIDA et al., 2005).

Atualmente, o tratamento do câncer de pulmão é considerado de baixa eficácia, porque a maioria dos casos é diagnosticada em fase avançada, sendo que apenas 25 a 30 % de todos os casos de câncer inicial de pulmão podem ser curados por remoção cirúrgica. O protocolo de tratamento do câncer de pulmão do tipo CPCNP, preconizado pelo INCA no Brasil, é administrado conforme o estágio da doença. No entanto, a quimioterapia disponível apenas melhora e aumenta a sobrevida dos pacientes. Conforme preconizado e dependendo do estágio, radioterapia e quimioterapia são aplicadas concomitantemente. Os quimioterápicos mais utilizados são a cisplatina e o etoposídeo, administrados concomitantemente e por via intravenosa. Na quimioterapia neoadjuvante à cirurgia são aplicados mitomicina, ifosfamida, vimblastina e cisplatina por via intravenosa. Para a quimioterapia paliativa, é indicado o tratamento com carboplatina e etoposídeo (INCA, 2015).

Para tratamento do câncer de pulmão, especificamente para o subtipo CPCNP, considerado uma doença heterogênea, o tratamento deve ser adaptado para o estágio e as características do tumor. Além da retirada cirúrgica e da radioquimioterapia, podem ser administrados fármacos direcionados para mutações específicas. Fármacos inibidores dos receptores de tirosina cinase, tais como o do EGFR e do ALK, e fármacos inibidores da formação de EROs já estão disponíveis. Como todos os tumores, eventualmente, podem desenvolver resistência, fármacos inibidores de segunda e terceira linhas foram desenvolvidos ou se encontram em fase de desenvolvimento. Esses fármacos são ativos contra as proteínas resistentes ou mesmo dirigidos especificamente para as mesmas. Outras estratégias terapêuticas incluem a inibição da sinalização mediada por VEGF e a imunoterapia (GRIDELLI et al., 2015).

Abaixo, seguem algumas informações sobre os três fármacos que foram aqui testados em associação com o derivado semissintético da cucurbitacina B, a DACE, objeto de estudo desta Tese.

2.1.7.1 Cisplatina

As propriedades antitumorais da cisplatina foram descritas inicialmente em 1960, através de um estudo que demonstrou que os compostos de platina induziam bloqueio da divisão celular durante o crescimento do microrganismo *Escherichia coli* (ROSENBERG; VAN CAMP; KRIGAS, 1965). A aplicação da cisplatina como opção terapêutica na clínica ocorreu na década de 70. Atualmente, a cisplatina é efetiva para o tratamento dos tumores de testículo, ovário, bexiga, esôfago, pulmão e cabeça. Apresenta boa efetividade, mas pode desencadear efeitos tóxicos nos pacientes, tais como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, náusea e vômitos. Infelizmente, estes fatores limitam a dose aplicada e a efetividade do tratamento (CEPEDA et al., 2007). Assim como os demais compostos platinados, a cisplatina exerce seu mecanismo de ação por se ligar covalentemente ao DNA celular, inibindo os processos de transcrição e replicação celular, e induzindo a morte celular por apoptose. Este mecanismo permite, dentre as diferentes classes de quimioterápicos, classificar a cisplatina como agente alquilante de DNA (FLOREA; BÜSSELBERG, 2011). Para o tratamento do tumor de pulmão do tipo CPCNP geralmente são aplicados dois agentes quimioterápicos em combinação e em alguns casos até três agentes, como por exemplo, cisplatina combinada com carboplatina + irinotecano, ou paclitaxel, ou etoposídeo, ou docetaxel, ou vinorelbina ou gemcitabina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Portanto, a cisplatina é administrada na maioria dos protocolos de tratamento do CPCNP, desde 1970 (JOHNSON; SCHILLER, 2014).

2.1.7.2 Irinotecano

Os agentes inibidores da topoisomerase I, topotecano e irinotecano, surgiram ainda na década de 1960 como promissores agentes antitumorais (WALL et al., 1966). O irinotecano foi aprovado, inicialmente, como tratamento de primeira linha para o câncer colorretal em associação com o 5-fluorouracil (CHEN; CHEN; CHEN, 2012). Tanto o topotecano como irinotecano são derivados semissintéticos da camptotecina, que inibem a topoisomerase I. As topoisomerasas são enzimas que auxiliam na manutenção da conformação tridimensional da estrutura do DNA, através da remoção de espirais durante a transcrição e

replicação do DNA. Quando as topoisomerases são inibidas, ocorre dano à estrutura do DNA de cadeia dupla produzido na fase S (síntese), e esse dano induz morte celular por apoptose (GARCIA-CARBONERO; SUPKO, 2002). Atualmente, o irinotecano é um dos fármacos mais utilizados na quimioterapia de tumores de pulmão do tipo CPCNP, sendo administrado mais frequentemente combinado com cisplatina e carboplatina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

2.1.7.3 Paclitaxel

O paclitaxel vem sendo utilizado em protocolos de tratamento de cânceres de ovário, mama, garganta, sarcoma de Kaposi e pulmão. Ele é um agente estabilizante de microtúbulos, porque estimula a polimerização dos mesmos ao induzir mudanças conformacionais da proteína tubulina. A supressão da dinâmica dos microtúbulos promove bloqueio mitótico das células tumorais, o que explica seu efeito antiproliferativo (JORDAN; KAMATH, 2007). Em 1990, o paclitaxel foi aprovado pelo FDA para o tratamento do tumor de pulmão do tipo CPCNP (JOHNSON; SCHILLER, 2014).

Assim como a cisplatina e o irinotecano, no tratamento do CPCNP o paclitaxel geralmente é utilizado combinado com outros agentes, como a própria cisplatina ou gemcitabina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Mais recentemente, novos estudos clínicos demonstraram bons resultados com a combinação do paclitaxel com carboplatina e bavituximabe (fármaco antiangiogênico), sendo o tratamento bem tolerado pelos pacientes com tumores CPCNP em estágio avançado e/ou com metástases (DIGUMARTI et al., 2014).

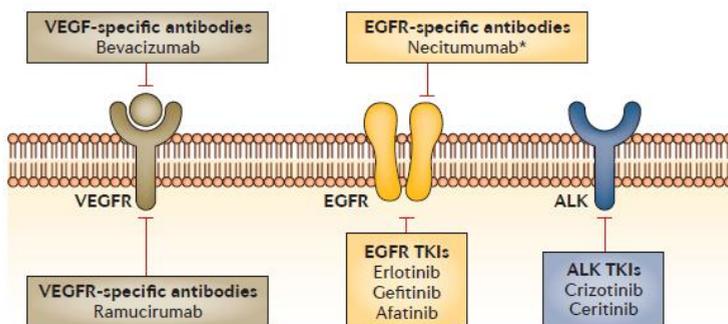
2.1.7.4 Terapias alvo-específicas

A partir do ano 2000, foram aprovados para tratamento do CPCNP fármacos descritos como “terapias alvo-específicas” (Figura 6). Entre esses agentes podem-se citar os anticorpos monoclonais ou os inibidores de tirosina cinase, que exercem efeitos inibitórios na angiogênese.

Terapias com inibidores de tirosina cinase para mutações específicas de EGFR e ALK também foram desenvolvidos e apresentaram bons resultados clínicos em pacientes que não respondem à terapia de primeira linha, justamente por manifestarem tais mutações (GRIDELLI et al., 2015). Geralmente, os pacientes tratados com estes fármacos mostram resposta clínica significativa e de longa duração. Apesar disso, após longos períodos, os pacientes podem apresentar novas mutações nos mesmos oncogenes e passam a não responder mais frente a estas

terapias alvo-específicas (JOHNSON; SCHILLER, 2014). Para a terapia do CPCNP, cada vez mais, tem sido propostos e explorados esquemas de tratamento combinando fármacos clássicos, tais como cisplatina, paclitaxel e etoposídeo, com fármacos alvo-específicos, como os apresentados na Figura 6 (OIZUMI et al., 2012; CHEN et al., 2013; YANG et al., 2013).

Figura 6. Fármacos alvo-específicos para o tratamento de tumores de pulmão do tipo células não pequenas.



Fonte: Gridelli et al. (2015).

Outros potenciais fármacos atualmente em desenvolvimento para tratamento do CPCNP incluem os inibidores de tirosina cinase direcionados para mutações de KRAS, BRAF, HER2, AKT1 e fusões dos oncogenes RET, ROS e NTRAK. Tais mutações nestes alvos específicos já foram relatadas e comprovadas em pacientes com estágio avançado de tumores CPCNP e que não responderam aos tratamentos de primeira linha (JOHNSON; SCHILLER, 2014).

2.2 Modelos animais para estudo de tumores de pulmão

Modelos de tumores em animais, geralmente roedores, são importantes para a triagem e avaliação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer, e que também podem ser usados em estudos de toxicidade, carcinogênese e do microambiente tumoral (RUGGERI; CAMP; MIKNYOCZKI, 2014). Eles são derivados de linhagens de células tumorais humanas ou murinas e classificados conforme o sítio de implante das mesmas. Os principais modelos são os xenográficos, os transgênicos, os singênicos e os modelos de metástase.

Diversas linhagens de células tumorais de cólon, pulmão, mama, rim, ovário, próstata, pâncreas, sistema nervoso central e melanoma já foram utilizados em **modelos xenográficos** de tumor, o que possibilita ampliar ainda mais as possibilidades de aplicação destes métodos. Nestes modelos, são utilizados camundongos atímicos e imunocomprometidos da linhagem BALB/c nude, característica que possibilita o enxerto de células humanas sem a rejeição do animal (JUNG, 2014). No modelo xenográfico de tumor ectópico, as células tumorais são implantadas pela via subcutânea, geralmente na região próxima da pata dos animais. Portanto, neste modelo, as células são inoculadas em um sítio anatômico diferente da sua origem (Figura 7A), sendo que a taxa de eficácia do enxerto é de aproximadamente 90%. As principais vantagens deste modelo são a possibilidade de uso de células tumorais humanas, facilidade de monitoramento da progressão tumoral, boa reprodutibilidade e tempo relativamente curto para análise. As desvantagens são a necessidade de uso de animais imunocomprometidos, os quais são mais onerosos, o fato do tumor desenvolver em local diferente do seu microambiente de origem, e não poder ser aplicado para estudo de tumores não sólidos (JUNG, 2014).

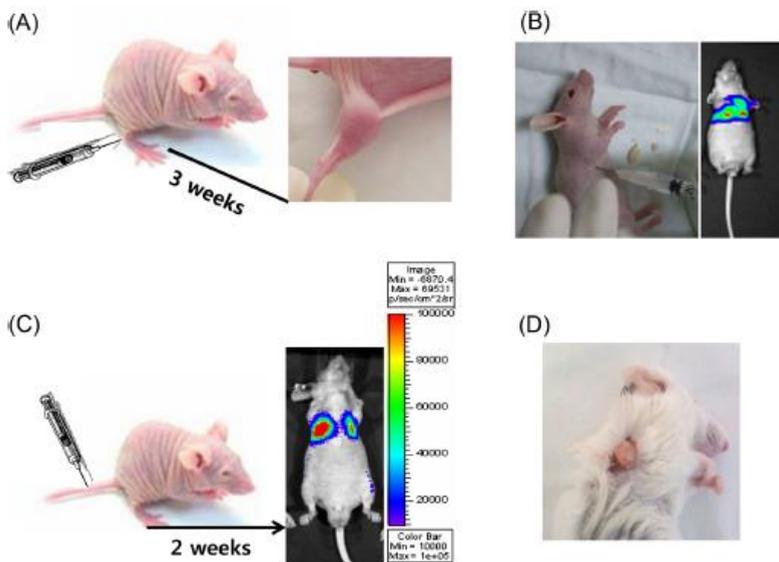
No modelo xenográfico de tumor ortotópico, as células tumorais humanas são implantadas no mesmo sítio de origem do tumor. Por exemplo, células tumorais de pulmão implantadas na cavidade torácica dos animais (Figura 7B). Portanto, este modelo requer a aplicação de técnica cirúrgica bem treinada e padronizada, tendo em vista a sensibilidade dos animais, que são atímicos. Ele possui a vantagem do tumor desenvolver no microambiente similar ao da origem das células implantadas, e pode reproduzir melhor as características histopatológicas. As demais vantagens e desvantagens são as mesmas citadas para o modelo ectópico (RUGGERI; CAMP; MIKNYOCZKI, 2014).

No modelo animal para **estudo de metástase**, as células tumorais são implantadas na cauda do animal e, após um determinado período de tempo, podem disseminar e serem detectadas em outros órgãos ou tecidos (Figura 7C). Neste modelo, o ideal é que as células utilizadas possam emitir sinal de fluorescência ou quimiluminescência para que os focos de metástase ou, até mesmo, de micrometástases possam ser detectados com equipamentos específicos (JUNG, 2014).

Recentemente, foram desenvolvidos modelos xenográficos de tumor em animais com células derivadas de pacientes, inclusive com células de tumor de pulmão do tipo CPCNP (Figura 7D). A principal vantagem deste modelo é a possibilidade de avaliar a progressão tumoral e testar

esquemas de terapia específicos para cada paciente. Além disso, podem ser mantidas as características genéticas, histológicas, fenotípicas, celulares e do estroma constitutivo do tumor de origem. As desvantagens do modelo são a necessidade de equipes muito bem treinadas e capacitadas, além de maiores custos e maior demanda de tempo, em relação aos modelos descritos anteriormente (MORO et al., 2012).

Figura 7. Modelos xenográficos para estudo de tumores. Imagens representativas de: (A) modelo xenográfico de tumor ectópico; (B) modelo xenográfico de tumor ortotópico; (C) modelo de metástase; (D) modelo xenográfico de tumor com células derivadas de paciente.



Fonte: Jung (2014).

Atualmente, os modelos xenográficos são os mais aplicados para avaliar a resposta de tumores humanos em animais, basicamente por necessitarem de menor tempo para a obtenção de resultados. No Quadro 1 estão descritos os principais fármacos aplicados para o tratamento de tumores de pulmão e os modelos animais utilizados durante o desenvolvimento dos mesmos. Dentre os 17 fármacos usados no tratamento dos tumores de pulmão, apenas três foram desenvolvidos

com a aplicação de modelos transgênicos, e somente dois com modelos singênicos na fase pré-clínica. Os modelos transgênicos são mais interessantes para avaliar a progressão de tumores e resposta terapêutica porque utilizam animais imunocompetentes; no entanto, seu estabelecimento é mais complexo e mais oneroso, e demandam mais tempo para análise. Apesar da ampla utilização dos modelos murinos de tumores de pulmão, a maior crítica continua sendo em relação às diferenças biológicas inerentes entre humanos e roedores, já que muitos candidatos promissores com resposta terapêutica importante nos animais falharam quando testados em humanos (KELLAR, EGAN; MORRIS, 2015).

Os modelos de tumores em animais **transgênicos** utilizam animais imunocompetentes, uma vantagem em relação aos modelos discutidos anteriormente, porque permitem avaliar a progressão tumoral em um microambiente com resposta imune. Estes modelos são criados a partir da indução de instabilidades genômicas específicas nos animais, ou seja, com a indução de mutação em genes específicos, que atuam diretamente no desenvolvimento dos tumores, tais como K-Ras, C-myc, Rb, p53 e EGFR (RUGGERI; CAMP; MIKNYOCZKI, 2014). Atualmente, a maioria dos tumores humanos já está bem caracterizada quanto às mutações predominantes associadas com a doença e, desse modo, nos animais tais mutações também são direcionadas dependendo do tipo de tumor a ser estudado (SINGH; JOHNSON, 2006). Portanto, trata-se de um modelo que reflete de modo mais real a progressão tumoral, tal qual acontece em humanos, o que possibilita prever a eficácia clínica, inclusive com tumores resistentes aos fármacos e também eventos moleculares específicos relacionados com o processo da carcinogênese. As desvantagens deste modelo são o custo mais significativo e o desenvolvimento heterogêneo dos tumores (RUGGERI; CAMP; MIKNYOCZKI, 2014). Inclusive a própria DACE já foi testada quanto ao efeito antitumoral em modelo transgênico de tumor de pulmão do tipo C-RAF-1-BxB (SILVA et al., 2015).

Modelos singênicos de tumores em animais são gerados com células tumorais da mesma espécie em animais imunocompetentes. Para o estudo de tumor de pulmão, há apenas um modelo singênico descrito, o carcinoma de pulmão de Lewis. Este modelo é bastante tumorigênico e metastático, e foi um dos primeiros modelos animais de tumor de pulmão a ser usado para a investigação da eficácia de novos agentes quimioterápicos. Sua principal vantagem é o fato do tumor se desenvolver em um ambiente com resposta imune. No entanto, a principal limitação se deve justamente à obtenção de diferentes

respostas terapêuticas, em se tratando de um tumor murino e quando o novo agente for testado em humanos (KELLAR; EGAN; MORRIS, 2015).

Outros modelos de tumores de pulmão descritos mais recentemente são os modelos induzidos por agentes carcinogênicos específicos, tais como uretano, dimetilidrazina, dietilnitrosamina e derivados do benzopireno (KELLAR; EGAN; MORRIS, 2015). Também foram desenvolvidos dois modelos de tumor de pulmão a partir de células-tronco embrionárias com mutações direcionadas para genes específicos, a fim de avaliar mutações de vias de sinalização e potencial terapêutico específico para estas vias, no qual os tumores se desenvolvem no microambiente normal de animais quiméricos, após a injeção de um blastocisto manipulado geneticamente, por exemplo, pela técnica de RNA de interferência (ZHOU et al., 2010; PREMSRIRUT et al., 2011).

Quadro 1. Modelos pré-clínicos utilizados para o desenvolvimento de fármacos para tratamento de tumores de pulmão.

| Fármaco | Mecanismo | Aprovação FDA | Modelo pré-clínico | Eficácia Clínica |
|---------------|--|----------------------------|--|---------------------|
| Gefitinibe | Inibidor HER1/EGFR | 2009 | Xenográfico | Positiva |
| Erlotinibe | Inibidor HER1/EGFR | 2005 | Xenográfico | Positiva |
| Vandetanibe | Inibidor VEGF/EGFR | Não aprovado | Xenográfico | Negativa |
| Crizotinibe | Inibidor ALK | Ensaio clínico fase III | Transgênico | Positiva |
| Navelbine | Agente antimicrotúbulo | 1994 | Singênico | Positiva |
| Paclitaxel | Agente antimicrotúbulo | 1992 | Xenográfico | Positiva |
| Gemcitabina | Análogo de nucleosídeo | 2006 | Xenográfico | Positiva |
| Pemetrexede | Antimetabólito de folato | 2004 | Xenográfico | Positiva |
| Doxorrubicina | Antibiótico antracíclico | Década 1950 | Xenográfico | Positiva |
| Cisplatina | Agente alquilante DNA | 1969 | Xenográfico + transgênico | Positiva |
| Carboplatina | Agente alquilante DNA | 1989 | Xenográfico + singênico | Positiva |
| Etoposídeo | Inibidor topoisomerase II | Década 1960 | Xenográfico | Positiva |
| Bevacizumabe | Anticorpo monoclonal inibidor VEGF-A | 2004 | Xenográfico | Positiva |
| Sorafênibe | Inibidor VEGF, CKit, PDGF α , cRET | Ensaio clínico fase III | Xenográfico | Negativa |
| Sunitinibe | Inibidor VEGF, CKit, PDGF α , cRET | Ensaio clínico fase II | Xenográfico | Negativa |
| Cetuximabe | Anticorpo monoclonal inibidor EGFR | 2008 | Anticorpo monoclonal inibidor EGFR | Negativa |

Fonte: Adaptado de Kellar; Egan; Morris (2015).

Três fatores são essenciais para que a investigação de uma potencial estratégia terapêutica ultrapasse os ensaios pré-clínicos e siga para as

fases dos ensaios clínicos. Primeiro, o ideal é que a redução do crescimento do tumor no modelo pré-clínico não seja inferior a 50%, já que valores de inibição menores geralmente apresentam falha de eficácia terapêutica quando nas fases clínicas. Segundo, é obrigatório que o ensaio pré-clínico apresente um ganho de sobrevida, em relação aos fármacos já empregados na terapia padrão, sendo este um dos principais critérios de eficácia *in vivo*. Além disso, é importante que a terapia avaliada no modelo pré-clínico apresente resposta terapêutica eficiente, após o término do tratamento, pois se a terapia for descontinuada e o tumor retomar o crescimento, a probabilidade de a mesma ser eficaz no posterior ensaio clínico é reduzida consideravelmente (SANDLER et al., 2006; NATALE et al., 2009; KELLAR; EGAN; MORRIS, 2015).

Com base nestes dados, fica evidente de que não há um modelo totalmente adequado e completamente confiável para estudos pré-clínicos de novas estratégias terapêuticas, já que cada modelo apresenta vantagens e desvantagens. Para a escolha do modelo animal a ser utilizado, vários critérios devem ser considerados: tipo celular, anormalidades genéticas, microambiente tumoral, expressão de genes alvo, resposta imune, e potencial metastático.

2.3 Imagens cintilográficas com o radiofármaco tecnécio-99m conjugado com bombesina em modelos animais de tumor

Os radiofármacos são ligantes marcados com radioisótopos com capacidade de interagir com alvos moleculares específicos. A medicina nuclear emprega esses radiofármacos, que são administrados aos pacientes e, por meio de equipamentos específicos, captam a radiação por eles emitida, os quais são necessários para a obtenção de imagens. Dentre as técnicas empregadas para a aquisição de imagens, pode-se citar a tomografia por emissão de pósitron (*positron emission tomography* - PET) e a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (*single photon emission computed tomography* - SPECT). Tais técnicas vêm sendo aplicadas há mais de três décadas para diagnóstico, planejamento e avaliação da resposta terapêutica em pacientes com câncer. Portanto, é possível monitorar, de forma constante e minimamente invasiva, a resposta ao tratamento assim como as possíveis recidivas (FASS, 2008).

Os radiofármacos são administrados, geralmente, pela via intravenosa, seguida da sua biodistribuição pelo organismo, alcançando os órgãos ou tecidos pelos quais possuem afinidade. Após atingirem o

alvo, os radiofármacos não interferem na fisiologia/bioquímica das células e apresentam a habilidade de detectar um determinado processo sem modificá-lo, ou seja, detectar células tumorais sem alterar a progressão tumoral (THRALL; ZIESSMAN, 2003).

As imagens obtidas com radiofármacos possibilitam a visualização de processos biológicos, em níveis celular e molecular e, além disso, podem detectar alterações patológicas do órgão ou tecido em análise (SANTOS-CUEVAS et al., 2009). Portanto, o diagnóstico pode ser feito na fase inicial da progressão do câncer. Por outro lado, as técnicas convencionais de imagem, tais como ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética nuclear e exame de raios x, muitas vezes necessitam de alterações anatômicas e morfológicas do órgão em estudo e, conseqüentemente, detectam a doença apenas tardiamente e nos estágios mais avançados (de BARROS et al., 2010; FERRO-FLORES et al., 2010).

Desse modo, tais imagens possibilitam um diagnóstico não invasivo e com capacidade de detectar tumores em estágios iniciais, o que aumenta a possibilidade de resposta terapêutica e conseqüentemente a cura dos pacientes. Além da detecção, as imagens auxiliam na localização, caracterização e no estadiamento das lesões nos pacientes com câncer, direcionando as intervenções terapêuticas com monitoramento da evolução do tratamento e prognóstico. Além disso, conforme citado acima, devido à maior precisão, essas imagens podem auxiliar na detecção de recidivas da doença (de BARROS et al., 2010; BEER, et al., 2011; HIGGINS; POMPER, 2011). Diversos são os radiofármacos empregados em medicina nuclear, tais como iodo-131 (^{131}I), índio-111 (^{111}In), tálio-201 (^{201}Tl), flúor-18 (^{18}F), tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), gálio-67 (^{67}Ga), dentre outros (SAHA, 2004).

Para a avaliação da eficácia de um tratamento, sabe-se que após a quimioterapia, os tumores passam a ser constituídos de tecidos não ativos, tais como tecidos necrosados, tecidos fibróticos e células em processo de morte celular, os quais compõem a massa tumoral residual. Esta massa nem sempre traduz o estado residual de doença, uma vez que nenhuma redução visível no volume tumoral é verificada até que grande parte do tecido necrótico tenha sido degradada. Este fato gera confiabilidade nas medidas de volume tumoral e esse tipo de imagem assume papel importante como ferramenta de análise da viabilidade celular, de modo a avaliar, por exemplo, a atividade antitumoral de um novo fármaco e/ou formulação farmacêutica (KUBOTA, 2001).

Dentre os agentes de imagem tumoral, que se baseiam na superexpressão de receptores de superfície das células cancerosas, os

peptídeos apresentam maior aplicação, já que possuem características mais adequadas, especialmente quando comparados aos anticorpos. Os anticorpos são substâncias com alto peso molecular, o que dificulta sua perfusão pelo tecido tumoral e prejudica a visualização do tumor. Além disso, muitos anticorpos têm potencial de induzir reações imunológicas. Por outro lado, os peptídeos apresentam baixo peso molecular (até 50 aminoácidos), o que permite uma difusão facilitada no tecido tumoral, com depuração sanguínea mais rápida. Outra característica importante é a baixa antigenicidade. Por fim, os peptídeos apresentam estabilidade metabólica e tolerância frente a modificações em sua estrutura, resultantes do processo de radiomarcagem (SCHOTTELIUS; WESTER, 2009; HAUBNER; DECRISTOFORO, 2011).

Nos últimos anos, foram identificados muitos receptores para peptídeos expressos em maior proporção nos tecidos tumorais. Assim, peptídeos radiomarcados podem ter aplicações na terapia e/ou diagnóstico destes tumores. Por exemplo, em tumores de pulmão, sabe-se que os principais receptores de peptídeos superexpressos são os de bombesina, peptídeo intestinal vasoativo, e os de neurotensina, os quais podem ser aplicados para a detecção de tumores de pulmão (WEINER; THAKUR, 2002; DURKAN; LAMBRECHT; UNAK, 2007).

A bombesina (BBN), um neuropeptídeo constituído de 14 aminoácidos, foi inicialmente isolada da pele do sapo *Bombina bombina*, sendo análoga ao peptídeo liberador de gastrina (em inglês, gastrin-releasing peptide, GRP), ligando-se especificamente aos receptores dessa última, em células humanas. Suas atividades farmacológicas incluem a estimulação da liberação de hormônios, como gastrina e somatostatina, e da contração da musculatura lisa do estômago e do intestino. Além disso, os receptores de BBN, expressos em células tumorais, apresentam efeitos mitogênicos e estimulam a proliferação tumoral, quando ativados por seu agonista. Diversos tipos de câncer apresentam receptores para peptídeos do tipo BBN, dentre eles os tumores de pulmão, próstata, mama e cólon, o que possibilita a aplicação de análogos desses peptídeos para fins de diagnóstico e terapia dos mesmos (FERRO-FLORES et al., 2010; MANSI et al., 2011).

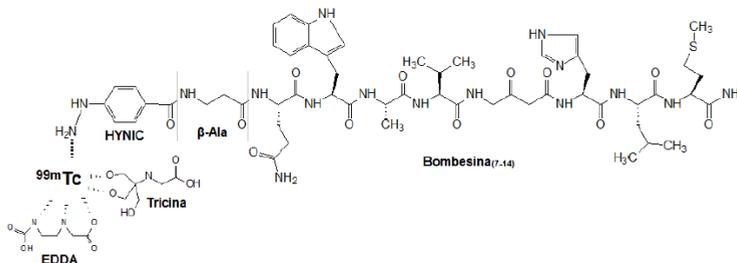
O tecnécio-99m (^{99m}Tc) é o radiofármaco mais utilizado na medicina nuclear, por apresentar propriedades físicas e químicas ideais para um radioisótopo, tais como meia-vida física de 6,01 horas, emissão gama de baixa energia (140 keV), alta disponibilidade do radioisótopo a partir de um sistema gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$), além de apresentar um custo relativamente baixo (JONES, 1995; MARQUES, 2001; YANG et al., 2003). O gerador de ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$)

consiste em uma coluna de vidro contendo no seu interior alumina, onde o molibdênio-99 (^{99}Mo), denominado radionuclídeo pai, encontra-se fortemente adsorvido. Ao se desintegrar, emitindo uma partícula β^- , o ^{99}Mo dá origem ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o radionuclídeo filho. Esse não possui afinidade pela resina de alumina e seus átomos são eluídos do gerador com solução de cloreto de sódio 0,9%, na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) (DEWANJEE, 1990; SAHA, 2004).

O íon pertecnetato, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ tem estado de oxidação +7 para o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o que o torna uma espécie não reativa e incapaz de se ligar a algum composto, sendo necessária a redução do tecnécio, do estado +7 para um estado de oxidação menor. O cloreto de estanho II ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) é o agente redutor mais comum usado na preparação de compostos ligados ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (NOWOTNIK, 1990; SAHA, 2004). O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ reduzido é uma espécie quimicamente reativa e combina com uma grande variedade de agentes quelantes. O agente quelante geralmente é doador de elétrons e forma uma ligação covalente coordenada com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ reduzido (SAHA, 2004). Os agentes quelantes para o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ exibem baixa taxa de dissociação do radionuclídeo. Uma grande variedade de quelantes tem sido desenvolvida para a radiomarcagem com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, tais como os triaminotiois (N_3S), os diaminoditiois (N_2S_2), o hexametilpropilenoaminóxima (HMPAO) e o ácido hidrazinonicotínico (HYNIC) (BLOK et al., 2004; GANDOMKAR et al., 2007; de BARROS et al., 2010).

Para a radiomarcagem da BBN, o HYNIC é o agente quelante mais frequentemente utilizado, conforme apresentado na figura 8, que ilustra o complexo do rádiofarmaco $^{99\text{m}}\text{Tc}$ conjugado com o peptídeo bombesina e o agente quelante HYNIC.

Figura 8. Complexo peptídico $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com seus coligantes.



Fonte: De Barros et al. (2010).

A reação do grupo ácido carboxílico do HYNIC com a extremidade nitrogenada da BBN não prejudica a ligação do peptídeo aos seus receptores, a qual ocorre pela extremidade C-terminal. A radiomarcagem com átomos de ^{99m}Tc utilizando HYNIC é realizada na presença de coligantes, tais como tricina e etilenodiaminodiacético (EDDA), os quais estabilizam o complexo formado (de BARROS et al., 2013).

O radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ apresenta alta estabilidade no plasma de camundongos. É conhecido que o tecnécio apresenta elevada ligação a moléculas contendo átomos de enxofre; entretanto, o radiofármaco mostrou-se estável quando testado na presença de cisteína, que mimetiza *in vitro* a tendência desta transquelação (STALTERI et al., 1999). Ele apresenta, ainda, depuração sanguínea rápida, especificidade pelos receptores do peptídeo liberador de gastrina com internalização tempo dependente, e excreção predominantemente renal (de BARROS et al., 2013). Com base nestas características e levando em conta a superexpressão de receptores de BBN em tumores de pulmão, o radiofármaco tecnécio-99m conjugado com BBN apresenta potencial para a detecção, o acompanhamento da progressão tumoral e a resposta terapêutica, em modelo xenográfico murino de tumor de pulmão, como o que foi estabelecido durante a realização desta Tese.

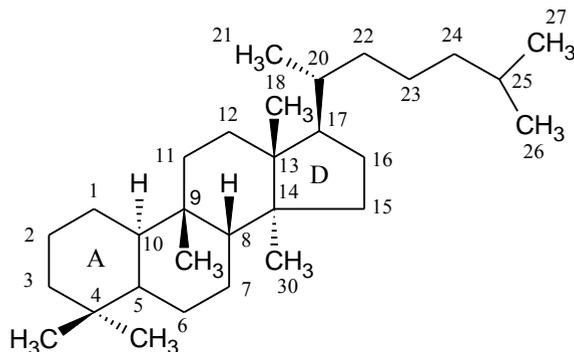
2.4 Cucurbitacinas

Diversos fármacos aplicados na quimioterapia são derivados de produtos naturais. Dentre todos os fármacos para tratamento do câncer introduzidos no mercado da Europa Ocidental, América do Norte e Japão, desde 1940 até 2006, aproximadamente 49% de um total de 175 medicamentos anticâncer aprovados pelas agências regulatórias destes países, foram totalmente ou parcialmente derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012). Como exemplos de fármacos derivados de produtos naturais empregados na clínica oncológica podem ser mencionados os alcalóides da vinca, vinblastina e vincristina, isolados a partir da planta *Catharanthus roseus* L., e aplicados para o tratamento de leucemias, linfomas, cânceres de testículo, mama, pulmão e sarcoma de Kaposi; e o paclitaxel, obtido originalmente de *Taxus brevifolia* Nutt., que é usado no tratamento dos cânceres de ovário e mama, principalmente, mas também de garganta, sarcoma de Kaposi e pulmão (UNNATI et al., 2013). Diante desse contexto, uma revisão sobre uma classe importante de produtos naturais, as cucurbitacinas, que são consideradas potenciais agentes anticâncer, será descrita a seguir, já que

um derivado semissintético da cucurbitacina B é o objeto de estudo desta Tese.

As cucurbitacinas são uma classe de compostos triterpenóides tetracíclicos polidroxilados, que apresentam um esqueleto biogeneticamente incomum, descrito como [19(10→9β)-abeo-10α-lanostano (cucurbitano)], que pode ser encontrado na forma livre ou glicosilada (RÍOS et al., 2012) (Figura 9).

Figura 9. Esqueleto básico das cucurbitacinas.



Fonte: Autor.

As cucurbitacinas foram descritas inicialmente como compostos tóxicos oriundos do metabolismo secundário de plantas da família Cucurbitaceae, com função protetora para essas plantas frente a fatores externos agressores. Algumas espécies dessa família foram e/ou ainda são utilizadas devido às suas propriedades antipirética, analgésica, antimicrobiana, anti-inflamatória, hepatoprotetora e antitumoral (CHEN et al., 2005). Dentre as plantas contendo cucurbitacinas e descritas na medicina popular brasileira, pode-se citar: "buchinha" (*Luffa operculata*) (MATOS; GOTTLIEB, 1967), "taiúia" (*Wilbrandia ebracteata*) (SCHENKEL et al., 1992; FARIAS et al., 1993) e "nhandiroba" (*Fevillea trilobata*) (VALENTE et al., 1993). A primeira cucurbitacina descrita foi a elaterina, em 1831, isolada a partir de *Ecballium elaterium* (Linn.) A. Rich (REHM et al., 1957). A partir de então, diversas cucurbitacinas foram isoladas, não somente de plantas da família Cucurbitaceae, mas também de espécies de outras famílias, tais como Rosaceae, Rubiaceae, Begoniaceae, Primulaceae, Sterculiaceae e Datisceae (MIRÓ, 1995; SARKER et al., 1999; DINAN et al. 2001).

Após sua descoberta e caracterização química, as cucurbitacinas foram classificadas e divididas em 12 grupos, sendo organizadas por letras, em ordem alfabética. As cucurbitacinas dos tipos B e E foram descritas como originais, enquanto que outras cucurbitacinas poderiam ser geradas a partir do metabolismo enzimático das plantas. Assim, ficou estabelecido que o metabolismo enzimático da cucurbitacina B poderia gerar as cucurbitacinas A, C, D, F, G e H. Já a cucurbitacina E poderia ser a precursora das cucurbitacinas I, J, K e L. Foi comprovado que as cucurbitacinas B e D estão presentes em maior proporção, seguidas das cucurbitacinas E, G, H e I (MIRÓ, 1995; CHEN et al., 2005).

O potencial citotóxico e antitumoral das cucurbitacinas foi descrito inicialmente para as cucurbitacinas D e E, há mais de meio século. Nestes estudos pioneiros, tais moléculas demonstraram capacidade de inibir o crescimento de células tumorais *in vitro* e também em tumores em camundongos (GITTER et al., 1961; GEISSMAN, 1964). Nesta época, poucos estudos sobre a atividade antitumoral dessas moléculas continuaram a ser realizados, provavelmente devido à toxicidade das mesmas e à dificuldade de realizar bioensaios, que permitissem avaliar efeitos tanto *in vitro* (citotóxicos) como *in vivo* (antitumorais), além do fato de que os mecanismos biológicos de desenvolvimento dos tumores eram pouco elucidados na época (DOSKOTCH; MALIK; BEAL, 1969; KONOPA; ZIELINSKI; MATUSZKIEWICZ, 1974; ARISAWA et al., 1984). A partir da década de oitenta foram estabelecidos novos ensaios para avaliação da atividade citotóxica de compostos promissores, e nos anos 90 os pesquisadores da área retomaram o interesse em avaliar o potencial antitumoral e mecanismo de ação das cucurbitacinas e seus derivados (LEE; IWANSKI; THOENISSEN, 2010).

A partir de então, o interesse farmacológico neste grupo de compostos aumentou progressivamente, principalmente com as cucurbitacinas B, D, E e I, além também dos seus derivados que foram bastante estudados, principalmente, em função dos seus potenciais efeitos citotóxicos e antitumorais (a título ilustrativo, pode-se citar estas referências mais atuais: YIN et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2009; LEE; IWANSKI; THOENISSEN, 2010; LEE et al., 2011; ZHANG et al., 2010; DING et al., 2011; CHEN et al., 2012; RÍOS et al., 2012; ISHII et al., 2013; KONG et al., 2014; GAO et al., 2014; SILVA et al., 2015; MAROSTICA et al., 2015).

Diversos estudos avaliaram e comprovaram o potencial antitumoral das cucurbitacinas em diferentes linhagens celulares, tais como células tumorais de mama (YANG et al., 2007; TANNIN-SPITZ et al., 2007;

PROMKAN et al., 2013), pâncreas (THOENISSEN et al., 2009; IWANSKI et al., 2010; SUN et al., 2010), sangue (HARITUNIANS et al., 2008; CHAN et al., 2010; ISHDORJ; JOHNSTON; GIBSON, 2010; DING et al., 2011), pulmão (KAUSAR et al., 2013; SILVA et al., 2015), cólon (YASUDA et al., 2010), próstata (DUNCAN et al., 1996), fígado (TAKAHASHI et al., 2009; CHAN et al., 2010), laringe (LIU et al., 2010), osteosarcoma (LEE et al., 2011) e melanoma (AHMED; HALAWISH, 2014). Outro fato relevante relacionado com o potencial citotóxico das cucurbitacinas é que elas exercem seus efeitos em faixas de concentração da ordem de micromolar ou, até mesmo, nanomolar. Em vários trabalhos, por exemplo, as concentrações efetivas das cucurbitacinas avaliadas foram menores do que as de fármacos já utilizados na clínica oncológica, aplicados como controle positivo dos experimentos (KONGTUN et al., 2009).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos com esta classe de compostos (LANG et al., 2011, 2012, 2014), inclusive com o propósito de elucidar *in vitro* e *in vivo* o mecanismo de morte celular causado por algumas cucurbitacinas (SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2015; MAROSTICA et al., 2015).

Durante o desenvolvimento da Tese de Doutorado da colega Izabella Thais Silva, em nosso laboratório, foi testada a citotoxicidade de diferentes derivados semissintéticos da cucurbitacina B frente à linhagem de células A549. Após esta triagem citotóxica, foi observado que a DACE exerceu atividade antiproliferativa promissora (LANG et al., 2012). Na linhagem celular A549, o tratamento com a DACE individualmente exerceu efeitos antiproliferativos por induzir bloqueio da fase G2M do ciclo celular e modular proteínas de vias de proliferação celular, além de promover alterações dos filamentos de actina do citoesqueleto celular e induzir morte celular via apoptose. Também foi demonstrado promissor efeito antitumoral do tratamento com a DACE individualmente em modelo transgênico *in vivo* de tumor de pulmão, o qual inclusive foi bem tolerado em termos de toxicidade (SILVA et al., 2015). O conjunto destes dados contribuiu para a elaboração e execução dos experimentos desta Tese de Doutorado, com o objetivo de explorar o efeito antitumoral da DACE combinada com fármacos antineoplásicos também em modelos *in vitro* e *in vivo* de tumor de pulmão do tipo CPCNP.

De modo geral, as cucurbitacinas são consideradas inibidores seletivos da via de sinalização JAK/STAT3 (ALGHASHAM, 2013). Esta via induz a sinalização de Janus-cinases (JAKs) e sinais transdutores e ativadores de transcrição (STAT3). Além disso, as

cucurbitacinas podem também exercer seus efeitos citotóxicos inibindo outras vias de sinalização celular, como por exemplo, as vias PI3K/AKT e RAF/MEK/ERK, que também são vias comumente desreguladas no câncer. Estas vias de sinalização, quando ativadas de modo persistente e desreguladas, promovem a proliferação contínua das células tumorais, favorecendo o desenvolvimento dos tumores. Os efeitos inibitórios das cucurbitacinas nestas vias caracterizaram estas moléculas como uma abordagem promissora para o tratamento dos diferentes tipos de câncer (YU; KORTYLEWSKI; PARDOLL, 2007; RÍOS et al., 2012).

Nas células tumorais, as cucurbitacinas também induzem alterações morfológicas e bioquímicas como parte de seus efeitos. As principais alterações morfológicas observadas são condizentes com as características de formação dos corpos apoptóticos e da morte celular por apoptose, tais como arredondamento celular, inchaço, formação de prolongamentos e condensação da cromatina nuclear. Alterações da morfologia e da homeostasia dos filamentos de actina do citoesqueleto das células tumorais também foram descritos após tratamentos com este grupo de compostos (LEE et al., 2010; ZHANG et al., 2011; ZHANG et al., 2012a). Também já foi comprovado que as cucurbitacinas atuam no ciclo celular induzindo bloqueio da fase G2/M mediante inibição de ciclinas (D1 e B1) e posterior indução de morte celular por apoptose, através da ativação de proteínas pró-apoptóticas e inibição de proteínas anti-apoptóticas (LEE et al., 2010; BOYKIN et al., 2011). Outros estudos também descreveram as cucurbitacinas como sendo capazes de potencializar a quimio e/ou radiosensibilidade de tumores contendo populações de células tronco tumorais CD133⁺ de meduloblastomas (CHANG et al., 2012) e tumores de pulmão (HSU et al., 2011). Também foi relatado o efeito antiangiogênico das cucurbitacinas, principalmente da cucurbitacina E. Como a sinalização celular do STAT3 também estimula a angiogênese, por meio da expressão de fatores de crescimento específicos, este poderia ser o mecanismo pela qual as cucurbitacinas inibem a formação de novos vasos sanguíneos e contribuem para o controle do crescimento tumoral e metástase (DONG et al., 2010).

Apesar da promissora atividade citotóxica das cucurbitacinas e seus derivados, a aplicação das cucurbitacinas como opção terapêutica para tratamento do câncer ainda não é uma realidade, devido a sua toxicidade considerável (GABRIELSEN et al., 2013), sendo descrito somente um relato de estudo clínico desta classe de compostos. Neste estudo, pacientes com câncer de pulmão avançado receberam tratamento com 120 mg da cucurbitacina B, via oral, três vezes ao dia, durante sete dias,

com o objetivo de estimular a diferenciação de células dendríticas imaturas e potencializar a imunidade contra o tumor. Este protocolo de tratamento aumentou a quantidade de células dendríticas maduras, por meio da inibição da via JAK2/STAT3, sugerindo que esse composto poderia complementar a imunoterapia para o tratamento do câncer de pulmão (LU; YU; XU, 2012).

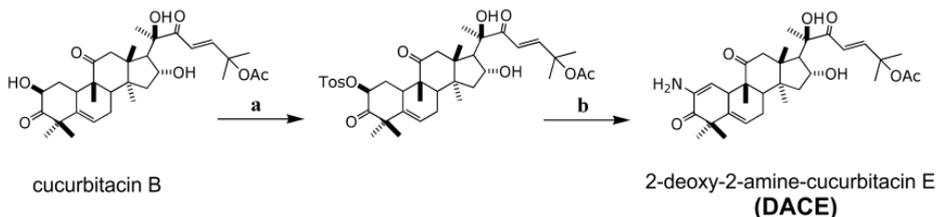
Uma possibilidade interessante para atenuar a toxicidade das cucurbitacinas poderia ser a associação das mesmas em esquemas combinatórios com fármacos antineoplásicos já usados na clínica, a fim de aumentar sua eficácia, reduzir e/ou retardar o fenômeno de resistência, diminuir suas doses e, conseqüentemente, os efeitos colaterais tóxicos sistêmicos (CHEONG et al., 2005). Estudos anteriores já comprovaram que algumas cucurbitacinas atuam sinergicamente com quimioterápicos já usados na clínica. Seguindo esta abordagem, Thoennissen e colaboradores (2009) relataram o efeito sinérgico *in vitro* da cucurbitacina B com a gemcitabina e confirmaram o efeito antitumoral em modelos *in vivo*, com a aplicação de modelos xenográficos de câncer pancreático humano, usando baixas doses destes compostos combinados, e demonstrando redução significativa dos tumores e toxicidade sistêmica mínima. Ramalhete e colaboradores (2009) também descreveram o potencial sinérgico de derivados de cucurbitacinas com doxorrubicina, em células de linfoma. Sadzuka e colaboradores (2010) demonstraram os efeitos citotóxicos da cucurbitacina E + doxorrubicina, promovendo o acúmulo intracelular da doxorrubicina em células de sarcoma de ovário, facilitando o influxo e prevenindo o efluxo do quimioterápico, o que permitiu a redução da dose para o efeito terapêutico desejado. Liu e colaboradores (2010) também demonstraram o efeito sinérgico *in vitro* e *in vivo* do docetaxel e cisplatina com a cucurbitacina B, em células de tumor de laringe (Hep-2). A cucurbitacina B também já apresentou potencial sinérgico com o metotrexato para o tratamento de osteosarcoma humano (LEE et al., 2011). Assim, o potencial sinérgico da associação de novos derivados de cucurbitacinas com fármacos já empregados na clínica representa uma estratégia a ser explorada para o tratamento de diferentes tipos de tumores.

No grupo diversificado dos metabólitos secundários de plantas, encontram-se as cucurbitacinas, que são triterpenos tetracíclicos poliidroxilados, reconhecidas desde o século passado como compostos tóxicos e extraídos inicialmente de plantas da família Cucurbitaceae (RÍOS et al., 2012). Quando descobertas, as cucurbitacinas foram divididas em categorias e denominadas por letras, em ordem alfabética.

Comprovadamente, as cucurbitacinas originalmente extraídas de plantas são as cucurbitacinas B e E. Nos últimos anos, as cucurbitacinas e seus derivados semissintéticos foram extensivamente estudados, principalmente devido à sua potencial atividade citotóxica e antitumoral frente a diferentes tipos de células tumorais e modelos animais de tumores, respectivamente (algumas referências mais atuais são aqui citadas como exemplos: TAKAHASHI et al., 2009; ZHANG et al., 2010; LANG et al., 2011; LEE et al., 2011; LANG et al., 2012; RÍOS et al., 2012; KAUSAR et al., 2013; SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2015; MAROSTICA et al., 2015). Neste contexto, estudos com esta promissora classe de compostos são importantes e necessários para tentar explorar ao máximo a sua potencial contribuição para o tratamento do câncer.

Considerando a relevância dos estudos anteriores, inclusive do nosso grupo de pesquisa, sobre o potencial citotóxico das cucurbitacinas e da necessidade da P&D&I de novos fármacos para o tratamento do câncer de pulmão, um dos objetivos desta Tese de Doutorado foi elucidar o mecanismo dos efeitos citotóxicos sinérgicos de um novo derivado semissintético da cucurbitacina B, aqui denominada de DACE (Figura 10), em esquemas de tratamento combinado com três fármacos utilizados na clínica: cisplatina, irinotecano e paclitaxel, frente a uma linhagem de células de câncer de pulmão humano do tipo não pequenas (A549). Após a avaliação dos efeitos destes esquemas de tratamento combinado *in vitro*, foi selecionada a associação mais promissora para ser avaliada em um modelo xenográfico murino de tumor de pulmão.

Figura 10. Processo de semissíntese da DACE a partir do precursor, a cucurbitacina B.



Reagents and conditions: a) 4-toluenesulfonyl chloride, DABCO, DCM, 0°C; b) NaN₃, DMF, 70°C

Fonte: Lang et al. (2012).

REFERÊNCIAS

AGUS, D.B. et al. A physical sciences network characterization of non-tumorigenic and metastatic cells. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1449, 2013.

AHMED, M.S.; HALAWISH, F.T. Cucurbitacins: potential candidates targeting mitogen-activated protein kinase pathway for treatment of melanoma. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.29, p. 162-167, 2014.

ALGHASHAM, A.A. Cucurbitacins – A promising target for cancer therapy. **International Journal of Health Sciences**, v. 7, n. 1, p. 77-89, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Basics. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em novembro de 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Non-small cell lung cancer. Disponível em: < <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell>>. Acesso em janeiro de 2016.

ARISAWA, M. et al. Plant anticancer agents. XXX: cucurbitacins from *Ipomopsis aggregate* (Polemoniaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 411-413, 1984.

ARYA, R. WHITE, K. Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 39, p.12-19, 2015.

ASHKENAZI, A. Directing cancer cells to self-destruct with proapoptotic receptor agonists. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 1001-1012, 2008.

AYOOLA, A. et al. Primary and acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer: an update. **Cancer Investigation**, v. 30, p. 433-446, 2012.

BABA, A. I.; CĂTOI, C. **Comparative Oncology**. The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.

BEER, A. J. et al. J. Radionuclide and hybrid imaging of recurrent prostate cancer. **The Lancet Oncology**, v. 12, p. 181-191, 2011.

BENSON, J.R.; LIAU, S.S. Cancer genetics: a primer for surgeons. **The Surgical Clinics of North America**, v. 88, p. 681-704, 2008.

BLOK, D. et al. New chelation strategy allows for quick and clean ^{99m}Tc labeling of synthetic peptides. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 31, p. 815-820, 2004.

BORGHAEIA, H.; SMITHA, M. R.; CAMPBELLB, K. S. Immunotherapy of cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 41-54, 2009.

BOYKIN, C. et al. Cucurbitacin IIa: a novel class of anti-cancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting surviving independent of JAK2/STAT3 phosphorylation. **British Journal of Cancer**, v. 104, p.781-789, 2011.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA)**. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Acesso em outubro de 2015.

BRÖKER, L.; KRUYT, F.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 3155–3162, 2005.

CEPEDA, V. et al. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 3-18, 2007.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C. G.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 563-572, 2002.

CHAN, K.T. et al. Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration. **Cancer Letters**, v. 294, p. 118-124, 2010.

CHAN, K.T. et al. Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the RAF/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. **Cancer Letters**, v. 289, p. 46-52, 2010.

CHANG, C.J. et al. Inhibition of phosphorylated STAT3 by Cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells. **Child's nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery**, v. 28, p. 363-373, 2012.

CHEN, J.C. et al. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: Structures and biological activities. **Natural Products Reports**, v. 22, p. 386-399, 2005.

CHEN, X. et al. Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. **Anticancer Drugs**, v. 8, p. 777-787, 2012.

CHEN, A.Y.; CHEN, P.M.T.; CHEN, Y-J. DNA topoisomerase I drugs and radioteherapy for lung cancer. **Journal of Thoracic Disease**, v. 4, p. 390-397, 2012.

CHEN, G. et al. Quality of life (QoL) analyses from OPTIMAL (CTONG-0802), a phase III, randomised, open-label study of first-line erlotinib versus chemotherapy in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (NSCLC). **Annals of Oncology**, v. 24, n. 6, p. 1615-1622, 2013.

CHEONG, K. et al. Combination therapy versus single agent chemotherapy in non-small cell lung cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 6, p. 1693-1700, 2005.

CHOU, T.C. Theoretical basis, experimental design and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 621-681, 2006.

COSTA-SILVA, B. et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nature Cell Biology**, v. 17, p. 816-826, 2015.

De ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

De BARROS, A. L. B. et al. Bombesin derivative radiolabeled with technetium-99m as agent for tumor identification. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 6182-6184, 2010.

De BARROS, A.L.B. et al. 99mTc-labeled bombesin analog for breast cancer identification. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 295, p. 2083-2090, 2013.

De VRIES, E.G.E.; GIETEMA, J.A.; DE JONG, S. Tumor necrosis factor – Related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 2390-2394, 2006.

DEWANJEE, M. K. The chemistry of 99mTc-labeled radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 20, n. 1, p. 5-27, 1990.

DIGUMARTI, R. et al. Bavituximab plus paclitaxel and carboplatin for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 86, n. 2, p. 231-236, 2014.

DINAN, L.; HARMATHA, J.; LAFONT, R. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. **Journal of Chromatography A**, v. 935, p. 105-123, 2001.

DING, N. et al. Apoptosis induction through proteasome inhibitory activity of cucurbitacin D in human T-cell leukemia. **Cancer**, v.117, p. 2735-2746, 2011.

DONG, Y. et al. Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2-STAT3 signaling pathway. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 2097-2104, 2010.

DOSKOTCH, R.W.; MALIK, M.Y.; BEAL, J.L. Cucurbitacin B the cytotoxic principle of *Begonia tuberhybrida* var. alba. **Lloydia**, v. 32, p. 115-122, 1969.

DUNCAN, K.L.K. et al. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 1553-1560, 1996.

DURKAN, K.; LAMBRECHT, F. Y.; UNAK, P. Radiolabeling of bombesin-like peptide with ^{99m}Tc: ^{99m}Tc-litorin and biodistribution in rats. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, p. 1516-1520, 2007.

ESTADOS UNIDOS DA AMERICA (EUA). **National Cancer Institute (NCI): Types of Cancer/Cancer statistics**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/>> Acesso em: novembro de 2015.

FARIAS, M.R. et al. Cucurbitacins as constituents of *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**, v. 59, p. 272-275, 1993.

FASS, L. Imaging and cancer: A review. **Molecular Oncology**, v. 2, p. 115–152, 2008.

FERRO-FLORES, G. et al. Peptides for *in vivo* target-specific cancer imaging. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 87-97, 2010.

FLOREA, A-M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Cancers**, v. 3, p. 1351-1371, 2011.

FOX, J.T.; MYUNG, K. Cell-based high-throughput screens for the discovery of chemotherapeutic agents. **Oncotarget**, v. 3, p. 581-585, 2012.

FRIEDL, P. et a. Classifying collective cancer cell invasion. **Nature Cell Biology**, v. 14, p. 777–783, 2012.

GABRIELSEN, M. et al. Cucurbitacin covalent bonding to cysteine thiols: the filamentous-actin severing protein Cofilin1 as an exemplary target. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, p. 1-11, 2013.

GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 1, p. 58-73, 2015.

GANDOMKAR, M. et al. Confirmation of hidrazone formation in HYNIC-peptide conjugate preparation, and its hydrolysis during labeling with ^{99m}Tc . **Applied Radiation and Isotopes**, v. 65, p. 805–808, 2007.

GAO, Y. et al. Inactivation of ATP citrate lyase by cucurbitacin B: A bioactive compound from cucumber, inhibits prostate cancer growth. **Cancer Letters**, v. 349, p. 15-25, 2014.

GARCIA, R. et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. **Oncogene**, v. 20, p. 2499-2513, 2001.

GARCIA-CARBONERO, R.; SUPKO, J.G. Current Perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptotecins. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 641-661, 2002.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1796, p. 293-308, 2009.

GEISSMAN, T.A. New Substances of Plant Origin. **Annual Review of Pharmacology**, v. 4, p. 305-316, 1964.

GITTER, S. et al. Studies on the antitumor effect of cucurbitacins. **Cancer Research**, v. 21, p. 516-521, 1961.

GRIDELLI, C. et al. Non-small cell lung cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1-16, 2015.

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, p. 679-695, 2006.

HAN, S.W.; ROMAN, J. Targeting apoptotic signaling pathways in human lung cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 10, p. 566-574, 2010.

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

HARITUNIANS, T. et al. Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 32, p. 1366-1373, 2008.

HAUBNER, R.; DECRISTOFORO, C. Radiotracer II: peptide-based radiopharmaceuticals. In: **Small Animal Imaging: basics and practical guide**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2011. Part 3, p. 247-266.

HEAVEY, S.; O'BYRNE, K.J.; GATELY, K. Strategies for co-targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in NSCLC. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 3, p. 445-456, 2014.

HEJMADI, M. **Introduction to cancer biology**. Momma Hejmadi & Ventus Publishing: Aps, 2010, p.46.

HIGGINS, L. J.; POMPER, M. G. The evolution of imaging in cancer: current state and future challenges. **Seminars in Oncology**, v. 38, p. 3-15, 2011.

HSIEH, T.C. et al. AKT/mTOR as Novel Targets of Polyphenol Piceatannol Possibly Contributing to Inhibition of Proliferation of Cultured Prostate Cancer Cells. **ISRN Urology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

HSU, H.S. et al. Cucurbitacin I inhibits tumorigenic ability and enhances radiochemosensitivity in non-small cell lung cancer- derived CD133-positive cells. **Cancer**, v.117, p. 2970-2985, 2011.

INDRAN, I. R. et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1807, p. 735-45, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Condutas do INCA: Carcinoma de pulmão de células não-pequenas. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_48/v04/pdf/condutas.pdf>. Acesso em setembro de 2014.

INSTITIUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>>. Acesso em novembro de 2015.

ISHDORJ, G.; JOHNSTON, J.B.; GIBSON, S.B. Inhibition of constitutive activation of STAT3 by cucurbitacin-I-(JSI-124) sensitized human B-leukemia cells to apoptosis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, p. 3302-3314, 2010.

ISHII, T. et al. Cucurbitacin D induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. **Tumor Biology**, v. 34, p. 285-291, 2013.

IWANSKI, G.B. et al. Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 4, p. 998-1007, 2010.

JABOIN, J. J.; HWANG, M.; LU, B. Autophagy in Lung Cancer. **Methods in Enzymology**, v. 453, p. 287-304, 2009.

JOHNSON, G.L.; DOHLMAN, H.G.; GRAVES, L.M. MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 325-331, 2005.

JOHNSON, D.H.; SCHILLER, J.H. Recent clinical advances in lung cancer management. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 10, p. 973-982, 2014.

JONES, A. G. Technetium in nuclear medicine. **Radiochimica Acta**, v. 70-71, p. 289-297, 1995.

JORDAN, M.A.; KAMATH, K. How do Microtubule-targeted drugs work: An overview. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 730-742, 2007.

JUNG, J. Human tumor xenograft models for preclinical assesment of anticancer drug development. **Toxicological Research**, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2014.

KATSUYA, T.; SATOSHI, F.; HIROYASU, E. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. **Cancer Letters**, v. 278, n. 2, p. 130-138, 2009.

KAUSAR, H. et al. Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: Identification of intracellular thiols as critical targets. **Cancer Letters**, v. 332, p. 35-45, 2013.

KELLAR, A.; EGAN, C.; MORRIS, D. Preclinical murine models for lung cancer: Clinical trial applications. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-17, 2015.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 221-237, 2011.

KONGTUN, S. et al. Cytotoxic properties of root extract and fruit juice of *Trichosanthes cucumerina*. **Planta Medica**, v. 75, p. 839-842, 2009.

KONG, Y. et al. Cucurbitacin E induces cell cycle G2/M phase arrest and apoptosis in triple negative breast cancer. **Plos One**, v. 9, p. 1-8, 2014.

KONOPA, J.; ZIELINSKI, J.; MATUSZKIEWICZ, A. Cucurbitacins, cytotoxic and antitumor substances from *Bryonia alba* L. I: Isolation and identification. **Arzneimittelforschung**, v. 24, p. 1554-1557, 1974.

KUBOTA, K. From tumor biology to clinical PET: A review of positron emission tomography (PET) in oncology. **Annals of Nuclear Medicine**, v. 15, n. 6, p. 471-486, 2001.

LANG, K.L. et al. New cytotoxic cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Planta Medica**, v. 77, p. 1648-1651, 2011.

LANG, K.L. et al. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 3016-3030, 2012.

LANG, K.L. et al. Multivariate SAR and QSAR of cucurbitacin derivatives as cytotoxic compounds in a human lung adenocarcinoma cell line. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 48, p. 70-79, 2014.

LEE, D.H.; IWANSKI, G.B.; THOENNISSSEN, N.H. Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. **The Scientific World Journal**, v. 10, p. 413-418, 2010.

LEE, D.H. et al. Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma. **Cancer Letters**, v. 306, p. 161-170, 2011.

LIN, S.Y. et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. **Nature Cell Biology**, v. 3, p.802-808, 2001.

LIU, T. et al. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, p. 15-22, 2010.

LÓPEZ-GÓMEZ, M. et al. Cancer in developing countries: The next most preventable pandemic. The global problem of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, p. 117-22, 2013.

LORIN, S. et al. Autophagy regulation and its role in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 23, p. 361-379, 2013.

LU, P.; YU, B.; XU, J. Cucurbitacin B regulates immature myeloid cell differentiation and enhances antitumor immunity in patients with lung cancer. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 27, p. 495-503, 2012.

LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION. Disponível em: <https://www.lungcancerresearchfoundation.org/lung_cancer_facts.htm>. Acesso em novembro de 2015.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, p. 823-837, 2009.

MANSI, R. et al. Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 38, p. 97-107, 2011.

MAROSTICA, L.L. et al. Synergistic antiproliferative effects of a new cucurbitacin B derivative and chemotherapy drugs on lung cancer cell line A549. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, p. 1949-1960, 2015.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiologia Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 233–239, 2001.

MATOS, F.J.; GOTTLIEB, O.R. Isocucurbitacina B, constituinte citotóxico de *Luffa operculata*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 39, p. 245-247, 1967.

MCCUBREY, J.A. et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance. **Oncotarget**, v. 3, p. 1068-1111, 2012.

MIRÓ, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 159-168, 1995.

MORO, M. et al. Patient-derived xenografts of Non small cell lung cancer: Resurgence of an old model for investigation of modern concepts of tailored therapy and cancer stem cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

NATALE, R.B. et al. Vandetanib versus gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer: results from a two part , double-bind, randomized phase ii study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 15, p. 2523-2529, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NOWOTNIK, D. P. **Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals**. In: Textbook of radiopharmacy theory and practice. v. 3, p. 53–72. ed. Gordon and Breach Science Publishers S.A. 1990.

OIZUMI, S. et al. Quality of life with gefitinib in patients with EGFR-mutated non-small cell lung cancer: quality of life analysis of North East Japan Study Group 002 Trial. **Oncologist**, v. 17, n. 6, p. 863-870, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), **Câncer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: Outubro de 2015.

ORLIKOVA, B.; DICATO, M.; DIEDERICH, M.. 1,000 Ways to die: natural compounds modulate non-canonical cell death pathways in cancer cells. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 277-293, 2013.

OVERALL, C. M.; KLEIFELD, O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 227-239, 2006.

PEINADO, H. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 883-891, 2012.

PREMSRIRUT, P.K. et al. A rapid and scalable system for studying gene function in mice using conditional RNA interference. **Cell**, v. 145, n. 1, p. 145-158, 2011.

PROMKAN, M. et al. The effectiveness of cucurbitacin B in BRCA1 defective breast cancer cells. **Plos One**, v. 8, p. 1-14, 2013.

RAMALHETE, C. et al. New potent P-glycoprotein modulators with the cucurbitane scaffold and their synergistic interaction with doxorubicin on resistant cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 6942-6951, 2009.

REHM, S. et al. Bitter principles of the cucurbitaceae. VII.-the distribution of bitter principles in this plant family. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, p. 679-686, 1957.

RÍOS, J.L.; ESCANDELL, J.M.; RECIO, M.C. New insights into the bioactivity of cucurbitacins. In: RAHMAN, A.U. (Ed.) **Studies In Natural Products Chemistry**, 32. Amsterdam: Elsevier, 2005. P. 429-469.

RÍOS, J.L. et al. Cucurbitacins as inducers of cell death and a rich source of potential anticancer compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 1663-1676, 2012.

ROBERT, J. Biologie de la métastase. **Bulletin du Cancer**, v. 100, p. 333-342, 2013.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 698-699, 1965.

RUGGERI, B.A.; CAMP, F.; MIKNYOCZKI, S. Animals models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, p. 150-161, 2014.

SADZUKA, Y.; HATAKEYAMA, H.; SONOBE, T. Enhancement of doxorubicin concentration in the M5076 ovarian sarcoma cells by cucurbitacin E co-treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 186-191, 2010.

SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 5th ed. New York: Springer-Verlag, 2004.

SANDLER, A. et al. Paclitaxel-Carboplatin alone or with Bevacizumab for non-small cell lung cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 24, p. 2542-2550, 2006.

SANTOS-CUEVAS, C. L. et al. Design, preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation of ^{99m}Tc-N2S2-Tat(49-57)-bombesin: A target-specific hybrid radiopharmaceutical. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 375, p. 75-83, 2009.

SARKER, S.D. et al. Ecdysteroid antagonists (cucurbitacins) from *Physocarpus opulifolius* (rosaceae). **Phytochemistry**, v. 50, p. 1123-1128, 1999.

SARKAR, F. H. et al. Cellular signaling perturbation by natural products. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 11, p. 1541-1547, 2009.

SCHENKEL, E.P. et al. Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1329-1333, 1992.

SCHOTTELIUS, M.; WESTER, H. J. Molecular imaging targeting peptide receptors. **Methods**, v. 48, p. 161-177, 2009.

SHIVAPURKAR, N. et al. Apoptosis and lung cancer: a review. **Journal of Cellular and Biochemistry**, v. 88, p. 885-898, 2003.

SILVA, I.T. et al. Proliferative inhibition and apoptotic mechanism on human non-small cell lung cancer (A549 cells) of a novel Cucurbitacin from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **International Journal of Cancer Research**, v. 9, p. 54-68, 2013.

SILVA, I.T. et al. In vitro and in vivo antitumor activity of a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B. **Plos One**, v. 10, p. 1-19 2015.

SINGH, M.; JOHNSON, L. Using genetically engineered mouse models of cancer to aid drug development: An industry perspective. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 18, p. 5312-5328, 2006.

STALTERI, M. A. et al. Comparison of the Stability of Technetium-Labeled Peptides to Challenge with Cysteine. **Bioconjugate Chemistry**, v. 10, p. 130-136, 1999.

STEEG, P. S.; THEODORESCU, D. Metastasis : A Therapeutic target for cancer **Nature Clinical Practice Oncology**. v. 5, p. 206-219, 2008.

SU, M.; MEI, Y.; SINHA, S. Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. **Journal of Oncology**, v. 10, p. 1533-1541, 2013.

SUN, C. et al. Inhibitory effect of Cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 126, p. 603-610, 2010.

TAKAHASHI, N. et al. Cucurbitacin D isolated from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 508-513, 2009.

TAYLOR, B. S.; LADANYI, M. Clinical cancer genomics: how soon is now? **Journal of Pathology**, v. 223, p. 318-326, 2011.

TANNIN-SPITZ, T. et al. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 56-67, 2007.

THOENNISSSEN, N.H. et al. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. **Cancer Research**, v. 69, p. 5876-5884, 2009.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H.A. **Medicina Nuclear**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

UNNATI, S. et al. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, p. 16-23, 2013.

VALENTE, L.M.M. et al. New Norcucurbitacin and Heptanorcucurbitacin Glucosides from *Fevillea trilobata*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1772-1778, 1993.

VAPORCIYAN, A. A. et al. Cancer of the Lung. In: BAST, R. et al. (Eds). **Holland-Frei Cancer Medicine**. 5. Ed. BC Decker, 2000.

WALL, M.E et al. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumour inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal Of American Chemical Society**, v. 88, p. 3888-3890, 1966.

WANG, S. et al. Fighting fire with fire: poisonous Chinese herbal medicine for cancer therapy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 33-45, 2012.

WEBER, C. E.; KUO, P. C. The tumor microenvironment. **Surgical Oncology**, v. 21, p. 172-177, 2012.

WEINER, R. E.; THAKUR, M. L. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 57, p. 749-763, 2002.

YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, p. 559-564, 2005.

YANG, D. J. et al. Imaging with ^{99m}Tc-ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. **Radiology**, p. 465-473, 2003.

YANG, L. et al. 23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). **Cancer Letters**, v. 256, p. 267-278, 2007.

YANG, Z. J. et al. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, p. 1533-1541, 2011.

YANG, J.C-H. et al. Symptom Control and Quality of Life in LUX-Lung 3: A Phase III Study of Afatinib or Cisplatin/Pemetrexed in Patients With Advanced Lung Adenocarcinoma With *EGFR* Mutations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, p. 1-13, 2013.

YASUDA, S. et al. Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 559-565, 2010.

YIN, D. et al. Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 1364-1375, 2008.

YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 41-51, 2007.

YU, H. et al. Revisiting STAT3 signaling in cancer: new and unexpected biological functions. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, p. 736-746, 2014.

ZHANG, M. et al. Inhibition of pancreatic cancer cell growth by Cucurbitacin B through modulation of signal transducer and activator of transcription signaling. **Pancreas**, v. 39, p. 923-929, 2010.

ZHANG, Y. et al. Cucurbitacin B induces rapid depletion of the G-actin pool through reactive oxygen species-dependent actin aggregation in melanoma cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 43, p. 556-567, 2011.

ZHANG, T. et al. Cucurbitacin E inhibits breast tumor metastasis by suppressing cell migration and invasion. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 135, p. 445-458, 2012.

ZHOU, Y. et al. Chimeric mouse tumor models reveal differences in pathway activation between ERBB family – and KRAS- dependent lung adenocarcinomas. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 71-78, 2010.

ZHOU, S. et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? **Cancer Letters**, v. 323, p. 115-127, 2012.

ZIEGLER, D. S.; KUNG, A. L.; KIERAN, M. W. Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 493-500, 2008.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos citotóxicos e antitumorais de esquemas de tratamentos combinados da DACE com fármacos antineoplásicos (cisplatina, irinotecano e paclitaxel), respectivamente, em modelos *in vitro* e *in vivo* de tumor de pulmão humano do tipo células não pequenas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos antiproliferativos e de morte celular da DACE combinada com cisplatina, irinotecano ou paclitaxel, frente às células A549;
- Investigar e propor os mecanismos moleculares de ação das combinações testadas frente às células A549, e selecionar a combinação mais ativa para o posterior estudo *in vivo*;
- Desenvolver um modelo xenográfico de tumor de pulmão com as células A549, em camundongos da linhagem Balb/c nudes;
- Estabelecer um método para detectar o tumor xenográfico de pulmão formado por cintilografia, empregando o radioisótopo Tecnécio-99m conjugado com bombesina como agente de imagem;
- Avaliar o efeito antitumoral do tratamento combinado previamente selecionado, no modelo xenográfico de tumor de pulmão desenvolvido;
- Analisar os efeitos de toxicidade subcrônica em diferentes tecidos e em diferentes parâmetros bioquímicos induzidos pelos tratamentos nos animais.

CAPÍTULO II

ARTIGO I PUBLICADO

EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS E SINÉRGICOS DE
UM DERIVADO SEMISSINTÉTICO DA
CUCURBITACINA **B** COM FÁRMACOS
ANTINEOPLÁSICOS EM CÉLULAS **A549** DE
TUMOR DE PULMÃO

CAPÍTULO II – EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS E SINÉRGICOS DE UM DERIVADO SEMISSINTÉTICO DA CUCURBITACINA B COM FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EM CÉLULAS A549 DE TUMOR DE PULMÃO

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo estão compilados, na forma de um manuscrito já publicado no periódico *Chemical Research In Toxicology*, os resultados referentes ao estudo dos efeitos antiproliferativos de tratamentos combinados da DACE com os fármacos cisplatina, irinotecano ou paclitaxel, frente às células tumorais de pulmão humano do tipo células não pequenas (células A549). Nesta etapa, também foi investigado o possível mecanismo de ação antiproliferativa e de morte celular induzida pelos tratamentos.

**Chemical
Research in
Toxicology**

Article

pubs.acs.org/ct

Synergistic Antiproliferative Effects of a New Cucurbitacin B Derivative and Chemotherapy Drugs on Lung Cancer Cell Line A549

Lucas Lourenço Marostica,[†] Izabella Thais Silva,[†] Jadel Müller Kratz,[†] Lara Persich,[†] Fabiana Cristina Geller,[‡] Karen Luise Lang,[‡] Miguel Soriano Balparda Caro,[‡] Fernando Javier Durán,[§] Eloir Paulo Schenkel,[†] and Cláudia Maria Oliveira Simões^{*†}

[†]Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

[‡]Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

[§]UMYMFOR-CONICET, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

ABSTRACT: Nonsmall cell lung cancer (NSCLC) represents an important cause of mortality worldwide due to its aggressiveness and growing resistance to currently available therapy. Cucurbitacins have emerged as novel potential anticancer agents showing strong antiproliferative effects and can be promising candidates for combined treatments with clinically used anticancer agents. This study investigates the synergistic antiproliferative effects of a new semisynthetic derivative of cucurbitacin B (DACE) with three chemotherapy drugs: cisplatin (CIS), irinotecan (IRI), and paclitaxel (PAC) on A549 cells. The most effective combinations were selected for studies of the mechanism of action. Using an *in silico* tool, DACE seems to act by a different mechanism of action when compared with that of different classes of drugs already used in clinical settings. DACE also showed potent synergic effects with drugs, and the most potent combinations induced G2/M cell cycle arrest by modulating survivin and p53 expression, disruption of F-actin cytoskeleton, and cell death by apoptosis. These treatments completely inhibited the clonogenic potential and did not reduce the proliferation of nontumoral lung cells (MRC-5). DACE also showed relevant antimigratory and anti-invasive effects, and combined treatments modulated cell migration signaling pathways evolved with metastasis progression. The effects of DACE associated with drugs was potentiated by the oxidant agent L-buthionine-sulfoximine (BSO), and attenuated by N-acetylcysteine (NAC), an antioxidant agent. The antiproliferative effects induced by combined treatments were attenuated by a pan-caspase inhibitor, indicating that the effects of these treatments are dependent on caspase activity. Our data highlight the therapeutic potential of DACE used in combination with known chemotherapy drugs and offer important insights for the development of more effective and selective therapies against lung cancer.

2. ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO *CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY*

Synergistic antiproliferative effects of a new cucurbitacin B derivative and chemotherapy drugs on lung cancer cell line A549

*Lucas Lourenço Marostica†, Izabella Thais Silva†, Jadel Müller Kratz†, Lara Persich†, Fabiana Cristina Geller†, Karen Luise Lang†, Miguel Soriano Balparda Caro‡, Fernando Javier Durán§, Eloir Paulo Schenkel†, Cláudia Maria Oliveira Simões†**

†Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis SC, Brazil

‡Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis SC, Brazil

§UMYMFOR-CONICET, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

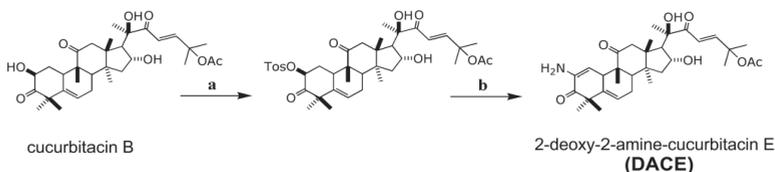
ABSTRACT: Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents an important cause of mortality worldwide due to its aggressiveness and growing resistance to currently available therapy. Cucurbitacins have emerged as novel potential anticancer agents showing strong antiproliferative effects and can be promising candidates for combined treatments with clinically used anticancer agents. This study investigates the synergistic antiproliferative effects of a new semisynthetic derivative of cucurbitacin B (DACE) with three chemotherapy drugs: cisplatin (CIS), irinotecan (IRI) and paclitaxel (PAC) on A549 cells. The most effective combinations were selected for studies of the mechanism of action. Using an *in silico* tool, DACE seems to act by a different mechanism of action when compared with different classes of drugs already used in clinical. DACE also showed potent synergic effects with drugs and the most potent combinations induced G2/M cell cycle arrest by modulating survivin and p53 expression, disruption of F-actin cytoskeleton and cell death by apoptosis. These treatments completely inhibited clonogenic potential and did not reduce the proliferation of non-tumoral lung cells (MRC-5). DACE also showed relevant anti-migratory and anti-invasive effects, and combined treatments modulated cell migration signaling pathways evolved with metastasis progression. The effects of DACE associated with drugs was potentiated by the oxidant agent L-buthionine-sulfoximine (BSO), and attenuated by N-acetylcysteine (NAC), an antioxidant agent. The antiproliferative effects induced by combined treatments were attenuated by a pan-caspase inhibitor, indicating that the effects of these treatments are dependent of caspase activity. Our data highlight the therapeutic potential of DACE used in combination with known chemotherapy drugs and offer important insights for the development of more effective and selective therapies against lung cancer.

KEYWORDS: cucurbitacin B derivative; antiproliferative effects; synergism; lung cancer; metastasis; apoptosis.

INTRODUCTION

Among the different types of cancer, lung cancer is a leading cause of cancer-related mortality worldwide, with a poor 5-year survival rate. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the cause of nearly 85% of all lung cancers, comprising squamous cell carcinoma, large cell carcinoma, adenocarcinoma, and bronchioloalveolar carcinoma. In recent years, there has been important progress in the understanding of the biological characteristics of NSCLC, and these studies support the development of new therapeutic strategies.¹ A review of cancer statistics estimated that lung cancer will be the leading cause of new diagnostics and cancer-related mortality, in 2015.² Therefore, many patients present recurrent disease due to drug resistance,³ which highlights the importance of new anticancer agents that can replace and/or supplement the therapeutic options currently available.

Cucurbitacins are a group of tetracyclic triterpenoid molecules, which showed potent antiproliferative activity against many different human cancer cell lines. For this reason, there is growing interest in their use as new anticancer agents. Cucurbitacin B is one of the most abundant and widely studied members of this group.^{4,5} Recently, a novel cucurbitacin B semisynthetic derivative (DACE) (Figure 1) was investigated by our research group, and showed potent antiproliferative activity against non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo* a mouse model of lung cancer.⁶ Other cucurbitacins with potential antiproliferative effects have also been described by our research group.⁶⁻¹⁰ As described by Silva et al.,⁶ DACE presents advantages from the chemical synthesis perspective when compared with the precursor cucurbitacin B. The semisynthesis process is simple, short and might represent a new route to generate new anticancer compounds. In addition, the *in vitro* and *in vivo* results obtained with DACE⁶ validated the pharmacophore model of a previous QSAR study published by our research group.⁹



Reagents and conditions: a) 4-toluenesulfonyl chloride, DABCO, DCM, 0°C; b) NaN₃, DMF, 70°C

Figure 1. Reagents, conditions and synthesis of DACE.⁶

The potential synergism between new compounds and chemotherapy drugs represents an interesting strategy for the treatment of different types of cancer. The combination of antiproliferative agents can potentiate the therapeutic effects, reduce the dose, and consequently, the toxicity, and minimize or delay cases of drug resistance. These effects are primarily obtained when drugs with different mechanisms of action are combined.¹¹⁻²¹ For example, the synergistic effects of cucurbitacin B with chemotherapeutic agents for breast cancer^{18,20} and medulloblastoma,¹⁹ among other various tumor types¹¹⁻¹⁴ have been described.

In this study, we investigate the antiproliferative effect of DACE in different cancer cell lines. After this screening, A549 cells were selected to investigate the synergistic antiproliferative effects of DACE combined with CIS, IRI or PAC on the non-small cell lung cancer cell line (A549). The possible mechanism of action suggested for the most effective synergic combinations was also investigated, using a systematic collection of assays.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines. Human non-small-cell lung cancer (A549), Human rhabdomyosarcoma cells (RD), Prostate cancer cells (LNCaP) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA). Human fetal lung fibroblast cells (MRC-5) were obtained from European Collection of Cell Cultures (Porton Down, WI, England). Human ileocecal adenocarcinoma cells (HCT8) were obtained from Adolfo Lutz Institute (São Paulo, SP, Brazil). A549 and RD cells were cultured in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum. LNCap and HCT8 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. MRC-5 cells were cultured in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1 mM of glutamine and 1% of non-essential amino acids. Both cell lines were cultured in a humidified incubator with 5% CO₂ atmosphere at 37°C, and were routinely screened for the presence of potential contaminants, including mycoplasma.

Drugs and inhibitors. DACE was synthesized from cucurbitacin B.⁶ CIS, IRI, PAC, and camptotecin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). DACE and drugs were diluted in DMSO, stored at -20°C, and prepared extemporarily in MEM.

Cell proliferation assay. The antiproliferative effects were determined by sulforhodamine B assay, based on the measurement of cellular protein content as previously described.²² Cells were treated with

different concentrations of DACE, CIS, IRI and PAC, for 48 h. The inhibitory concentration (IC_{50}) was defined as the concentration that inhibited cell proliferation by 50% when compared to untreated controls.

ChemGPS-NP *in silico* analyses. A PCA-based model called ChemGPS-NP (<http://chemgps.bmc.uu.se>) has recently been shown to be useful for differentiating biological activities and mapping chemical compounds for prediction of anticancer mode of action.^{23,24} It is basically a tool for navigation in the biologically relevant chemical space. Compounds with unknown modes of action are positioned on this “map” using the projections of eight principal components (PC; dimensions) derived from 35 molecular descriptors of physicochemical properties of a reference set of compounds with known modes of action. The resulting cluster pattern can provide valuable information on the structural and biological properties of the compounds.

In our study, descriptors were calculated for DACE using the software DRAGON Professional (Talet srl, Italy), based on structure information provided as simplified molecular-input line-entry specification (SMILES). The compound was then mapped onto ChemGPS-NP together with the NCI (National Cancer Institute) reference set of known anticancer agents (http://dtp.nci.nih.gov/docs/cancer/searches/standard_mechanism.html). Compounds in the reference anticancer datasets were classified according to the following mode of action classes: DNA/RNA antimetabolites, alkylating agents, topoisomerase inhibitors, and tubulin agents. Principal component analysis and PCA score prediction were performed using SIMCA P+ 11.5 software (Umetrics AB, Malmo, Sweden). All data were centered and scaled to unit variance.

Synergism analyses. A549 cells were treated with each drug alone or in combination with DACE, at fixed ratios, equivalent to the respective IC_{50} values (i.e. at $IC_{50} \times 0.25$, $\times 0.5$, $\times 1$, $\times 2$, and $\times 4$) for 48 h. Cell proliferation was then determined by the sulforhodamine B assay, as previously described.²² The degrees of interaction between DACE and CIS, IRI or PAC were calculated through the combination index (CI) equation, based on the median-effect principle of the mass-action law, using the software Calcsyn (version 2.1, Biosoft®). According to the CI theorem, CI values <1 , $=1$, and >1 indicate synergism, additive effect, and antagonism, as described.²⁵

Influence of intracellular reactive oxygen species on cell proliferation. The influence of ROS (reactive oxygen species) on the antiproliferative effects induced by different combinations of drugs and

DACE was investigated by the sulforhodamine B assay, in the presence of N-acetylcysteine (NAC) (Sigma, St. Louis, USA) or L-buthionine-sulfoximine (BSO) (Sigma, St. Louis, USA), antioxidant and oxidant agents, respectively. Briefly, cells were treated with different concentrations of DACE, CIS, IRI, and PAC, alone and their combinations, in the absence and presence of NAC (500 μ M) or BSO (10 μ M), for 48 h. Next, cell proliferation was determined as described for the standard sulforhodamine B assay.²²

Clonogenic assay. This assay was performed according to the protocol previously described.²⁶ A549 cells (5×10^2 cells/well) were seeded in six well plates and incubated at 37 °C for 24 h. Thereafter, the treatments with both DACE and their combinations with drugs were performed for 48 h. The medium was removed and each well received fresh medium supplemented with 10% FBS for 10 days. After this period, the colonies were stained with crystal violet and counted using a stereomicroscope (Olympus Company, Center Valley, USA).

Cell cycle analyses by flow cytometry. A549 cells were treated with each drug alone or in combination with DACE, for 48 h, and their effects on cell cycle were evaluated by propidium iodide staining, as previously described.²⁷ Flow cytometry analyses were performed on a FACS Canto II cytometer (BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) and the events were acquired for each group. The percentages of cells in each phase of the cell cycle were determined using the software Flowing 2.5.0 (University of Turku, Finland).

Apoptosis analyses by flow cytometry. A549 cells were treated with each drug alone or in combination with DACE, for 24 h, and then subjected to the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma, St. Louis, USA). Data were obtained with a FACS Canto II cytometer and analyses were performed using the Flowing 2.5.0 Software. Camptotecin (10 μ M) (Sigma, St. Louis, USA) was used as positive control for apoptosis; and two freezing (-80°C)/defrosting (56°C) cycles were used as necrosis control.

Influence of caspase inhibition on cell proliferation. The influence of caspase inhibition on the effects of DACE and their combinations with drugs was evaluated by a sulforhodamine B assay. The cells were previous treated for 1 h with a Z-VAD-FMK pan-caspase inhibitor (50 μ M) (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) and with different concentrations of DACE, CIS, IRI, and PAC, alone and their combinations, in the absence and presence of Z-VAD-FMK pan-caspase inhibitor (50 μ M). Next, cell proliferation was determined as described for the sulforhodamine B assay.²²

Cytoskeletal and nuclei staining. A549 cells were plated in eight-well slide chambers and treated with each drug alone or in combination, for 24 h. After treatment, cells were incubated with TRITC-labeled-phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, USA) for F-actin staining, and with Hoechst staining (Invitrogen, Carlsbad, USA) to detect nuclei. Fluorescence microscopic images were obtained with a BX-41 microscope (Olympus Company, Center Valley, USA).

Scratch assay. A549 cell monolayers were scraped in a straight line to create a scratch with a sterilized pipet tip. Scratched monolayers were then treated with DACE at 0.5 and 1.0 μM , and 0.5% DMSO and PAC (at 0.1 and 1 μM) as controls, and incubated for 16 h. Images were obtained with a BX-41 fluorescence microscope, and cell migration inhibition quantification was performed using the CellC software (Cell C, Berlin, Germany), as previously described.²⁸

Invasion assay. The anti-invasive capacity was evaluated by cell migration through Transwell[®] inserts (8 μm pore size polycarbonate membrane Millipore Corporation, Darmstadt, Germany) coated with Matrigel[®]. A549 cells were seeded in the apical compartment, and the basolateral chamber received serum-free MEM. Afterward, the upper chambers were treated with DACE (at 0.5 and 1 μM), DMSO (0.5%), and PAC (at 0.1 and 1 μM) as controls. The basolateral compartment received MEM containing 10% FBS. The experiment was incubated for 48 h. Finally, cells were fixed with paraformaldehyde and stained with DAPI for 15 min. Images were obtained with a BX-41 fluorescence microscope, and cell invasion inhibition quantification was performed using the CellC software as previously described.²⁸

Western blotting. A549 cells were treated with each drug alone or in combination with DACE, for 48 h. Cell lysates were obtained after lysis with RIPA buffer containing proteinases and phosphatases inhibitors (25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 1% NP40, 2 mM EDTA (pH 8.0), 5 mg/mL leupeptin, 5 mg/mL aprotinin, 0.2 mM pefablock, 1mM sodium vanadate, and 5 mM benzamidine) (Sigma, St. Louis, USA), cleared by centrifugation, and equal amounts of total protein lysates were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and blotted on nitrocellulose membranes (Millipore Corporation, Darmstadt, Germany). After blocking with 5% milk solution, the membranes were incubated overnight with the following primary antibodies: phospho-cofilin1; p53; phospho-FAK; survivin; E-cadherin; MMP2; MMP9; phospho-AKT and phospho-STAT3, all purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, USA). After incubation with the corresponding

secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, protein bands were revealed by Pierce ECL substrate (Thermo Scientific, San Jose, USA), according to the manufacturer's instructions. Gel images were obtained with the Molecular Imager[®] Gel Doc XR System (Bio-Rad, California, USA). Beta-actin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as loading control. The total band densities were measured against the local background and normalized to the density of the appropriate Beta-actin loading control bands.

Statistical analyses. The results were expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. GraphPad Prism 5 Software (GraphPad, San Diego, USA) was used to calculate the IC₅₀ values and their 95% confidence intervals through a nonlinear fit-curve (log of compound concentration *versus* normalized response-variable slope). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA followed by Tukey's post hoc test). P values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

DACE is a novel molecule and recently its mechanism of action was reported for the first time by our colleagues.⁶ Since the antiproliferative effects of DACE were described only in A549 cells, we decided to screen it against four different tumor cell lines from distinct origins. Initially, we explored the effects of DACE on proliferation of different cancer cell lines, using the sulforhodamine B assay. As shown in Table 1, DACE showed antiproliferative effects against four different cancer cell lines. According to the ATCC[®] cell bank, these cells differ in origin and tissue disease, morphological characteristics, gene expression and specific receptors. Moreover, our colleagues⁶ also described that the treatment with DACE showed potential antiproliferative effects on A549 cells with overexpression of AKT, EGFR, v-RAF, and k-RAS genes. Taken together, these data indicate that the treatment with DACE is not specific for the A549 cell line. Since DACE was more effective in inhibiting A549 cells proliferation, we decided to study the synergism of this compound combined with drugs in these cells. As shown in Table 2, DACE and drugs demonstrated potent antiproliferative effects.

Table 1. Cell proliferation inhibition of DACE on different cancer cell lines

| Cell line | IC ₅₀ (μM) | 95% Confidence Interval |
|-----------|-----------------------|-------------------------|
| A549 | 0.24 | 0.16-0.31 |
| LNCaP | 0.36 | 0.29-0.43 |
| RD | 1.2 | 0.90-1.58 |
| HCT-8 | 2.1 | 1.27-3.62 |

IC₅₀: Concentration that inhibited cell proliferation by 50% when compared to untreated cells.

Table 2. Cell proliferation inhibition of DACE and chemotherapy drugs on A549 cells

| Compound | IC ₅₀ (μM) | 95% Confidence Interval |
|----------|-----------------------|-------------------------|
| DACE | 0.24 | 0.16-0.31 |
| CIS | 17.91 | 15.2-21.4 |
| IRI | 8.53 | 5.6-10.3 |
| PAC | 0.23 | 0.14-0.35 |

IC₅₀: Concentration that inhibited cell proliferation by 50% when compared to untreated cells.

Most protocols applied for the treatment of cancer include combination regimens of drugs with different mechanisms of action. The main advantages of this practice are that it enhances the effectiveness of the treatment, prevents the recurrence of resistant tumor cells, reduces the effective dose and systemic toxicity, and improves the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the drug. Lung cancer, in particular, usually presents metastatic evolution; therefore, it is likely that a single therapeutic target is insufficient to generate an effective clinical response. For example, drugs that inhibits the epidermal growth factor receptor (EGFR), a signaling pathway that is commonly deregulated in patients with lung cancer. Several EGFR inhibitors have been approved for the treatment of lung cancer; however, the efficacy of these drugs as monotherapy is limited. This suggests that monotherapies may be insufficient to achieve satisfactory clinical results, indicating that combined treatments using drugs with different mechanisms could be useful.^{3,29}

The ChemGPS-NP (Chemical Global Positioning System for Natural Products) is an *in silico* tool that has been used successfully to

categorize and predict the mechanisms of new and previously unstudied compounds.³⁰⁻³² It is based on principal component analysis (PCA) of physicochemical properties of known drugs. The approach of this model is based on the cornerstone of medicinal chemistry, i.e. that structurally similar molecules frequently present similar biological activities. As shown in Figure 2, when DACE scores were interpolated together with a reference set of anticancer drugs, this compound did not overlap with any of the well-known mode of action clusters. This result suggests that DACE may possess a distinct mode of action when compared with these drugs. In fact, this compound has previously been investigated by our group, and was found to induce cell apoptosis by interfering with EGFR activation and its downstream signaling.⁶ Thus, as DACE appears to present a different mode of action from those of some approved anticancer drugs, the evaluation of synergistic effects of this compound with selected anticancer drugs is highly desirable.

The next step was to evaluate the synergism between DACE and three drugs: CIS, IRI and PAC. As shown in Table 3, DACE showed potential synergistic effects with all studied drugs; however, the degree of synergism observed, as well as the concentration range of the combinations, were different for each treatment regimen. At half of the IC₅₀ value of DACE and drugs, individually and combined, were selected to studies of antiproliferative mechanism.

Table 3. Synergistic antiproliferative effects of the most effective combinations of DACE with selected chemotherapy drugs on A549 cells

| Tested combinations | Combination ratio | CI values | Effect |
|--|--------------------------|------------------|------------------|
| DACE (0.125 μ M) + CIS (9 μ M) | 0.5x IC ₅₀ | 0.251 | Strong synergism |
| DACE (0.125 μ M) + IRI (4.25 μ M) | 0.5x IC ₅₀ | 0.680 | Synergism |
| DACE (0.125 μ M) +PAC (0.125 μ M) | 0.5x IC ₅₀ | 0.202 | Strong synergism |

CI: Combinatorial index, based on analysis of concentration-response of combinations of each drug with DACE, which indicates the degree of interaction between compounds in terms of synergism, additive effect or antagonism.

Figures 3A, 3B and 3C show the synergic effects of DACE and CIS, IRI or PAC combinations on A549 proliferation, respectively. At 0.5x IC₅₀ treatments, the cell proliferation values of A549 cells treated for 48 h with DACE, CIS, and DACE plus CIS were 76.4%, 73.3% and 49%, respectively. When the cells were treated with DACE, IRI, and DACE plus IRI, cell proliferation values were 76.4%, 47.6% and 31.7%, respectively. When the cells were treated with DACE, PAC and DACE plus PAC, cell proliferation values were 76.4%, 42.3% and 32%, respectively. Several studies have reported the synergistic effects of cucurbitacin B and different chemotherapeutic agents, such as gemcitabine on pancreatic cancer cells,¹¹ and with CIS on laryngeal cancer cells¹² and cutaneous squamous cell carcinoma cells.¹³ These findings, together with our promising preliminary results, led us to further investigate the mechanism of action of DACE in combination with the selected drugs.

Previous studies have reported the influence of oxidative damage as mediators of antiproliferative effects exerted by cucurbitacins on different cell lines.^{33,34} To evaluate the influence of free radicals generation on the effects induced by DACE alone or combined with drugs, the experiments were carried out in the presence of an antioxidant agent (NAC 500 μM) and an oxidative damage potentiating agent (BSO 10 μM). When cells were treated with DACE combined with drugs in the presence of NAC (Figure 3D), the antiproliferative effects of the combinations were significantly reduced ($p < 0.0001$). Concerning the treatment of A549 cells with DACE alone and in combination with drugs, supplemented with BSO, the results showed a significant increase ($p < 0.0001$) in the antiproliferative effects of all treatments (Figure 3E). BSO is an agent that potentiates the oxidative damage through the inhibition of glutathione synthesis. Another study has demonstrated a similar effect for cucurbitacin B on different lung cancer cell lines, wherein the simultaneous treatment with cucurbitacin B and BSO or NAC exacerbated or attenuated their effects, respectively.³³ Guo and colleagues³⁴ also showed that cucurbitacin B causes G2/M cell cycle arrest in a ROS-dependent manner on human lung and breast cancer cells. The results obtained suggest that DACE combined with the selected drugs induced antiproliferative effects on A549 cells, in part, by increasing intracellular ROS production.

The clonogenic potential of A549 cells was also evaluated in this work, and the results are shown in Figure 4A and 4B. After two days of treatment and more eight days without treatments, cell colonies were stained and quantified in order to evaluate whether the previous

treatment with DACE and drugs alone, or with the selected combinations, allowed cells to resume their growth potential and acquire resistance to the respective treatments. After the treatment with drugs alone, cells restarted proliferation, suggesting a possible resistance to these drugs. In the group of untreated cells, 411 ± 16 colonies were counted, and when cells were treated with CIS, IRI and PAC, the numbers of cell colonies were 99 ± 1 , 170 ± 10 and 8 ± 1.6 , respectively, after eight days of incubation in the absence of drugs. Surprisingly, combinations of DACE with all drugs completely inhibited the resumption of cell proliferation, suggesting that these combinations are less likely to be affected by resistance. The potential of cucurbitacin B to partially inhibit the clonogenic growth of pancreas tumor cells, in a concentration dependent-manner, has been reported previously.¹¹ Previous studies also described that H460 lung cancer cells are also resistant after treatment with high concentrations of cisplatin.³⁵ A549 cells also demonstrated resistance after treatment with topotecan alone, that is a similar drug with irinotecan,³⁶ and after treatment with paclitaxel in high concentrations.³⁷ In this context, particularly, the present results for DACE in combination with CIS, IRI and PAC may be significant.

Most chemotherapy regimens currently used to treat cancer exert their effects by modulating cell cycle and inducing cell death by apoptosis. These cell processes were also evaluated in the present study through flow cytometry protocols. It is already known that cucurbitacin B inhibits proliferation of different cancer cells by inducing G2/M cell cycle arrest.^{11-13,18,38-42} In comparison with untreated control, a significant increase from 13.1 to 16.6%, to 43.2%; to 43.3% and to 43.4% ($p < 0.0001$) cells in G2/M phase was detected after the treatments with DACE, CIS, IRI and PAC, respectively. When DACE was combined with CIS, IRI or PAC, they also significantly increased the proportion of G2/M phase cells ($p < 0.0001$) when compared to the untreated controls, and the percentages of cells in this phase were of 47.8%, 45.5% and 48.1%, respectively. However, there is no statistical differences between the combined treatments and DACE or the drugs alone ($p > 0.05$). Notably, the combination of DACE with PAC increased the proportion of cells in Sub-G0/G1 phase, when compared to DACE alone and untreated control ($p < 0.01$), with cell percentages of 24.4%, 14.1 and 9.9% in SubG0/G1 phase, respectively.

Figure 4D shows the effects of drugs on DACE apoptosis induction. It was found that DACE and drugs, individually or combined, induced apoptosis on A549 cells when compared to the untreated controls.

Percentages of apoptotic cells after treatments with DACE alone or combined with CIS, IRI and PAC were 10.7%, 32.3%, 27.6% and 34.7%, respectively. However, combinations of drugs with DACE only significantly increased the proportion of apoptotic cells when compared with DACE alone or untreated control, not when compared with the respective drug alone. Thus, at the concentration ranges used, the effects of combined treatments regarding the G2/M cell cycle arresting and the apoptosis induction appear to be mainly due to the effects of the drugs individually.

In this view, we hypothesized that the higher antiproliferative activity of the combinations was indeed related to different mechanisms. Other prominent feature of cucurbitacins is the induction of rapid morphological alterations on tumor cells.^{43,44} Our data showed the treatments with the clinically used drugs alone did not induce changes in cytoskeletal morphology; however, treatments with DACE alone and in combination with drugs altered the organization of actin filaments on the cytoskeleton (Figure 5A). Combined treatments induced aggregation of F-actin and possibly disruption of the microtubule network. A previous study reported that cucurbitacin B caused morphological changes in the cytoskeleton of leukemic cells by inducing F-actin polymerization.⁴³ An additional study described the melanoma cell inhibitory effects of cucurbitacin I in interfering with the dynamic organization of actin filaments.⁴⁴ Similar results were reported by our research group recently.^{6,10} Our data demonstrate that the combined treatments prominently alter the cytoskeletal network of lung cancer cells, inducing rapid aggregation of the F-actin network. This effect may contribute to the antiproliferative action of these treatments, because the maintenance of homeostasis of the cytoskeleton is an important factor in the mitosis process.

Additionally, DACE alone and combined with CIS, IRI and PAC induced apoptosis features such as nuclear fragmentation (Figure 5B). These results indicate that the process of cell death induced by the combined treatments is at least in part due to apoptosis as revealed in the cell cycle arrest results. On the other hand, Zhang and colleagues⁴⁵ also reported that cucurbitacins I and B act as inducers of cell death by autophagy pathway. Park and coworkers⁴⁶ also demonstrated that the generation of ROS by sodium selenite induced apoptosis and autophagy simultaneously in A549 cells. However, the main cell death mechanism described for cucurbitacins is apoptosis induction.^{6,10,40,41} The antiproliferative effects of the combined treatments also were dependent of caspase activation, as show in the Figure 4E. The combined

treatments of DACE with CIS, IRI or PAC reduced cell proliferation to 28.8%, 14.8% and 17.4%, respectively. When A549 cells were exposed to the same treatments, in the presence of a caspase inhibitor (Z-VAD), the effect was significantly attenuated ($p < 0.0001$), and the cell proliferation was 69.4%, 76.3% and 91.5%, respectively. These results suggest that the combinations of DACE with CIS, IRI and PAC induce antiproliferative effects, caspase-dependent apoptosis and disruption of cytoskeletal network.

To check whether DACE and drugs, individually or in combination, result in improved selectivity, their effect was evaluated on MRC-5 cell proliferation. It has been a constant challenge to find ways to improve the selectivity of cucurbitacins towards tumor cells by structural changes in the cucurbitan skeleton.⁴⁷ Treatment with DACE and CIS did not reduce MRC5 cell proliferation when compared to the untreated controls (Figure 4F). Combined treatment with DACE and IRI or PAC revealed cell proliferation values of 70% and 80%, respectively. These results showed the combinations caused minimal effects on non-tumor lung cells, and reinforce the benefits of synergic treatments.

Cell adhesion molecules, named cadherins, have been highlighted as important regulators of tumor growth and metastasis. The loss of E-cadherin-mediated cell adhesion is a hallmark of the transition from a normal epithelium to the poorly-differentiated type of carcinoma.⁴⁸ In our study, we evaluated the modulation of E-cadherin through Western blotting (Figure 6D). The results showed that the treatments with DACE and drugs, alone and combined, maintained the expression of E-cadherin on A549 cells. This data suggest that the selected combinations reduced the possibility of cancer cells to migrate to other tissues and cause metastasis. In comparison with untreated control, DACE alone (0.5 and 1.0 μM) inhibited 77.2% and 90.5% of A549 cell migration, respectively, after 16 h of treatment (Figure 6A). PAC (0.1 and 1.0 μM) was used as control and inhibited 37.6% and 51.1% of cell migration, respectively. Similarly, PAC (0.1 and 1 μM) and DACE (0.5 and 1 μM) inhibited A549 cell invasion potential almost completely (Figure 6B). Other studies have described the ability of other cucurbitacins to suppress cell migration and invasion, significantly reducing the metastatic potential during cancer evolution.^{49,50}

The combined treatments investigated in this study also modulate the signaling pathways linked to cell migration processes. As shown in Figure 6D, DACE plus PAC reduced the phosphorylation of FAK, which is a kinase of focal adhesion, associated with cancer cell migration. Metalloproteinases proteins (MMP) are thought to play a

major role on cell behaviors, such as cell migration (adhesion/dispersion), differentiation, angiogenesis, and they are also essential to metastasis progression.⁵¹ All combinations of the selected drugs with DACE reduced MMP-2 expression, but only the combination of DACE with PAC reduced MMP-9 expression (Figure 6D). The modulation of these proteins partially explains the inhibitory effects of DACE on the cell migration and invasion assays (Figures 6A-B).

The actin cytoskeleton organization of cells is regulated by various proteins, such as cofilins, a type of actin-binding protein. This function is essential to the cell motility process, facilitating the evolution to metastasis. Overexpression of cofilin-1 has been associated with aggressiveness in several types of cancer, including non-small cell lung cancer.⁵² Our data also showed that treatment with DACE, in combination with the selected drugs, reduced the phosphorylation of cofilin-1 (Figure 6D). Nakashima and colleagues⁵³ also reported that cucurbitacin E inhibited cofilin phosphorylation in human leukemia cells. Zhang and colleagues also showed that cucurbitacin B reduced cofilin phosphorylation and induced actin-cofilin aggregation in melanoma cells.⁵⁴ These researchers also demonstrated that the pretreatment with NAC suppressed actin aggregation induced by cucurbitacin B. In our study, treatments with DACE, individually and combined with drugs, also induced cofilin-1 aggregation in A549 cells (data not shown) and correlated with data described by these authors. Taken together, these results suggest the combined treatments inhibit A549 cell migration and invasion by modulating metalloproteinases, E-cadherin and p-cofilin-1 expression, and disrupting actin cytoskeleton.

Other proteins involved in cell proliferation and apoptosis were also analyzed by Western blotting. As shown in Figure 6C, all combinations of DACE with the selected drugs reduced survivin expression, especially the combination with PAC. The combinations also increased p53 expression. Survivin is an anti-apoptotic protein and p53 protein acts during the suppression of tumor growth. These effects could explain the alterations observed during cell cycle progression, in which the treatments with DACE in combination with drugs induced G2/M phase arrest (Figure 4C). It was also reported that cucurbitacin E increased p53 expression in the human bladder cancer cell line.⁴¹ The Akt and Stat-3 pathways are key regulators of cell survival and proliferation, and their overexpression is commonly found in tumors.⁵⁵ Figure 6C shows that these signaling pathways were also modulated by the tested treatments and the synergic antiproliferative effects may be, at least in part, mediated via downregulation of STAT3 and Akt signaling

pathways. Combinations of DACE plus CIS or plus PAC reduced the phosphorylation of Akt, and all combinations down regulated p-STAT3 expression. Our colleagues⁶ showed that the treatment with DACE at 0.5 and 1 micromolar reduced the p-STAT3 expression in A549 cells. However, in the present study, DACE at 0.125 micromolar did not reduce p-STAT3 expression. Therefore, the reduction of the p-STAT3 expression mediated by DACE is probably concentration-dependent. Other studies also demonstrated that other cucurbitacins showed antiproliferative effects by inhibiting the STAT3^{6,11,41} and Akt pathways.^{6,10}

The main challenge for the cancer treatment remains the acquired resistance by tumor cells. This difficulty can be attenuated with combined therapies, which act by different pharmacological pathways, consequently increasing the efficacy and decreasing the resistance. Overexpression of AKT and STAT3 pathways promotes cell proliferation in an unlimited way⁵⁵ as well as misregulates metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 that are related to metastasis.⁵¹ In the present study, the combined treatments showed interesting antiproliferative effects mainly due to the downregulation of those pathways, which were dependent of ROS generation.

CONCLUSIONS

DACE showed important antiproliferative effects which were potentiated, when combined with chemotherapeutic drugs. To our knowledge, this is the first report to elucidate the mechanism of action of this new semisynthetic cucurbitacin B derivative combined with different chemotherapeutic drugs used to treat cancer. Our data indicated that the combinations of DACE with the selected drugs reduced the risk of resistance on A549 cells, and they did not affect the cell proliferation of non-tumoral lung cells (MRC-5). Combined treatments induced antiproliferative effects by G2M cell cycle arresting and downregulation of the STAT3 and Akt signaling pathways. Combined treatments also induced F-actin aggregation on cytoskeletal, nuclear fragmentation and cell death by apoptosis. DACE also showed relevant inhibitory effects on migration and invasion of lung cancer cells. Combined treatments reduced the phosphorylation of cofilin-1 and maintained the expression of E-cadherin on A549 cells reducing the risk of metastasis development. These effects can be explained by DACE likely mechanism of action is different from most other classes of anti-cancer drugs, according to the results obtained with the ChemGPS-NP *in silico* model. It is important to note that the treatment with DACE combined

with chemotherapies presented mechanism of action similar to that of its precursor cucurbitacin B. Despite this, the findings of this study offer important insights for the development of more effective and selective therapies against cancer, especially non-small cell lung cancer.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding author

*Cláudia M.O. Simões, Laboratório de Virologia Aplicada, UFSC, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, 88040-900, SC, Brazil Tel: +55 48 37215207.

Author contributions

KLL, MC, FJD and EPS were responsible for semisynthesis and supply of the new cucurbitacin B derivative (DACE). LLM, ITS, JMK, LP, FCG and CMOS made substantial contributions to design, acquisition of data, analysis and interpretation of the data, as well as in drafting the article or revising it critically for important intellectual content. All authors read and approved the final draft of the manuscript.

Funding

The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, MCTI, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, MEC, Brazil), Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC, State of Santa Catarina, Brazil), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, Argentina) and UBA (Universidad de Buenos Aires, Argentina) for financial support (grants number 472979/2001-6 and 2671/2012-9 from CNPq and PRONEX/FAPESC, respectively) as well as for their research fellowships.

Notes

The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

CIS, Cisplatin; IRI, Irinotecan; PAC, Paclitaxel; DACE, 2-deoxy-2-amine-cucurbitacin E; DMSO, Dimethylsulfoxide; NSCLC, Non-small cell lung cancer; NAC, N-acetylcystein; BSO, L-buthionine-sulfoximine; FACS, Fluorescence activated cell sorting system; ROS, Reactive

oxygen species; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; STAT3, Signal transducers and activators of transcription 3; PI, Propidium iodide; FITC, Fluorescein isothiocyanate; TRITC, Tetramethylrhodamine.

REFERENCES

- 1.Chen Z, Fillmore C.M., Hammerman P.S., Kim C.F., Wong K-K. (2014) Non-small cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat. Rev. Cancer* 14, 535-546.
- 2.1.1 Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2015) Cancer Statistics, 2015. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 5-29.
- 3.Koh P.K., Faivre-Finn C, Blackhall F.H., De Ruyscher D. (2012) Targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC): Clinical developments and rationale for the combination with thoracic radiotherapy. *Cancer Treat. Rev.* 38, 626-640.
- 4.Rfios I., Andújar J.M., Escandell R.M., Recio M.C. (2012) Cucurbitacins as inducers of cell death and a rich source of potential cancer compounds. *Curr. Pharm. Design* 18, 1663-1676.
- 5.Chen X., Bao J., Guo J., Ding Q., Lu J., Huang M., Wang Y. (2012) Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. *Anti-cancer Drug* 23, 777-787.
- 6.Silva I.T., Carvalho A., Lang K.L., Dudek S.E., Durán F.J., Caro M.S.B., Rapp U.R., Wixler V., Schenkel E.P., Simões C.M.O., Ludwig S. (2015) In vitro and in vivo antitumor activity of a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B. *Plos One* 10, 1-19.
- 7.Lang K.L., Guimarães T., Machado V.R., Zimmermann L., Silva I.T., Teixeira M.R., Durán F.J., Palermo J.A., Simões C.M.O., Caro M.B.C., Schenkel E.P. (2011) New cytotoxic cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Planta Med.* 77, 1648-1651.
- 8.Lang K., Silva I.T., Zimmermann L., Machado V.R., Teixeira M.R., Lapuh M.I., Galletti M.A., Palermo J.A., Cabrera G.M., Bernardes L.S.C., Simões C.M.O., Schenkel E.P., Caro M.S.B., Durán F.J. (2012) Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives. *Bioorgan. Med. Chem.* 20, 3016-3030.
- 9.Lang K.L., Silva I.T., Machado V.R., Zimmermann L., Caro M.S.B., Simões C.M.O., Schenkel E.P., Durán F.J., Bernardes L.S.C., Melo E.B. (2014) Multivariate SAR and QSAR of cucurbitacin derivatives as cytotoxic compounds in a human lung adenocarcinoma cell line. *J. Mol. Graph. Model.* 48, 70-79.
- 10.Silva I.T., Teixeira M.R., Lang K., Guimarães T.R., Dudek S.E., Durán F.J., Ludwig S., Caro M.S.B., Schenkel E.P., Simões C.M.O. (2013) Proliferative inhibition and apoptotic mechanism on human non-

small-cell lung cancer (A549 cells) of a novel cucurbitacin from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Int. J. Cancer Res.* 9, 54-68.

11.Thoennissen NH, Iwanski GB, Doan NB, Okamoto R, Lin P, Abbassi S, Song JH, Yin D, Toh M, Xie WD, Said JW, Koeffler P. (2009) Cucurbitacin B Induces Apoptosis by Inhibition of the JAK/STAT Pathway and Potentiates Antiproliferative Effects of Gemcitabine on Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res.* 69, 5876-5884.

12.Liu T., Peng H., Zhang M., Deng Y., Wu Z. (2010) Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *Eur. J. Pharmacol.* 641, 15-22.

13.Chen W., Leiter A., Yin D., Meiring M., Louw V., Koeffler H.P. (2010) Cucurbitacin B inhibits growth, arrest the cell cycle, and potentiates antiproliferative efficacy of cisplatin in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines. *Int. J. Oncol.* 37, 737-743.

14.Iwanski G.B., Lee D., En-Gal S., Doan N.B., Castor B., Vogt M., Toh M., Bokemeyer C., Said J.W., Thoennissen N.H., Koeffler P. (2010) Cucurbitacin B, a novel *in vivo* potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. *Brit. J. Pharmacol.* 160, 998-1007.

15.Martinelli E., Troiani T., Morgillo F., Rodolico G., Vitagliano D., Pia Morelli M., Tuccillo C., Vecchione L., Capasso A., Orditura M., De Vita F., Eckhardt S.G., Santoro M., Berrino L., Ciardiello F. (2010) Synergistic antitumor activity of Sorafenib in combination with Epidermal Growth Factor Receptor inhibitors in colorectal and lung cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 16, 4990-5001.

16.Li C.J., Chu C., Huang L., Wang M., Sheu L., Yeh J., Hsu H. (2012) Synergistic anticancer activity of triptolide combined with cisplatin enhances apoptosis in gastric cancer in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 319, 203-213.

17.Hatakeyama Y., Kobayashi K., Nagano T., Tamura D., Yamamoto M., Tachihara M., Kotani Y., Nishimura Y. (2013) Synergistic effects of pemetrexed and amrubicin in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Lett.* 343, 74-79.

18.Duangmano S., Sae-lim P., Suksamrarn A., Patmasiriwat P., Domman F.E. (2012) Cucurbitacin B causes increased radiation sensitivity of human breast cancer cells via G2/M cell cycle arrest. *J. Oncol.* 2012, 1-8.

19.Chang C-J., Chiang C-H., Song W-S., Tsai S-K., Woung L-C., Chang C-H., Jeng, S-Y., Tsay C-Y., Hsu C-C., Lee H-F., Huang, C-S., Yung M-C., Liu J-H., Lu K-H. (2012) Inhibition of phosphorylated

STAT3 by cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells. *Childs Nerv. Syst.* 28, 363-373.

20. Aribi A., Gery S., Lee D.H., Thoennissen N.H., Thoennissen G.B., Alvarez R., Ho Q., Lee K., Doan N.B., Chan K.T., Toh M., Said J.W., Koeffler H.P. (2012) The triterpenoid cucurbitacin B augments the antiproliferative activity of chemotherapy in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 132, 2730-2737.

21. Qu Y., Wu X., Yin Y., Yang Y., Ma D., Li H. (2014) Antitumor activity of selective MEK 1/2 inhibitor AZD6244 in combination with PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 in gefitinib-resistant NSCLC xenograft models. *J. Exp. Clin. Canc. Res.* 33, 1-10.

22. Vichai V., Kirtikara K. (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1, 1112-1116.

23. Larsson J., Gottfries J., Muresan S., Backlund A. (2007) ChemGPS-NP: Tuned for navigation in biologically relevant chemical space. *J. Nat. Prod.* 70, 789-794.

24. Felth J., Rickardson L., Rosén J., Wickstrom M., Fryknas M., Lindskog M., Bohlin L., Gullbo J. (2009) Cytotoxic Effects of Cardiac Glycosides in Colon Cancer Cells, Alone and in Combination with Standard Chemotherapeutic Drugs. *J. Nat. Prod.* 72, 1969-1974.

25. Chou T.C. (2006) Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol. Rev.* 58(3), 621-681.

26. Franken N.A.P., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., Van Bree C. (2006) Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat. Protoc.* 1, 2315-2319.

27. Riccardi C., Nicoletti I. (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* 1, 1458-1461.

28. Selinummi J., Seppala J., Yli-Harja O., Puhakka J.A. (2005) Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. *Biotechniques* 39, 859-862.

29. Custodio A., Méndez M., Provencio M. (2012) Targeted therapies for advanced non-small-cell lung cancer: current status and future implications. *Cancer Treat. Rev.* 38, 36-53.

30. Rosén J., Lövgren A., Kogej T., Muresan S., Gottfries J., Backlund A. (2009) ChemGPS NPWeb: chemical space navigation online. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 23, 253-259.

31. Rosén J., Rickardson L., Backlund A., Gullbo J., Bohlin L., Larsson R., Gottfries J. (2009) ChemGPS-NP mapping of chemical compounds for prediction of anticancer mode of action. *QSAR & Combinatorial Science* 28, 436-446.

- 32.Lee C., Lin Y., Chang F., Chen G., Backlund A., Yang J., Chen Y., Wu Y. (2012) Synthesis and biological evaluation of phenanthrenes as cytotoxic agents with pharmacophore modeling and ChemGPS-NP prediction as topo II inhibitors. *Plos One* 7, 1-14.
- 33.Kausar H., Munagala R., Bansal S.S., Aqil F., Vadhanan M.V., Gupta R.C. (2013) Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: Identification of intracellular thiols as critical targets. *Cancer Lett.* 332, 35-45.
- 34.Guo J., Wu G., Bao J., Hao W., Lu J., Chen X. (2014) Cucurbitacin B Induced ATM-Mediated DNA Damage Causes G2/M Cell Cycle Arrest in a ROS-Dependent Manner. *Plos One* 9, 1-12.
- 35.Andriani, F., Perego, P., Roz, L. (2006) Increased sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer cell lines after FHIT gene transfer. *Neoplasia* 8, 9-17.
- 36.Kaufmann, S.H., Peereboom, D., Buckwalter, C.A., Swingen, P.A., Grochow, L.B., Donehower, R.C., Rowinsky, E.K.(1996) Cytotoxic effects of topotecan combined with various anticancer agents in human cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 734-741.
- 37.Odonkor, C.A., Achilefu, S. (2008) Differential activity of caspase-3 regulates susceptibility of lung and breast tumor cell lines to paclitaxel. *Open Biochem. J.* 2, 121-128.
- 38.Zhu J.S., Ouyang D.Y., Shi Z.J., Xu L.H., Zhang Y.T., He X.H. (2012) Cucurbitacin B Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy Associated with G Actin Reduction and Persistent Activation of Cofilin in Jurkat Cells. *Pharmacology* 89, 248-356.
- 39.Duangmano S., Sae-lim P., Suksamrarn A., Patmasiriwat P., Domman F.E. (2012) Cucurbitacin B causes increased radiation sensitivity of human breast cancer cells via G2/M cell cycle arrest. *J. Oncol.* 2012, 1-8.
- 40.Yasuda S., Yogosawa S., Izutani Y., Nakamura Y., Watanabe H., Sakai T. (2012) Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. *Mol. Nut. Food Res.* 54, 559-565.
- 41.Huang W., Yang J., Lin M., Chen P., Chiou S., Chueh F., Lan Y., Pai S., Tsuzuki M., Ho W., Chung J. (2012) Cucurbitacin E Induces G2/M Phase Arrest through STAT3/p53/p21 Signaling and Provokes Apoptosis via Fas/CD95 and Mitochondria-Dependent Pathways in Human Bladder Cancer T24 Cells. *Evid-Based Compl. Alt.* 2012, 1-11.
- 42.Zhu J.S., Ouyang D.Y., Shi Z.J., Xu L.H., Zhang Y.T., He X.H. (2012) Cucurbitacin B Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis and

Autophagy Associated with G Actin Reduction and Persistent Activation of Cofilin in Jurkat Cells. *Pharmacology* 89, 248-356.

43.Haritunians T., Gueller S., Zhang L., Badr R., Yin D., Xing H., Fung M.C., Koeffler P. (2008) Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. *Leukemia Res.* 32, 1366-1373.

44.Knecht D.A., LaFleur R.A., Kahsai A.W., Argueta C.E., Beshir A.B., Fenteany G. (2010) Cucurbitacin I Inhibits Cell Motility by Indirectly Interfering with Actin Dynamics. *Plos One*, 5, 1-11.

45.Zhang T., Li Y., Park K.A., Byun H.S., Won M., Jeon J., Lee Y., Seok J.H., Choi S., Lee S., Kim J.M., Lee J.H., Son C.G., Lee Z., Shen H., Hur G.M. (2012) Cucurbitacin induces autophagy through mitochondrial ROS production which counteracts to limit caspase-dependent apoptosis. *Autophagy* 8, 559-576.

46.Park S., Kim J., Chi G., Kim G., Chang Y., Moon S., Nam S., Kim W., Yoo Y., Choi Y. (2012) Induction of apoptosis and autophagy by sodium selenite in A549 human lung carcinoma cells through generation of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 212, 252-261.

47.Gabrielsen M., Schuldt M., Munro J., Borucka D., Cameron J., Baugh M., Mleczak A., Lilla S., Morrice N., Olson M. (2013) Cucurbitacin covalent bonding to cysteine thiols: the filamentous-actin severing protein Cofilin1 as an exemplary target. *Cell. Commun. Signal* 11, 1-11.

48.Blaschuk O.W., Devemy E. (2009) Cadherins as novel targets for anticancer therapy. *Eur. J. Pharmacol.* 625, 195-198.

49.Shanmugam M.K., Nguyen A.H., Kumar A.P., Tan B.K.H., Sethi G. (2012) Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Lett.* 320, 158-170.

50.Zhang T., Li J., Dong Y., Zhai D., Lai L., Dai F., Deng H., Chen Y., Liu M., Yi M. (2012) Cucurbitacin E inhibits breast tumor metastasis by suppressing cell migration and invasion. *Breast Cancer Res. Treat.* 135, 445-458.

51.Deryugina E.I., Quigley J.P. (2006) Matrix Metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 9-34.

52.Muller C.B., Barros R.L.S., Castro M.A.A., Lopes F.M., Meurer R.T., Roehe A., Mazzini G., Ulbrich-Kulczynski J.N., Dal-Pizzol F., Fernandes M.C., Moreira J.C.F., Xavier L.L., Klamt F. (2011) Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137, 1309-1316.

53. Nakashima S., Matsuda H., Kurume A., Oda Y., Nakamura S., Yamashita M., Yoshikawa M. (2010) Cucurbitacin E as a new inhibitor of cofilin phosphorylation in human leukemia U937 cells. *Bioorg Med. Chem. Lett.* 20, 2994-2997.

54. Zhang Y-T., Ouyang D-Y., Xu L-H., Zha Q-B., He X-H. (2013) Formation of Cofilin-Actin rods following cucurbitacin-B-induced aggregation depends on slingshot Homolog1-Mediated Cofilin Hyperactivation. *J. Cell. Biochem.* 114: 2415-2429.

55. Siveen K.S., Sikka S., Surana R., Dai X., Zhang J., Kumar A.P., Tan B.K.H., Sethi G., Bishayee A. (2014) Targeting the Stat3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1845, 136-154.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Reagents, conditions and synthesis of DACE⁶. Semisynthesis process of a new derivative compound of cucurbitacin B (DACE). DACE was obtained after the conversion of the precursor cucurbitacin B into a tosylated intermediate by reaction with p-toluenesulfonyl chloride and DABCO in dichloromethane. The next procedure to obtain the DACE was the nucleophilic substitution with NaN₃ in Dimethylformamide. This reaction scheme has been described and published recently by our colleagues and collaborators of this research.⁶

Figure 2. ChemGPS-NP analysis of DACE (pink) together with the NCI reference dataset of anticancer drugs. Score plot of three principal components (PC1: size, PC2: aromaticity, PC3: lipophilicity) of DACE mapped onto the ChemGPS-NP model for prediction of anticancer mode of action. The NCI reference set of anticancer drugs included alkylating agents (black), RNA/DNA antimetabolites (red), tubulin inhibitors (light blue), topoisomerase I (green) and topoisomerase II inhibitors (dark blue).

Figure 3. DACE combined with CIS, IRI and PAC showed potential synergistic cell growth inhibition and dependent manner of ROS generation on A549 cells. (A) (B) (C) A549 cells were incubated with different concentrations of DACE, drugs and combinations of DACE with drugs for 48 h and cell viability evaluated by sulforhodamine B assay. Comparative graphics demonstrating the effects of DACE, drugs and their combinations on A549 cell proliferation. (D) (E) A549 cells were treated with DACE, drugs and their combinations for 48 h in the presence or absence of an antioxidant agent (NAC 500 μM) or an oxidative agent (BSO 10 μM). After treatments, cell proliferation was determined by the sulforhodamine B assay. The treatment

concentrations were: DACE (0.125 micromolar), cisplatin (9 micromolar), irinotecan (4.25 micromolar) and paclitaxel (0.125 micromolar), individually and combined. Data represent the mean±standard deviation of three independent experiments. Asterisks (***) represent $p<0.001$; (**) $p<0.01$; (*) $p<0.05$ compared DACE isolated vs. combined with each drug by Tukey's test.

Figure 4. DACE combined with drugs completely reduced the clonogenic survival, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis on A549 cells. Combined treatments did not harm the proliferative potential of non-tumoral lung cells (MRC-5). (A) (B) A549 cells were treated for 24 h with DACE, drugs and their combinations. Cells were then washed with warm PBS, given fresh medium and allowed to grow for ten days. Colonies of A549 cells were measured by staining colonies using crystal violet. (C) Effects of DACE individual and combined with drugs on cell cycle distribution of A549 cells after 48 h treatment with Propidium iodide staining. The values indicate the percentage of A549 cells in each phase of cell cycle. (D) Percentage of apoptotic cells after 24 h treatment with DACE and drugs analyzed by the Annexin V/PI assay. (E) A549 cells were treated with DACE, drugs and their combinations for 48 h in the presence or absence of a pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK). After treatments, cell proliferation was determined by the sulforhodamine B assay. (F) MRC-5 cells were treated with DACE, drugs and their combinations for 48 h at the same concentrations for all experiments. After treatment, cell proliferation was determined by the sulforhodamine B assay. The treatment concentrations were: DACE (0.125 micromolar), cisplatin (9 micromolar), irinotecan (4.25 micromolar) and paclitaxel (0.125 micromolar), individually and combined. Data represent the mean±standard deviation of three independent experiments. Asterisks (***) represent $p<0.001$; (**) $p<0.01$; (*) $p<0.05$ comparing the groups by Tukey's test. Scale bars are 20 μm ; the magnification was 400x.

Figure 5. DACE combined with drugs induces morphological alterations of F-actin on cytoskeleton and nuclear morphological alterations. (A) A549 cells were treated with DACE, drugs and their combinations, for 48 h. Actin filaments were labeled with TRITC-labeled-phalloidin staining (red), nuclei labeled with Hoechst staining (blue) and representative images obtained by immunofluorescence microscopic analysis. (B) A549 cells were treated with DACE, drugs and their combinations, for 48 h and nuclei labeled with Hoechst staining (blue). White arrows indicate nuclear morphological alterations characteristics of cell death by apoptosis, as nuclear fragmentation.

Immunofluorescence microscopic pictures of A549 cells treated. The treatment concentrations were: DACE (0.125 micromolar), cisplatin (9 micromolar), irinotecan (4.25 micromolar) and paclitaxel (0.125 micromolar), individually and combined. Data are representative of three independent experiments. Scale bars are 50 μm ; the magnification was 400x.

Figure 6. DACE is a potential inhibitor of cell migration and cell invasion and combinations of DACE with drugs modulates proliferation, cell death and migration pathways on A549 cells. (A) A549 cells were treated with PAC (0.1 and 1 μM) or DACE (0.5 and 1 μM) for 16 h. The anti-migratory activity was observed in response to an artificial injury. Images were obtained on an inverted fluorescence microscope and quantification of the inhibition percentages was performed using the CellC software. (B) A549 cells were grown in Transwell[®] inserts and received the same treatments as the scratch assay, for 48 h. After, cells were fixed and stained with DAPI, photographed with inverted fluorescence microscope and quantification of inhibition percentages performed using the CellC software. (C) (D) A549 cells were treated with DACE, drugs and their combinations, for 48 h. After, protein extraction was performed and the western blotting technique was used to evaluate protein expression. B-actin has been shown for equal loading. All Western blots were performed three times to validate the results, and each western blotting is representative in this experiment. The treatment concentrations were: DACE (0.125 micromolar), cisplatin (9 micromolar), irinotecan (4.25 micromolar) and paclitaxel (0.125 micromolar), individually and combined. Data are representative of three independent experiments. Asterisks (***) represent $p < 0.001$; (**) $p < 0.01$; (*) $p < 0.05$ comparing the groups by Tukey's test.

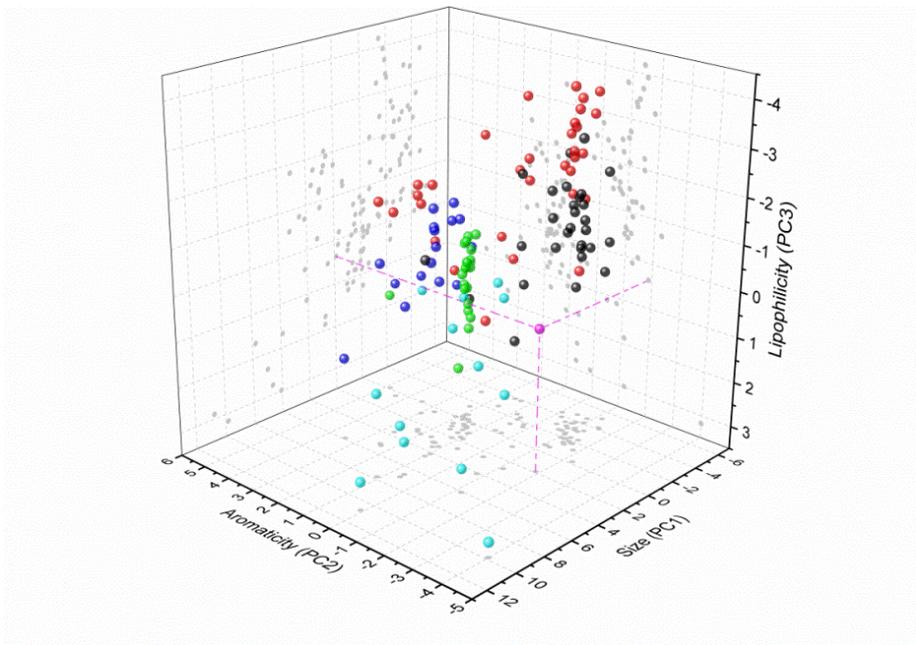


Figure 2. ChemGPS-NP analysis of DACE (pink) together with the NCI reference dataset of anticancer drugs. Score plot of three principal components (PC1: size, PC2: aromaticity, PC3: lipophilicity) of DACE mapped onto the ChemGPS-NP model for prediction of anticancer mode of action. The NCI reference set of anticancer drugs included alkylating agents (black), RNA/DNA antimetabolites (red), tubulin inhibitors (light blue), topoisomerase I (green) and topoisomerase II inhibitors (dark blue).

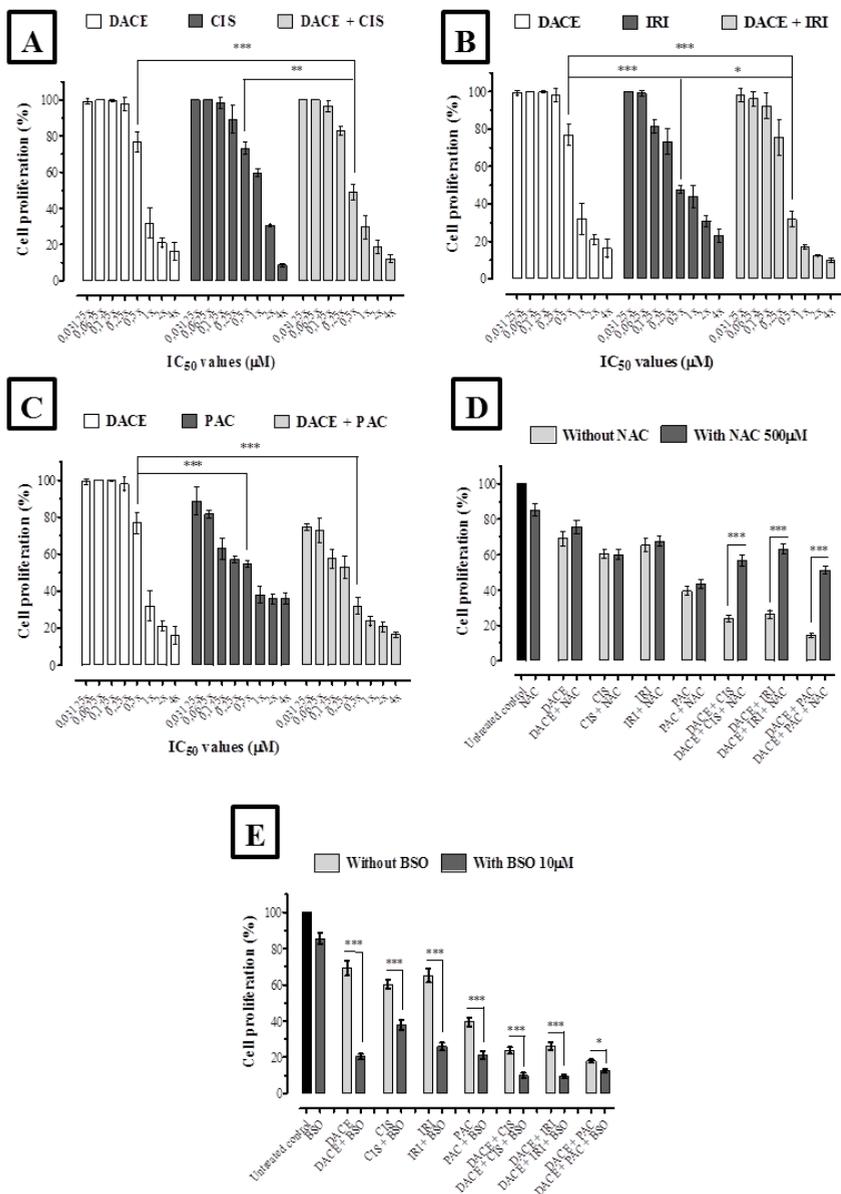


Figure 3. DACE combined with CIS, IRI and PAC showed potential synergistic cell growth inhibition and dependent manner of ROS

generation on A549 cells. (A) (B) (C) A549 cells were incubated with different concentrations of DACE, drugs and combinations of DACE with drugs for 48 h and cell viability evaluated by sulforhodamine B assay. Comparative graphics demonstrating the effects of DACE, drugs and their combinations on A549 cell proliferation. (D) (E) A549 cells were treated with DACE, drugs and their combinations for 48 h in the presence or absence of an antioxidant agent (NAC 500 μ M) or an oxidative agent (BSO 10 μ M). After treatments, cell proliferation was determined by the sulforhodamine B assay. The treatment concentrations were: DACE (0.125 micromolar), cisplatin (9 micromolar), irinotecan (4.25 micromolar) and paclitaxel (0.125 micromolar), individually and combined. Data represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments. Asterisks (***) represent $p < 0.001$; (**) $p < 0.01$; (*) $p < 0.05$ compared DACE isolated vs. combined with each drug by Tukey's test.

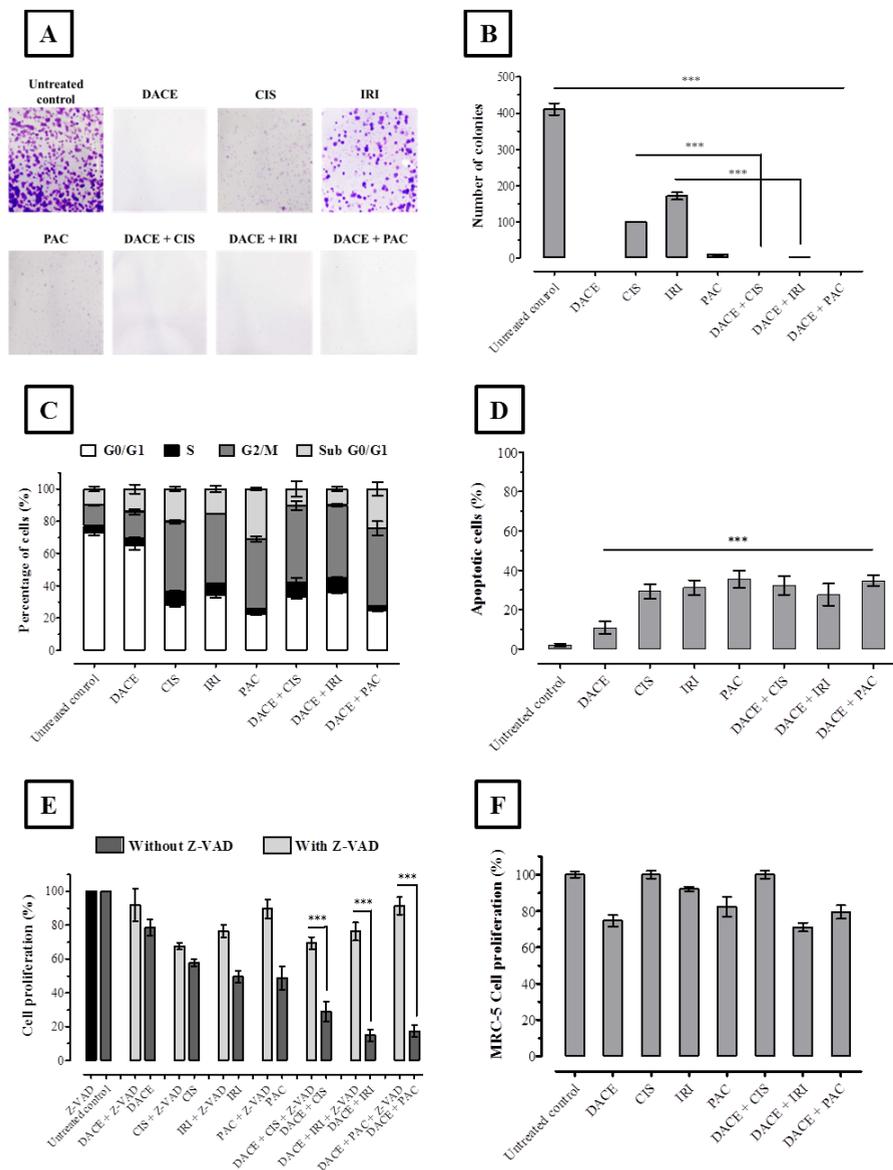


Figure 4. DACE combined with drugs completely reduced the clonogenic survival, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis on A549 cells. Combined treatments did not harm the proliferative potential

of non-tumoral lung cells (MRC-5). (A) (B) A549 cells were treated for 24 h with DACE, drugs and their combinations. Cells were then washed with warm PBS, given fresh medium and allowed to grow for ten days. Colonies of A549 cells were measured by staining colonies using crystal violet. (C) Effects of DACE individual and combined with drugs on cell cycle distribution of A549 cells after 48 h treatment with Propidium iodide staining. The values indicate the percentage of A549 cells in each phase of cell cycle. (D) Percentage of apoptotic cells after 24 h treatment with DACE and drugs analyzed by the Annexin V/PI assay. (E) A549 cells were treated with DACE, drugs and their combinations for 48 h in the presence or absence of a pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK). After treatments, cell proliferation was determined by the sulforhodamine B assay. (F) MRC-5 cells were treated with DACE, drugs and their combinations for 48 h at the same concentrations for all experiments. After treatment, cell proliferation was determined by the sulforhodamine B assay. The treatment concentrations were: DACE (0.125 micromolar), cisplatin (9 micromolar), irinotecan (4.25 micromolar) and paclitaxel (0.125 micromolar), individually and combined. Data represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments. Asterisks (***) represent $p<0.001$; (**) $p<0.01$; (*) $p<0.05$ comparing the groups by Tukey's test. Scale bars are 20 μm ; the magnification was 400x.

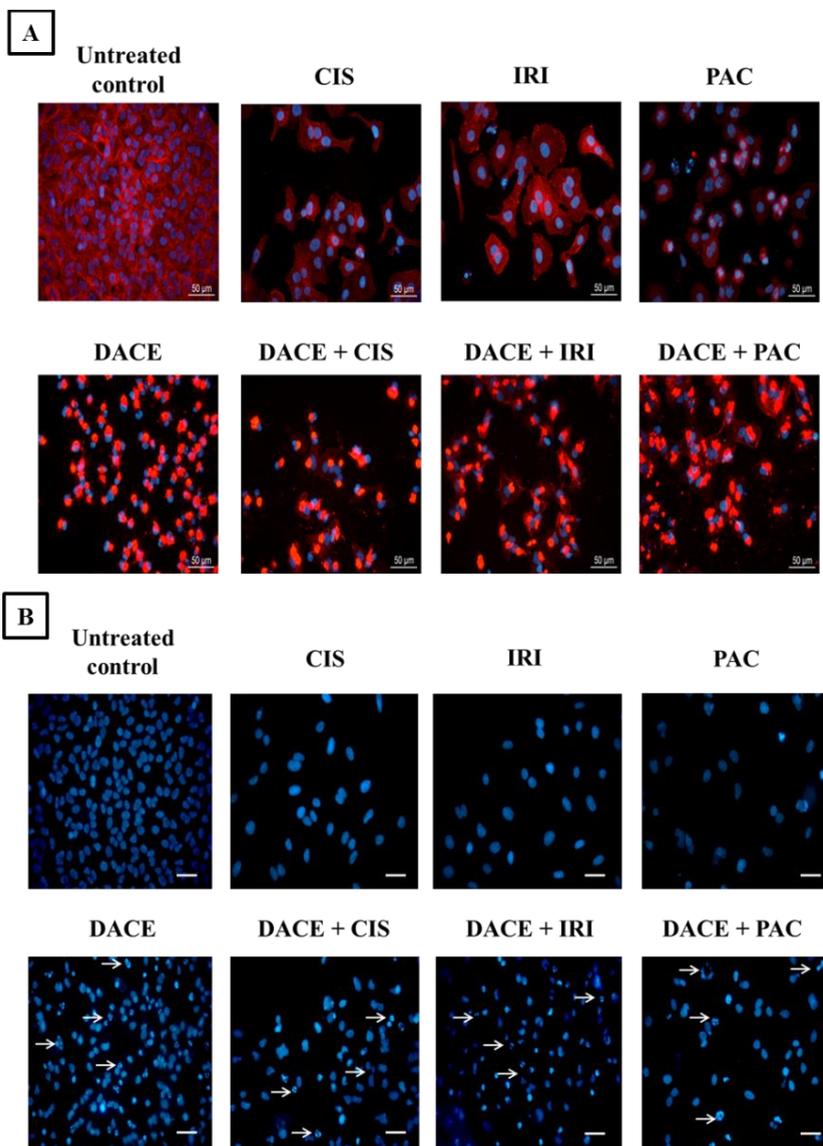


Figure 5. DACE combined with drugs induces morphological alterations of F-actin on cytoskeleton and nuclear morphological alterations. (A) A549 cells were treated with DACE, drugs and their combinations, for 48 h. Actin filaments were labeled with TRITC-

labeled-phalloidin staining (red), nuclei labeled with Hoechst staining (blue) and representative images obtained by immunofluorescence microscopic analysis. (B) A549 cells were treated with DACE, drugs and their combinations, for 48 h and nuclei labeled with Hoechst staining (blue). White arrows indicate nuclear morphological alterations characteristics of cell death by apoptosis, as nuclear fragmentation. Immunofluorescence microscopic pictures of A549 cells treated. The treatment concentrations were: DACE (0.125 micromolar), cisplatin (9 micromolar), irinotecan (4.25 micromolar) and paclitaxel (0.125 micromolar), individually and combined. Data are representative of three independent experiments. Scale bars are 50 μm ; the magnification was 400x.

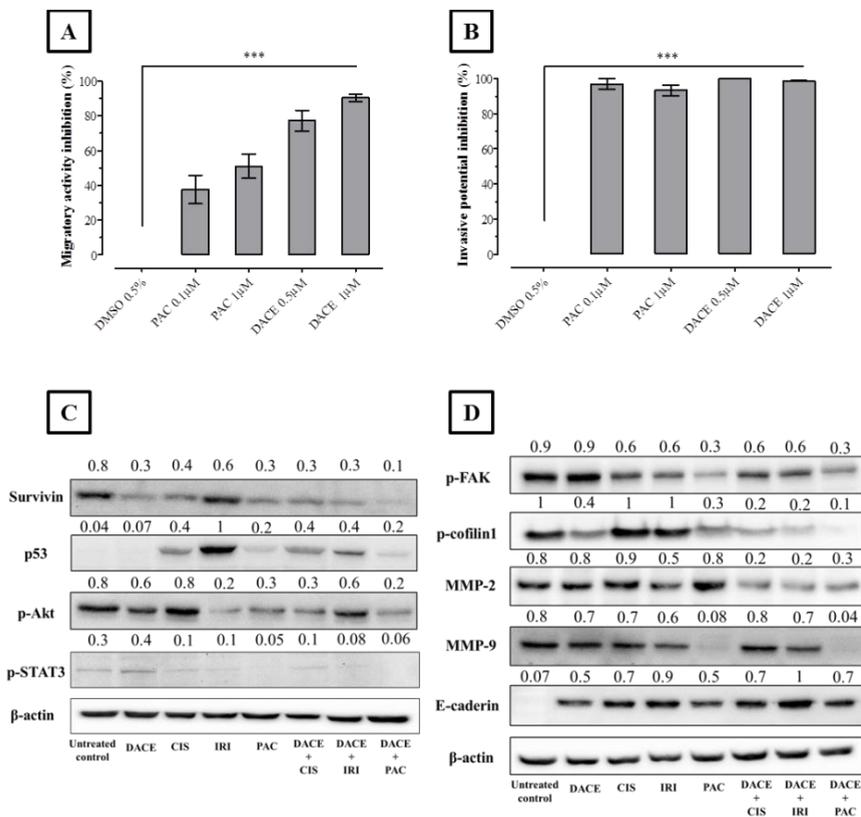


Figure 6. DACE is a potential inhibitor of cell migration and cell invasion and combinations of DACE with drugs modulates proliferation, cell death and migration pathways on A549 cells. (A) A549 cells were treated with PAC (0.1 and 1 μ M) or DACE (0.5 and 1 μ M) for 16 h. The anti-migratory activity was observed in response to an artificial injury. Images were obtained on an inverted fluorescence microscope and quantification of the inhibition percentages was performed using the CellC software. (B) A549 cells were grown in Transwell[®] inserts and received the same treatments as the scratch assay, for 48 h. After, cells were fixed and stained with DAPI, photographed with inverted fluorescence microscope and quantification of inhibition percentages performed using the CellC software. (C) (D) A549 cells were treated with DACE, drugs and their combinations, for 48 h. After, protein extraction was performed and the western blotting technique was used

to evaluate protein expression. B-actin has been shown for equal loading. All Western blots were performed three times to validate the results, and each western blotting is representative in this experiment. The treatment concentrations were: DACE (0.125 micromolar), cisplatin (9 micromolar), irinotecan (4.25 micromolar) and paclitaxel (0.125 micromolar), individually and combined. Data are representative of three independent experiments. Asterisks (***) represent $p < 0.001$; (**) $p < 0.01$; (*) $p < 0.05$ comparing the groups by Tukey's test.

CAPÍTULO III

ARTIGO II PUBLICADO -

ESTABELECIMENTO DE UM MODELO
XENOGRÁFICO DE TUMOR DE PULMÃO
HUMANO E SUA DETECÇÃO COM O
RADIOISÓTOPO ^{99m}Tc -HYNIC-BALA-
BOMBESINA₍₇₋₁₄₎

CAPÍTULO III – ESTABELECIMENTO DE UM MODELO XENOGRÁFICO DE TUMOR DE PULMÃO HUMANO E SUA DETECÇÃO COM O RADIOISÓTOPO ^{99m}Tc -HYNIC- β ALA-BOMBESINA⁽⁷⁻¹⁴⁾

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo estão compilados, na forma de um manuscrito já aceito para publicação no periódico *Nuclear Medicine Communications*, os resultados referentes ao estabelecimento de um modelo xenográfico de tumor de pulmão humano com células A549 em camundongos da linhagem Balb/C nudes, além da detecção dos tumores com o emprego do radioisótopo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina⁽⁷⁻¹⁴⁾ por meio de imagens cintilográficas.

**Nuclear
Medicine
Communications**

Original article

Feasibility study with ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin⁽⁷⁻¹⁴⁾ as an agent to early visualization of lung tumour cells in nude mice

Lucas L. Marostica^{a,c,*}, André L.B. de Barros^{a,b,*}, Juliana O. Silva^a, Sávia C.A. Lopes^a, Breno S. Salgado^b, Sotirios Chondrogiannis^d, Domenico Rubello^d, Geovanni D. Cassali^b, Eloir P. Schenkel^c, Valbert N. Cardoso^a, Cláudia M.O. Simões^c and Mônica C. Oliveira^a

Aim More sensitive and accurate imaging approaches for early detection and therapy monitoring of lung tumours are needed to ameliorate prognosis and outcome. Lung tumours are known to overexpress receptors for bombesin-like peptides. However, thus far, no study has demonstrated the potential role of bombesin-like peptides in identifying A549 lung tumour cells in xenograft animal models. Thus, we evaluate the feasibility of ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin⁽⁷⁻¹⁴⁾ as an imaging probe in lung cancer.

Methods and results Xenograft lung tumours were implanted in nude mice and evaluated by histopathological analysis. Tumours were easily visualized by ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin⁽⁷⁻¹⁴⁾ within 30 days after inoculation of the A549 cell line into mice. Scintigraphic images showed high tumour-to-background ratio.

Discussion The data obtained in this study indicate that ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin⁽⁷⁻¹⁴⁾ may be useful as an imaging probe to detect A549 lung cancer cells. To our knowledge, this is the first time that this specific radiocompound has been used to visualize non-small-cell

lung cancer A549 in mice. Further translational research in humans is required to establish the potential role of this radiocompound in clinical practice. *Nucl Med Commun* 00:000–000 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Nuclear Medicine Communications 2015, 00:000–000

Keywords: A549 cell line, lung tumour, scintigraphic imaging, ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin⁽⁷⁻¹⁴⁾ tumour identification

^aDepartment of Pharmacy, ^bDepartment of General Pathology, Biológico Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, ^cDepartment of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil and ^dDepartment of Nuclear Medicine, Molecular Imaging, Radiology, NeuroRadiology, Medical Physics, Clinical Laboratory, Microbiology & Pathology, Santa Maria della Misericordia Hospital, Rovigo, Italy

Correspondence to: Mônica C. Oliveira, PhD, Avenida Antônio Carlos, 6627 Campus Pampulha, CEP 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil Tel: +55 31 3409 6945; fax: +55 31 3409 6935; e-mail: monicaoristina@ufmg.br and itabra2001@yahoo.com.br

*Lucas L. Marostica and André L.B. de Barros contributed equally to the writing of this article.

Received 26 October 2015 Accepted 27 October 2015

2. ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO *NUCLEAR MEDICINE COMMUNICATIONS*

Short communication

Feasibility study with ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ as an agent to early visualization of lung tumour cells in nude mice

Lucas L. Marostica^{a,c*}, André L.B de Barros^{a,*}, Juliana O. Silva^a, Sávía C.A Lopes^a, Breno S. Salgado^b, Sotirios Chondrogiannis^d, Domenico Rubello^d, Geovanni D. Cassali^b, Eloir P. Schenkel^c, Valbert N. Cardoso^a, Cláudia M.O Simões^c, Mônica C. Oliveira^a

* Lucas L. Marostica and André L.B de Barros contributed equally to the writing of this article.

^aDepartment of Pharmacy, ^bDepartment of General Patology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, ^cDepartment of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil and ^dDepartment of Nuclear Medicine, Molecular Imaging, Radiology, NeuroRadiology, Medical Physics, Clinical Laboratory, Microbiology & Pathology, Santa Maria della Misericordia Hospital, Rovigo, Italy

Correspondence to: Mônica C. Oliveira, PhD, Avenida Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Tel: + 55 31 3409 6945; Fax: + 55 31 3409 6935. E-mails: monicacristina@ufmg.br and itabra2001@yahoo.com.br.

Abstract

Aim: More sensitive and accurate imaging approaches for early detection and therapy monitoring of lung tumours are needed in order to ameliorate prognosis and outcome. Lung tumours are known to over-express receptors for bombesin-like peptides. However, thus far, no study has demonstrated the potential role of bombesin-like peptides in identifying A549 lung tumour cells in xenograft animal models. Thus, we evaluate the feasibility of ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ as an imaging probe in lung cancer. **Methods & Results:** Xenograft lung tumours were implanted in nude mice and evaluated by histopathological analysis. Tumours were easily visualized by ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ within 30 days after inoculation of A549 cell line in mice. Scintigraphic images showed high tumour-to-BKG ratio. **Discussion:** The data obtained in this study indicate that ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ may be useful as imaging probe to detect A549 lung cancer cells. To the best of our knowledge, this is the first time that this specific radiocompound is used to visualize non-small cell lung cancer A549 in mice. Further translational research in humans is required to establish the potential role of this radiocompound in clinical practice.

Keywords: A549 cell line, lung tumour, scintigraphic imaging, ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎, tumour identification.

Introduction

Lung cancer accounts for more than 13% of the total diagnosed cancers and for 26% of deaths every year [1]. The most frequent histotype is non-small cell lung cancer, which includes adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large-cell carcinoma and accounts for 85% of all lung cancers [2].

Cancer cells are characterized by pathological modifications of several physiological functions, including the over-expression of a variety of peptide receptors in cancer cell surface [3]. This up-regulation allows the use of radiolabelled peptides to detect and characterize tumour by molecular imaging. In particular, lung cancer similarly to prostate, pancreas, colon and breast cancer cells is characterized by an over-expression of gastrin-releasing peptide receptors (GRPr). Hence, a radiolabelled peptide chemically analogous to gastrin-releasing peptide (GRP) may be used as a specific imaging probe to detect these tumours [4-6]. Typically, a truncated sequence of bombesin ($\text{BBN}_{(7-14)}$) is required to achieve peptide stability without compromising receptor-binding affinity [7-10].

Technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) is the most widely used radionuclide in nuclear medicine since it has optimal physical and chemical properties, including a relatively short physical half-life of only 6.01 hrs as well as a low gamma emission energy (140 keV) [11,12]. In order to use $^{99\text{m}}\text{Tc}$ for radiolabelling $\text{BBN}_{(7-14)}$, a chelating agent should be employed, such as 2-hydrazinonicotinamide (HYNIC), to provide stability to the metal complex [13,14].

Human non-small cell lung cancer A549 is widely used for *in vitro* and preclinical studies, mainly because it produces a well-defined tumour nodule after subcutaneous inoculation in nude mice, simulating the lung tumour in humans [15-17]. In addition, it has been reported that this cell line over-express GRPr [18]. As a result, radiolabelled bombesin-like peptides might be used as an imaging probe for detecting this type of tumour.

Therefore, the purpose of this study was to develop a lung tumour experimental model in female nude mice using the A549 cell line and to evaluate the feasibility of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC- βAla -Bombesin $_{(7-14)}$, as an imaging probe for detecting A549 lung tumour. Additionally, histopathological analysis was performed to confirm presence of xenograft lung tumour tissue in areas showing accumulation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC- βAla -Bombesin $_{(7-14)}$.

Methods

Materials

The peptide HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ was obtained from GL Biochem (Shanghai, China). Technetium-99m was acquired from a $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generator supplied by Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-IPEN (São Paulo, Brazil). Other reagents and solvents for the radiolabeling procedure were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). The human non-small cell lung cancer A549 (ATCC[®] CCL-185TM) were obtained from American Type Culture Collection-ATCC (Manassas, VA, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Waltham, MA, USA) and foetal bovine serum were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Trypsin was acquired from Invitrogen (São Paulo, Brazil) and Matrigel was obtained from Becton, Dickinson and Company-BD (Juiz de Fora, Brazil). Female BALB/c nude mice (15-20g) were purchased from Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-IPEN (São Paulo, Brazil). All protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at Universidade Federal de Minas Gerais (protocol number 118/2015) and are in compliance with the guide for the care and use of laboratory animals recommended by the Institute of Laboratory Animal Resources.

Radiolabeling of HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ and radiochemical purity

In this study was used a BBN₍₇₋₁₄₎ derivative which was attached, by its nitrogen-terminal residue, to the chelating agent 2-hydrazinonicotinamide (HYNIC). This modification does not affect BBN₍₇₋₁₄₎ affinity to GRPr, since the carboxy-terminal residue (opposite side) is responsible for receptor binding. Moreover, a spacer amino acid, beta-alanine (β -Ala), was added between HYNIC and BBN₍₇₋₁₄₎, to improve distance between the chelating core and the receptor binding site, thus avoiding impair in peptide affinity. The radiolabelling procedure was performed according to the process described by de Barros *et al.* [7], with some modifications. Briefly, to a sealed vial containing 20 mg of tricine and 5 mg of ethylenediamine-*N,N'*-diaceticacid solubilized in 0.5 mL of 0.9 % NaCl (w/v), 10 μg of HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ and 10 μL of a $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution in 0.25 M HCl (1 mg/mL) were added. The pH was adjusted to 7–8. Thereafter, an aliquot of 74 MBq of $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ (quantity sufficient to make 1 mL) was added to the vial and the solution was heated for 15 min in a water bath at 100 °C and then cooled to room temperature. The

final preparation showed a specific activity of 74 MBq/mL. Radiochemical purity analysis of ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala- Bombesin₍₇₋₁₄₎ was performed by thin-layer chromatography on silica gel strips (TLC-SG, Merck, Darmstadt, Germany) using a two-solvent system containing methyl-ethyl-ketone or acetonitrile:water (1:1) to calculate the amount of free technetium ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) and hydrolysed technetium ($^{99m}\text{TcO}_2$), respectively. Radioactivity was measured using a gamma counter (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

Cell Culture

Human non-small cell lung cancer (A549) was cultured in DMEM supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum and 1% (v/v) antibiotics (penicillin and streptomycin). Cells were maintained in a humidified incubator with 5% CO_2 atmosphere at 37°C. The cells were grown to confluence and then, harvested with trypsin dissociation. After centrifugation (500x g for 5 min), cells were re-suspended in Matrigel:DMEM medium (1:1) for inoculation into nude female BALB/c mice.

Xenograft lung tumour model

Animals were kept under specific pathogen-free conditions in autoclaved cages with wood shavings, with free access to food and water. The temperature and relative humidity were controlled and a regulated light-dark cycle (12/12h) was also employed. In each animal, an aliquot (100 μL) containing 5×10^6 A549 lung cancer cells in Matrigel : DMEM medium (1:1) was injected subcutaneously into the right lower flank. Tumours were allowed to grow for 30 days after the inoculation. They were then evaluated through scintigraphic imaging and histopathological analysis.

Scintigraphic images

^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ (7.4 MBq) was administered into the tail vein in lung tumour-bearing mice 30 days after A549 cell inoculation. At 1 and 4 h after injection, the mice were anesthetized with a mixture of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (8mg/kg) then, placed in a prone position under a gamma camera (Mediso, Budapest, Hungary) with a low-energy high-resolution collimator. Images were acquired using a 256 x 256 x 16 matrix size with a 20% energy window set at 140 keV for a period of 5 min. Regions of interest (ROIs) were analysed by

scintigraphic images outlining the tumour (target). The ROIs were automatically copied to the contralateral muscle (non-target). The target/non-target ratios were calculated using the total ROI counts for the quantitative evaluation of ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin $_{(7-14)}$ uptake by the tumour focus.

Histopathological analysis

After obtaining scintigraphic images of the tumour, animals, under anesthesia, were euthanized. Harvested tumour tissue was fixed in formalin (10 % w/v in phosphate-buffered saline, pH 7.4), and sections (4 μm) were processed for light microscopy studies. Hematoxylin-eosin staining procedures were performed on paraffin-embedded sections prepared on glass slides. Images of histological sections were captured by a digital camera (Spot Insight Color; SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, Michigan, USA) attached to a microscope (Olympus BX-40; Olympus, Tokyo, Japan). SPOT[®] software (version 3.4.5; Spot Imaging Solutions, Sterling Heights, Michigan, USA) and Corel DRAW[®] (version 7.468; Corel Corporation, Ontario, Canada) were used for image analysis.

Statistical Analysis

Data are reported as means \pm SEM. The means of the 2 groups of ROIs (target and non-target) were compared using Student's *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered to be significant. Data were evaluated using the Prism software (version 5.00; GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

Results and discussion

After 30 days, a xenograft lung tumour was successfully developed by the subcutaneous inoculation of the A549 human cell line into the right lower flank of female BALB/c nude mice. The lung xenograft tumour grew and could be identified macroscopically, as illustrated in Fig. 1a. The size average of the tumours obtained ranged between 100 - 300 mm^3 . Lung tumours are described as aggressive, and the the body weight of mice increased during the tumour development. These data are in accordance with previous studies using A549 lung cancer cells in nude mice, as it was recently reviewed by Kellar *et al.* [17]. However, thus far no previous study has described the identification of this xenograft model with scintigraphic images using ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin $_{(7-14)}$ as an imaging probe.

Histological analyses (Fig. 1b-d) of the tumour grafts showed that mice had developed a highly invasive growing tumour with markedly pleomorphic nuclei with increased nuclear-to-cytoplasmic ratios. The neoplastic cells were arranged in various patterns, including solid, acinar and lepidic mucinous variants. In addition, some tumours presented a mixed pattern, similar to human lung adenocarcinomas of mixed type. Tumour stroma was scant and necrosis of tumoral tissue was a prominent feature consistently observed, as well as apoptosis.

HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ was successfully labelled with ^{99m}Tc , showing a radiolabelling yield of $97.72 \pm 0.73\%$ ($n=6$). This yield is consistent with other works published by our group [19-21]. The presence of radiochemical impurities has proved to be a drawback in nuclear medicine, yielding images of poor quality. It is accepted that, for injection, a radiopharmaceutical must present a radiolabelling yield higher than 90%. Therefore, the ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ complex presented suitable radiochemical characteristics, as it showed high radiochemical purity ($>95\%$).

Several published studies have reported the in-vivo profile of ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ similar to those obtained in the present study. The authors described radiopeptide accumulation in the kidneys, bladder and tumour sites after its administration in murine breast (Ehrlich cells) [19], human breast (MDA-MB-231 cells) [8], prostate (LNCaP and PC3 cells) [21,22], colon (HT-29 cells) [23] and pancreas (Capan-1 cells) [24] tumour-bearing mice. However, no previous study has evaluated the feasibility of ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ in identifying A549 lung cancer in nude mice.

The xenograft lung tumour developed with A549 human cell line in nude mice can be clearly seen in the scintigraphic images obtained at 1 and 4 h after radiopeptide administration (Fig. 2a). Scintigraphic images showed higher uptake by the tumour (right thigh) when compared with the left thigh used as control. The target-to-nontarget ratio obtained with scintigraphic images (Fig. 2b) at 4 h (2.89 ± 0.49) was similar and not significantly different when compared with the values detected at 1 h (3.86 ± 0.42). This finding indicates the affinity of ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ to this type of cells, and even after a long period of time (4 h) the radiopeptide remains in the tumour tissue. The visual analysis of scintigraphic images corroborated the quantitative data, as the tumour focus has similar signal at 1 and 4 h after injection into lung tumour-bearing mice. According to Philips [25], a radiotracer should present a

tumour-to-background ratio higher than 1.5 to be able to produce high-quality images.

As aforementioned, ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ has proved to be useful in detecting several types of tumours, including breast, pancreas and prostate. In this specific study, we brought a new perspective on the use of this radiopeptide. Data presented in this feasibility study indicate that ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ was able to detect xenograft lung tumour (A549 cells) with suitable tumour-to-background ratios, producing images of high quality and reliability. To the best of our knowledge, this is the first time that this specific radiocompound is being used to visualize non-small cell lung cancer A549 in mice. Finally, the data presented in this study suggest that ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ could be used as a new agent to detect xenograft lung tumour induced by A549 cells, by means of scintigraphic images. In addition, this radiotracer might be used to monitor cancer therapy in preclinical studies and in studies conducted to better understand the development of lung tumours. Further translational research in humans is required to establish the potential role of this radiocompound in clinical practice.

Acknowledgments

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais –FAPEMIG, MG, Brazil for the financial support [grant number Rede-40/11 and PPM-00477-13] as well as CNPq (MCTI, Brazil, grant number 408496/2013-4) for the acquisition of the nude mice. The authors also thank CAPES (MEC, Brazil) and CNPq (MCTI, Brasil) for their research fellowships.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; **65**:5-29.
2. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 2013; **31**:992-1001.
3. Schottelius M, Wester HJ. Molecular imaging targeting peptide receptors. *Methods*. 2009; **48**:61-177.

4. Ferro-Flores G, Ramirez FM, Melendez-Alafort L, Santos-Cuevas CL. Peptides for *in vivo* target-specific cancer imaging. *Mini Rev Med Chem*. 2010; **10**:87-97.
5. Fani M, Maecke HR, Okarvi SM. Radiolabeled peptides: valuable tools for the detection and treatment of cancer. *Theranostics*. 2012; **2**:481-501.
6. Laverman P, Sosabowski JK, Boerman OC, Oyen WJ. Radiolabeled peptides for oncological diagnosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012; **39**:S78-S92.
7. De Barros ALB, Mota LG, Soares DCF, Coelho MMA, Oliveira MC, Cardoso VN. Tumor bombesin analog loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes as tool for tumor identification. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011; **21**:7373-7375.
8. De Barros ALB, Mota LG, Ferreira CA, Côrrea NCR, Góes AM, Oliveira MC, Cardoso VN. ^{99m}Tc -labeled bombesin analog for breast cancer identification. *J Radioanal Nucl Chem*. 2013; **295**:2083-2090.
9. Mansi R, Wang X, Forrer F, Waser B, Cescato R, Graham K, et al. Development of a potent DOTA-conjugated bombesinantagonista for targeting GRPr-positive tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011; **38**:97-107.
10. Schroeder RPJ, van Weerden WM, Bangma C, Krenning EP, de Jong M. Peptide receptor imaging of prostate cancer with radiolabelled bombesin analogues. *Methods*. 2009; **48**:200-4.
11. Kong F, Zhang Y, Young DP, Yu D, Yang DJ. Development of ^{99m}Tc -EC-tyrosine for early detection of breast cancer tumor response to the anticancer drug melphalan. *Acad Radiol*. 2013; **20**:41-51.
12. Yang DJ, Kim C, Schechter NR, Azhdarinia A, Yu D, Oh C, et al. Imaging with ^{99m}Tc -ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. *Radiology*. 2003; **226**:465-73.
13. Lambrecht FY, Durkan K, Bayrak E. Labeling bombesin-like peptide with ^{99m}Tc via hydrazinonicotinamide: description of optimized radiolabeling conditions. *J Radioanal Nucl Chem*. 2010; **284**:539-45.
14. Lambrecht FY, Durkan K, Özgür, A Gündüz C, Avcý ÇB, Susluer SY. In vitro evaluation of ^{99m}Tc -EDDA/tricine-HYNIC-Q-Litorin in gastrin releasing peptide receptor positive tumor cell lines. *J Drug Target*. 2013; **21**:383-8.

15. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*. 1976; **17**:62-70.
16. Memon AA, Jakobsen S, Dagnaes-Hansen F, Sorensen BS, Keiding S, Nexø E. Positron emission tomography (PET) imaging with [¹¹C]-labeled erlotinib: a micro-PET study on mice with lung tumor xenografts. *Cancer Res*. 2009; **69**:873-8.
17. Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical murine models for lung cancer: Clinical trial applications. *Biomed Res Int*. 2015; **2015**: 621324.
18. Siegfried JM, Krishnamachary N, Gaither Davis A, Gubish C, Hunt JD, Shriver SP. Evidence of autocrine actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in non-small cell lung cancer. *Pulm Pharmacol Ther*. 1999; **12**:291-302.
19. De Barros ALB, Mota LG, Ferreira CA, Oliveira MC, Goes AM, Cardoso VN. Bombesin derivative radiolabeled with technetium-99m as agent for tumor identification. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; **20**:6182-6184.
20. De Barros AL, Mota L, Ferreira CA, Cardoso VN. Kit formulation for ^{99m}Tc-labeling of HYNIC-βALA-Bombesin₍₇₋₁₄₎. *Appl Radiat Isot*. 2012; **70**:2440-2445.
21. Fuscaldi LL, Barros ALB, Santos CRP, Souza CM, Cassali GD, Oliveira MC, et al. Evaluation of the optimal LNCaP prostate tumour developmental stage to be assessed by ^{99m}Tc-HYNIC-βAla- Bombesin₍₇₋₁₄₎ in an experimental model. *J Radioanal Nucl Chem*. 2014; **300**:801-807.
22. Faintbuch BL, Teodoro R, Duatti A, Muramoto E, Faintuch S, Smith CJ. Radiolabeled bombesin analogs for prostate cancer diagnosis: preclinical studies. *Nucl Med Biol*. 2008; **35**: 401-411.
23. Shi J, Jia B, Liu Z, Yang Z, Yu Z, Chen K, et al. ^{99m}Tc-labeled bombesin(7-14)NH₂ with favorable properties for SPECT imaging of colon cancer. *Bioconjug Chem*. 2008; **19**:1170-1178.
24. Carlesso FN, Fuscaldi LL, Araújo RS, Teixeira CS, Oliveira MC, Fernandes SOA, et al. Evaluation of ^{99m}Tc-labeled bombesin₍₇₋₁₄₎ as an agent for pancreas tumor detection in mice. *Braz J Med Biol Res*. 2015; **48**:923-928.
25. Phillips WT. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. *Adv Drug Delivery Rev*. 1999; **37**:13-32.

Figure 1

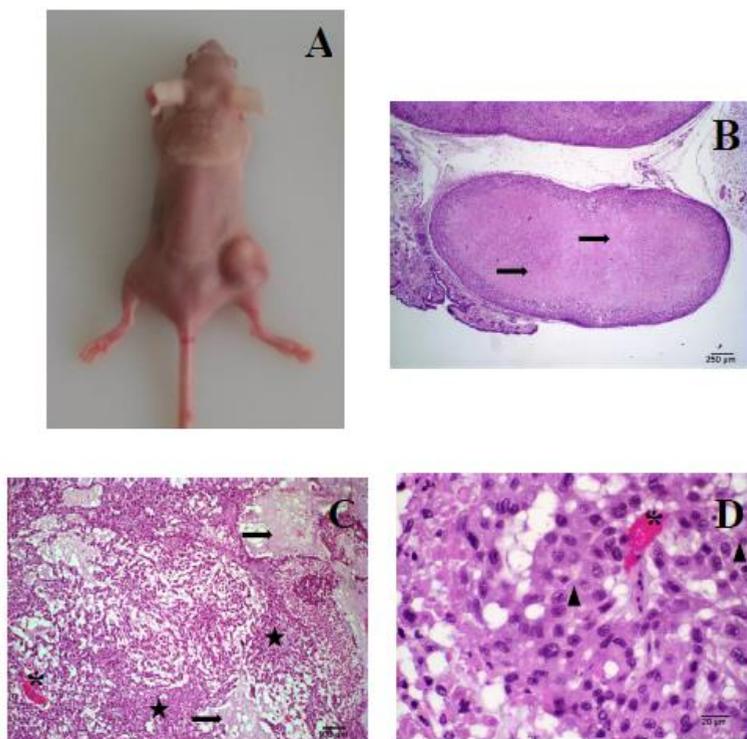


Figure 1. Xenograft lung cancer experimental model at 30 days after inoculation of non-small-cell lung cancer cell line (A549) into nude female BALB/c mice. (a) A visible tumour growth in the right lower flank of nude mice. This tumour model was characterized by evaluating images of tumour histological sections after staining with hematoxylin and eosin (b-d). Arrows indicate areas of necrosis; stars represent conjunctive stroma of tumour tissue; asterisks indicate vessels; and triangles represent lung cancer cells with pleomorphic nuclei and increased nuclear-to-cytoplasmic ratios.

Figure 2

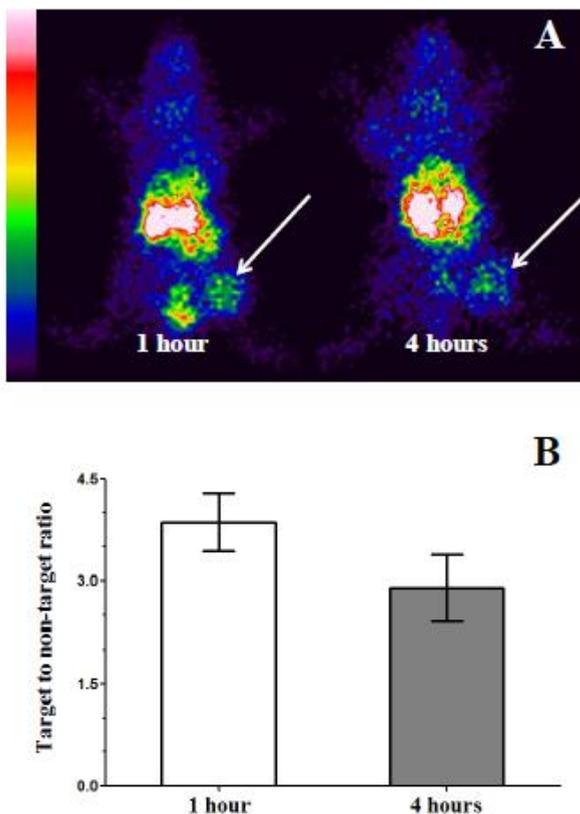


Figure 2. Scintigraphic images (256 x 256 x 16 matrix size) obtained at 1 and 4 h after intravenous administration of 7.4 MBq ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin $_{(7-14)}$ into lung tumour-bearing mice anesthetized with ketamine and xylazine. Arrows indicate tumour foci (a). Quantitative analysis of target-to-nontarget ratio evaluated by scintigraphic images (b) (n = 3). Data are reported as means \pm SEM.

CAPÍTULO IV

EFEITO ANTITUMORAL DA TERAPIA
COMBINADA DO DERIVADO
SEMISSINTÉTICO DA CUCURBITACINA B
(DACE) COM PACLITAXEL EM MODELO
XENOGRÁFICO DE TUMOR DE PULMÃO

CAPÍTULO IV – EFEITO ANTITUMORAL DA TERAPIA COMBINADA DO DERIVADO SEMISSINTÉTICO DA CUCURBITACINA B (DACE) COM PACLITAXEL EM MODELO XENOGRÁFICO DE TUMOR DE PULMÃO

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo constam os resultados relativos aos efeitos antitumorais do tratamento combinado do derivado semissintético da cucurbitacina B (DACE) com o paclitaxel no modelo xenográfico de tumor de pulmão estabelecido e apresentado no capítulo anterior. Além dos efeitos antitumorais, também foram avaliados parâmetros indicadores de toxicidade aguda induzida pelos tratamentos. Os resultados aqui apresentados foram obtidos em colaboração com as equipes do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Laboratório de Radioisótopos (Faculdade de Farmácia) e do Laboratório de Patologia Comparada (Instituto de Ciências Biológicas), ambos da UFMG, fruto do estágio sanduíche realizado, sob a supervisão da Prof^a. Dra. Mônica Cristina de Oliveira, do Prof. Dr. André Luís Branco de Barros e do Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali, respectivamente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material

O paclitaxel foi obtido da Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil). O peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi adquirido da GL BioChem (Shangai, China). O tecnécio-99m foi obtido do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN, São Paulo, Brasil) a partir de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (São Paulo, Brasil). Os coligantes tricina e EDDA foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As células A549 (ATCC® CCL-185™) foram adquiridas do ATCC (Manassas, EUA). O meio de cultura DMEM, o soro fetal bovino (SFB), os antibióticos penicilina e estreptomicina, a tripsina e o EDTA foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As garrafas de cultivo celular foram adquiridas da Sarstedt (Wedel, Alemanha), e os camundongos da linhagem Balb/c nude fêmeas foram adquiridos do biotério do IPEN.

2.2 Cultivo celular

As células A549 foram mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB, penicilina e estreptomicina (10.000 UI e 10mg/mL, respectivamente) em frascos de 150 cm², incubados em

estufa úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura foi substituído a cada três dias, sendo as células dissociadas com solução de tripsina 0,25% e expandidas para novas garrafas de cultivo quando observada confluência de aproximadamente 90%.

2.3 Animais

Foram utilizados 24 camundongos da linhagem Balb/C nudes (18 ± 3g) fêmeas, com idade entre 6-8 semanas. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico, com maravalha, ração e água esterilizadas, e mantidos em ambiente com controle de ciclo de luz e ventilação, com livre acesso à ração e água. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o número 118/2015, conforme parecer de aprovação que consta no Anexo A ao final desta Tese.

2.4 Implante das células A549 nos camundongos para o desenvolvimento dos tumores

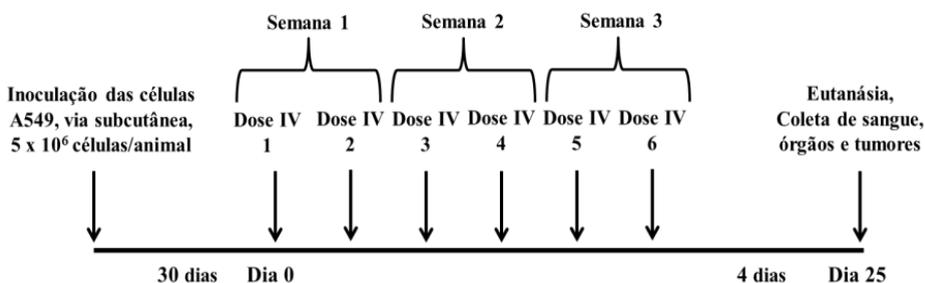
Para o estabelecimento do tumor de pulmão xenográfico nos animais, o meio de cultura das garrafas contendo as células A549 foi removido e a monocamada celular lavada três vezes com tampão fosfato salino (PBS pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 3 mL da solução de tripsina 0,25% (p/v)/ EDTA 1 mM) e as garrafas mantidas em estufa (37°C com atmosfera de 5% de CO₂) por 5 minutos, para a dissociação enzimática das células. Após a dissociação celular, foram acrescentados 4 mL do meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB para a inativação da tripsina. O conteúdo de cada garrafa foi transferido para tubos tipo Falcon de 15 mL e centrifugados a 500 x g por 5 min. Logo após, descartou-se os sobrenadantes e o *pellet* de células foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura suplementado com SFB. Após reunir todas as células A549 em uma única suspensão, foi procedida a contagem celular em câmara de Neubauer com o corante azul de tripano a 0,4% (p/v) para determinação da viabilidade celular. Células coradas pelo azul de tripano foram desconsideradas e as células que não captaram o corante foram consideradas como viáveis. A viabilidade celular oscilou entre 90-95%. Após a quantificação das células, foram preparadas alíquotas contendo 5×10^6 células A549 em um volume de 50 µL para cada animal. Para cada 50 µL de suspensão celular, foram também acrescentados 50 µL de Matrigel (BD Becton Dickinson, Heidelberg, Alemanha). As células foram inoculadas pela via subcutânea na região próxima do flanco direito inferior dos camundongos, com seringa de

insulina e agulha de 13 mm x 0,33 mm (Labor Import, Osasco, Brasil). Os animais foram mantidos em ambiente asséptico e com troca semanal das gaiolas autoclavadas, em estantes com controle de temperatura e umidade. Após a inoculação das células, foi aguardado o crescimento dos tumores, considerando-se como critério para o início dos tratamentos um volume mínimo de 100 mm³, sendo que o tempo necessário para o crescimento dos tumores foi de aproximadamente 30 dias.

2.5 Avaliação da atividade antitumoral

Após o implante e crescimento dos tumores, os 24 animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais com seis animais/grupo. O esquema de tratamento aplicado está ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Esquema representativo do protocolo experimental dos tratamentos.



Para o grupo controle, foi administrado o veículo Cremophor®/etanol desidratado 1:1 (v/v) solubilizado na proporção 1:4 com solução salina 0,9%. Nos animais do segundo grupo foi administrada a DACE, na dose de 1mg/Kg. O terceiro grupo recebeu paclitaxel, na dose de 10 mg/Kg. O quarto grupo recebeu o tratamento combinado da DACE 1mg/Kg com paclitaxel 10 mg/Kg. A administração dos tratamentos foi realizada através da via intravenosa pela veia caudal dos animais, com dois tratamentos/semana, no total de seis administrações. O primeiro dia de administração foi considerado o dia zero do estudo. Quatro dias após a última administração, os animais foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical após anestesia pela via intraperitoneal com ketamina (60mg/Kg) e xilazina (8mg/kg).

A atividade antitumoral foi avaliada a partir do volume do tumor, que foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $V = 0,52 \times (d1 \times d2^2)$ (ROLLAND et al., 2009), sendo que as medidas d1 e d2 se referem ao maior e o menor diâmetros perpendiculares, respectivamente, medidos com um paquímetro MIP/E-103 (Mitutoyo Sul Americana, Suzano, Brasil). O crescimento do tumor foi monitorado no tempo zero antes do início do tratamento e sempre duas horas antes da administração de cada tratamento. Quatro dias após o último tratamento, também foi realizada a medida tumoral final. A variação do volume tumoral foi determinada considerando-se o volume inicial como 100% e calculando-se a porcentagem de aumento ou de redução do volume, de acordo com esse volume inicial. No final do período experimental, o volume relativo do tumor (VRT) foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{VRT} = \frac{\text{volume do tumor no dia 25}}{\text{volume do tumor no dia 0}}$$

A porcentagem de inibição do crescimento do tumor (IC) também foi determinada mediante o emprego da seguinte fórmula:

$$\text{IC} = 1 - \frac{(\text{VRT do grupo tratado}) \times 100}{\text{VRT do grupo controle}}$$

No final do experimento, 25 dias após o início dos tratamentos, os animais foram sacrificados, os tumores removidos e, posteriormente, fixados com solução de formaldeído 10% (v/v).

2.6 Imagens cintilográficas do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ nos animais com tumor de pulmão

Nos dias 0 e 25, foram administrados aos camundongos Balb/c nus, pela via intravenosa, 37 MBq da solução de $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$. As imagens foram adquiridas 4 h após a administração do complexo radiomarcado. Os camundongos foram anestesiados com ketamina (60mg/Kg) e xilazina (8mg/kg) e mantidos em posição de decúbito ventral sob a câmara gama, modelo NuclideTM TH 22 (Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256. Para quantificar a captação do radiofármaco $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pelo foco

tumoral, as imagens foram analisadas por meio da determinação da relação alvo/não-alvo, conforme descrito na literatura (DINIZ et al., 2008; DE BARROS et al., 2013). Inicialmente, foi realizado um delineamento em torno da área alvo (tumor) e da área não alvo (músculo contralateral). Em seguida, a intensidade de radiação emitida em pixels foi quantificada para cada uma das áreas delineadas e calculou-se a relação alvo/não alvo por meio da fórmula representada a seguir:

$$\text{Relação alvo/não alvo} = \frac{\text{contagem na área alvo}}{\text{contagem na área não alvo}}$$

Os resultados foram expressos como a razão entre a relação alvo/não alvo no dia 25 (D25) e a relação alvo/não alvo no dia zero (D0).

$$\text{Razão} = \frac{\text{relação alvo/não alvo D25}}{\text{relação alvo/não alvo D0}}$$

As imagens cintilográficas dos animais marcados com ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foram obtidas no Laboratório de Radioisótopos (Faculdade de Farmácia/UFMG).

2.7 Investigação da toxicidade subcrônica dos tratamentos

Com o intuito de avaliar os efeitos de toxicidade subcrônica potencialmente induzida pelos tratamentos, foram utilizados alguns parâmetros, tais como monitoramento do peso corporal dos animais, mortalidade, análise de marcadores bioquímicos e avaliação histopatológica do fígado, rim, pulmão, coração, baço, cérebro e fêmur. O estudo de toxicidade aguda foi realizado com todos os animais dos quatro grupos de tratamento avaliados neste estudo. O desenho experimental e a análise dos parâmetros de toxicidade aguda foram realizados com base em Leite (2010).

2.7.1 Monitoramento do peso dos animais

O peso dos animais foi monitorado no dia zero, quatro dias após cada tratamento e no dia da eutanásia (dia 25). A variação de peso ao longo do período experimental foi calculada em relação ao peso inicial. Caso fosse detectada a morte de algum animal durante os tratamentos, o momento desta seria registrado.

2.7.2 Estudo de marcadores bioquímicos

As análises de marcadores bioquímicos foram realizadas com todos os animais, ao final dos 25 dias de experimento. Os camundongos foram anestesiados com ketamina (60 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) e as amostras de sangue coletadas pelo plexo braquial dos animais, com anticoagulante para posterior centrifugação e separação do soro. Para o estudo da função hepática foram determinados os níveis das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina. A nefrotoxicidade foi determinada por meio da determinação do nível sérico de uréia. Também foram analisados os teores de proteínas totais e albumina. Todos os métodos foram realizados conforme as especificações do fabricante (Bioclin Quibasa, Belo Horizonte, Brasil), sendo as leituras realizadas com espectrofotômetro para microplaca modelo Benchmark Plus (Bio-Rad, Hercules, EUA).

2.7.3 Avaliação histológica dos órgãos

Os fragmentos dos órgãos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 μm de espessura e corados pelo método hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas e as imagens foram obtidas usando câmera digital Spot Insight Color, adaptada a um microscópio Olympus BX-40, com o programa de captura SPOT® versão 3.4.5.

2.8 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. Para a verificação da normalidade e homocedasticidade da variância foram aplicados os testes de D'Agostino e Bartlett, respectivamente. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas pela equação: $y = \log(y + 100)$. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de variância (One-Way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. Em todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95%, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da atividade antitumoral

A primeira análise desta etapa do trabalho consistiu da comparação da eficácia da atividade antitumoral dos tratamentos realizados

individualmente com DACE e paclitaxel e da combinação desses no modelo xenográfico de tumor de pulmão estabelecido. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 1 e 2. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados relativos ao volume relativo do tumor (VRT), dose total administrada, e o percentual de inibição do crescimento (IC) tumoral para cada tratamento avaliado.

A dose total administrada para os grupos tratados com DACE, paclitaxel e a combinação dos dois foi, respectivamente: 6 mg/Kg, 60 mg/Kg e 66 mg/Kg (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados relativos às doses totais, variação dos volumes relativos dos tumores (VRT) e de inibição do crescimento (IC) dos tumores xenográficos de pulmão, em camundongos Balb/c nudes, após diferentes tratamentos.

Dados expressos como média \pm erro padrão da média (n=6 animais/grupo de

| Tratamento | Dose total administrada (mg/Kg) | VRT (média \pm erro padrão média) | IC (%) |
|--|--|---|---------------|
| Grupo controle | - | 1,81 \pm 0,131 *** | - |
| DACE 1 mg/Kg | 6 mg/Kg | 1,45 \pm 0,163 ** | 20,9 |
| Paclitaxel 10 mg/kg | 60 mg/Kg | 1,33 \pm 0,124 * | 27,5 |
| DACE 1mg/Kg + Paclitaxel 10 mg/Kg | DACE 6 mg/Kg + Paclitaxel 60 mg/Kg | 0,75 \pm 0,06 | 59,5 |

tratamento). Os resultados dos tratamentos avaliados foram comparados estatisticamente. Os símbolos indicam diferenças estatísticas significativas observadas apenas na comparação dos valores de VRT entre os grupos, sendo * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$, após análise de variância (One-Way ANOVA, seguida do teste t Tukey).

Estes dados demonstram que os grupos tratados com paclitaxel e com DACE+paclitaxel receberam as maiores doses totais administradas durante o tratamento. Apesar disso, todos os tratamentos foram bem tolerados pelos animais, inclusive os do grupo controle, para os quais foi administrado o veículo (Cremophor®/etanol), no qual foram preparadas as soluções da DACE e do paclitaxel. Importante salientar que as doses administradas foram selecionadas com base em dados de estudos

anteriores com a própria DACE (SILVA et al., 2015), a cucurbitacina B, que é precursora da DACE (IWANSKI et al., 2010; KAUSAR et al., 2013) e o paclitaxel (WALL; WANI, 1995; YAMORI et al., 1997; HUANG et al., 2006; MILANOVIC et al., 2012).

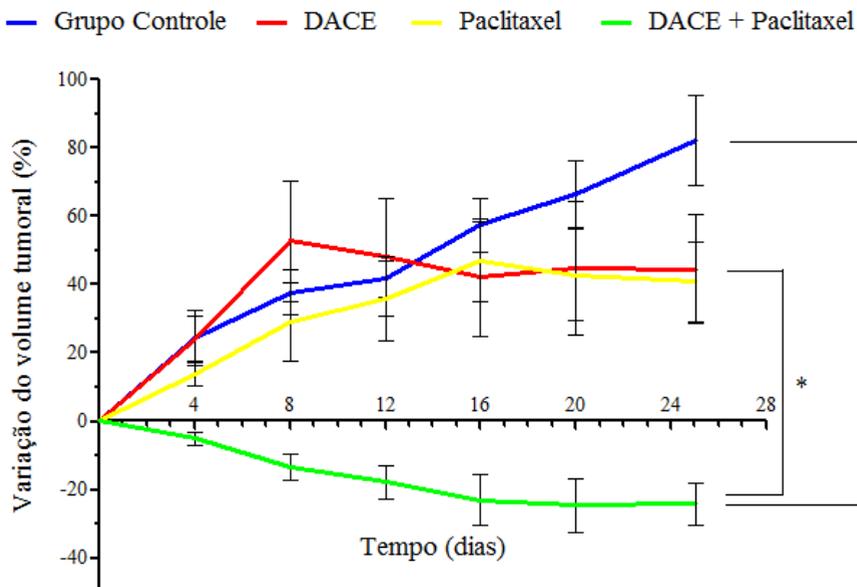
Os resultados do VRT, após os tratamentos do grupo controle, DACE, paclitaxel e DACE+paclitaxel foram, respectivamente: $1,81 \pm 0,131$; $1,45 \pm 0,163$; $1,33 \pm 0,124$ e $0,75 \pm 0,06$ (Tabela 1). Na comparação com o grupo controle, todos os demais grupos de animais tratados apresentaram redução do VRT, principalmente o grupo de animais que recebeu o tratamento combinado da DACE+paclitaxel, que apresentou uma redução mais importante e estatisticamente significativa, em comparação com os demais grupos, indicando que o tratamento combinado foi o esquema mais efetivo. Os percentuais de inibição de crescimento (IC) dos tumores corroboram os resultados obtidos em relação aos valores de VRT, nos quais o tratamento combinado apresentou um percentual de inibição (59,5%) superior aos dos tratamentos individualizados com DACE (20,9%) e paclitaxel (27,5%). Portanto, os resultados *in vivo* obtidos com a administração do tratamento combinado indicaram uma maior redução do VRT e um maior percentual de IC dos tumores, corroborando os efeitos sinérgicos já detectados *in vitro* (Capítulo 2).

Através da comparação da variação do volume tumoral dos animais de cada grupo de tratamento, ao longo dos diferentes dias do protocolo experimental (Figura 2), também foi possível observar o sinergismo obtido com o esquema de tratamento combinado em relação aos tratamentos com DACE e paclitaxel individualmente.

Na comparação do dia 25 com o dia zero, para o grupo controle, o volume tumoral médio aumentou em 82,1%. No grupo de tratamento com DACE 1 mg/Kg, o aumento do volume tumoral foi de 44,5%, enquanto que no grupo de tratamento com paclitaxel 10 mg/Kg, o volume tumoral aumentou em 40,9%. Diferentemente destes três grupos de tratamento, a combinação do DACE+paclitaxel reduziu significativamente em 24,2% o volume tumoral médio ao final do tratamento. No grupo controle, o volume tumoral apresentou contínuo crescimento do início ao final do tratamento. Neste aspecto, o grupo de animais tratado com a DACE individualmente apresentou aumento do volume tumoral até o dia 8, seguido de uma discreta redução nos dias 12 e 16, mas com manutenção do volume tumoral nos dias 20 e 25. O grupo de animais tratado com paclitaxel individualmente apresentou aumento do volume tumoral nos dias 4, 8, 12 e 16, com manutenção do

mesmo nos dias 20 e 25. Com o tratamento combinado da DACE+paclitaxel, o volume dos tumores foi reduzido nos dias 4, 8, 12 e 16, e mantido nos dias 20 e 25.

Figura 2. Variação percentual dos volumes tumorais xenográficos de pulmão, em camundongos Balb/c nudes, após diferentes tratamentos.



Durante os 25 dias de experimento, os animais receberam 6 administrações IV de veículo (grupo controle), DACE 1mg/Kg, Paclitaxel 10 mg/Kg e a combinação DACE 1mg/Kg + Paclitaxel 10 mg/Kg. As medidas tumorais foram realizadas com paquímetro. O nível de significância foi considerado para valores de $p < 0,05$ e os dados expressos como média \pm erro padrão da média do aumento ou redução do volume tumoral comparado à medida do tempo zero para cada grupo antes do tratamento ($n = 6$ animais por grupo). Os símbolos indicam diferença estatística significativa observada na comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,0001$, após análise de variância (One-Way ANOVA, seguida do teste t Tukey).

Os dados promissores obtidos relativos à atividade antitumoral da DACE em esquema de terapia combinada com o paclitaxel são inéditos. No entanto, a atividade antitumoral detectada dos tratamentos individualizados pode ser discutida e comparada com dados já

publicados. Por exemplo, Wakimoto e colaboradores (2008), usando um modelo xenográfico de tumor de mama humano e tratamento com a cucurbitacina B, na dose de 1 mg/Kg, três vezes por semana, durante seis semanas, observaram uma redução de 55% do volume tumoral, quando comparado ao grupo controle. Liu e colaboradores (2010), avaliando um modelo xenográfico de tumor de laringe e tratamento com a cucurbitacina B, na dose de 55 µg/Kg, diariamente, por 14 dias, observaram um aumento do volume tumoral de 1,5x, em relação ao início do tratamento. Neste mesmo modelo, o crescimento dos tumores foi completamente inibido quando foi aplicado o tratamento combinado da cucurbitacina B com cisplatina. Iwanski e colaboradores (2010) também observaram, em um modelo xenográfico de tumor de pâncreas humano e tratamento com a cucurbitacina B, nas doses de 0,5 e 1 mg/Kg, três vezes por semana, inibição do crescimento tumoral de 18 e 63%, respectivamente. Neste mesmo estudo, quando foi administrada a combinação da cucurbitacina B 1 mg/Kg com gemcitabina 25 mg/Kg, a inibição do crescimento dos tumores aumentou para 83%. Aribi e colaboradores (2012), usando um modelo xenográfico ortotópico de tumor de mama e tratamento com a cucurbitacina B, nas doses de 0,5 e 1 mg/Kg, três vezes por semana, observaram redução de 45% e 55% do volume tumoral, respectivamente, e 90% de redução do volume tumoral quando foi administrado o tratamento combinado da cucurbitacina B com docetaxel. Kausar e colaboradores (2013), em um modelo xenográfico de tumor de pulmão humano do tipo células não pequenas e tratamento com a cucurbitacina B, na dose de 1 mg/Kg, em dias alternados, durante 5 semanas, observaram redução de 70% do volume tumoral, em comparação com o grupo controle. Silva e colaboradores (2015), utilizando um modelo transgênico de tumor de pulmão em camundongos, relataram que o tratamento com a DACE 1mg/Kg, durante 21 dias, reduziu o volume dos tumores em 16%, além de diminuir o número de focos tumorais.

Desta forma, assim como observado em nosso estudo, estes dados demonstram que esquemas de tratamento combinado da cucurbitacina B com fármacos também apresentaram maior eficácia terapêutica na comparação com os tratamentos individualizados, ressaltando a importância e a necessidade de se explorar cada vez mais esquemas de terapia combinada para o tratamento de tumores.

Na Figura 3, são apresentadas imagens representativas dos animais e os tumores xenográficos de pulmão humano ao final do protocolo de tratamento utilizado, as quais complementam e corroboram os dados já

apresentados e discutidos em relação à importante atividade antitumoral da combinação DACE+paclitaxel.

Figura 3. Imagens representativas dos tumores nos animais após término dos tratamentos.



Quatro dias após a última dose de tratamento, foram obtidas fotografias representativas dos animais de cada grupo experimental, onde se pode observar os tumores xenográficos de pulmão desenvolvidos na região próxima da pata inferior direita. Também foram obtidas fotografias representativas do volume dos tumores retirados após a eutanásia dos animais. (A) grupo controle; (B) DACE 1mg/Kg; (C) Paclitaxel 10mg/Kg e (D) DACE 1mg/Kg+Paclitaxel 10mg/Kg.

Em relação ao paclitaxel, Milanovic e colaboradores (2012) demonstraram, em um modelo xenográfico de glioblastoma, que o tratamento com paclitaxel, na dose de 10 mg/Kg, a cada três dias, durante quinze dias, resultou no crescimento dos tumores de modo similar ao grupo controle. No entanto, quando foi administrada a combinação do paclitaxel com o vadimezan, o crescimento dos tumores foi inibido completamente, além de reduzir significativamente o volume dos mesmos. Hou e colaboradores (2013) também demonstraram, em um modelo xenográfico de tumor de ovário, que o tratamento com seis doses de 20 mg/Kg do paclitaxel inibiu em 63,6% o crescimento

tumoral. Nesta tese, a inibição do crescimento do tumor xenográfico de pulmão no grupo tratado com paclitaxel 10 mg/Kg foi de 27,5%, valor inferior ao obtido no estudo de Hou e colaboradores, possivelmente devido ao fato de que a dose aplicada em nosso estudo ter sido equivalente a metade da dose testada no estudo de Hou e seus colegas e também por tratar-se de tumores diferentes. Em outro trabalho com modelo xenográfico de carcinoma de ovário, Oliva e colaboradores (2012) também observaram sinergismo com esquemas de tratamentos combinando o paclitaxel com cisplatina ou bevacizumabe, mostrando que além de inibir completamente o crescimento dos tumores, o tratamento combinado também reduziu o acúmulo de líquido ascítico, a disseminação de metástases, e possibilitou o aumento da sobrevivência dos animais, em comparação com os tratamentos individualizados.

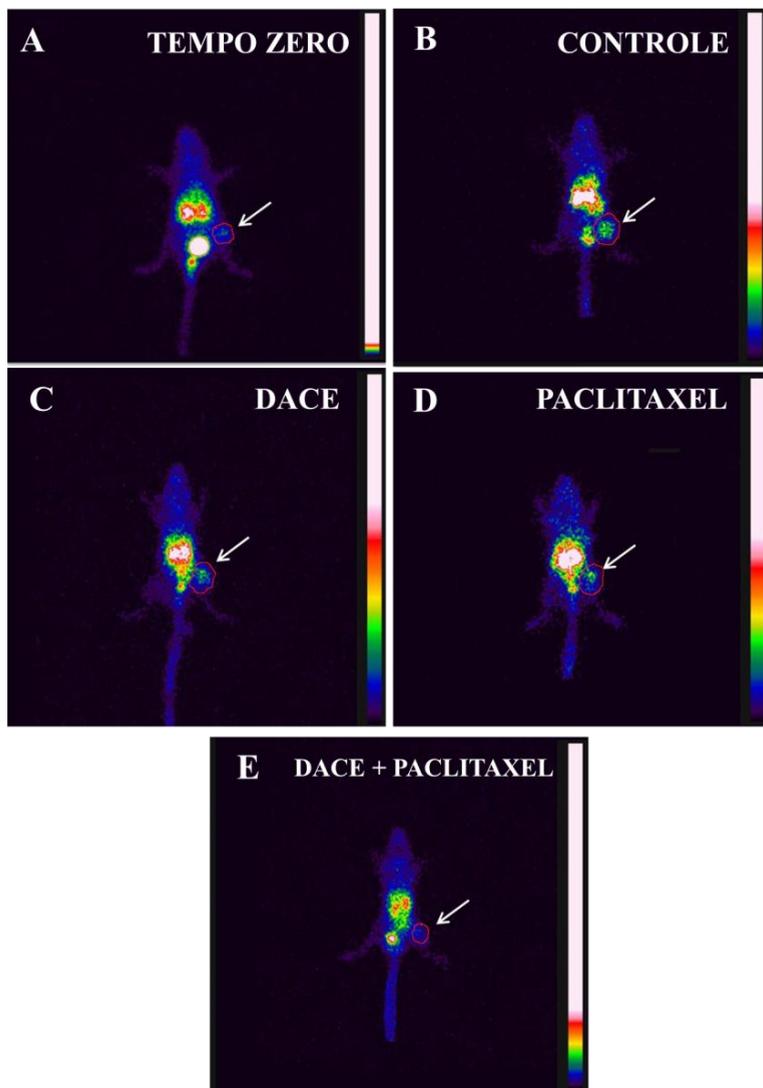
Comparando estes dados citados com os resultados obtidos, ficam evidentes a importância e as vantagens de se explorar cada vez mais novas estratégias terapêuticas combinando diferentes fármacos nos mais diversos modelos de tumores humanos, já que os tratamentos antitumorais combinados são comprovadamente mais eficazes e menos susceptíveis ao surgimento de resistência e disseminação de metástases, além de causarem efeitos mínimos de toxicidade aguda.

3.2 Imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em camundongos Balb/c nusdes com tumor xenográfico de pulmão, antes e após os tratamentos

A medida tumoral constitui uma análise preditiva e amplamente utilizada para determinação da atividade antitumoral em modelos pré-clínicos animais; entretanto, ela não é considerada um indicador preciso de eficácia antitumoral, uma vez que após a quimioterapia, por exemplo, os tumores passam a ser constituídos de quantidade variável de tecidos não ativos, tais como tecidos necróticos, tecidos fibróticos e células em processo de morte celular, que compõem a massa tumoral residual após tratamento. Portanto, ao final de um protocolo experimental de tratamento antitumoral, o volume tumoral não traduz com precisão o estado residual da doença (KUBOTA, 2001). Neste contexto, a obtenção de imagens cintilográficas com radioisótopos se torna uma ferramenta importante para, juntamente com os dados de medida do volume tumoral, comprovar a eficácia antitumoral dos tratamentos. Por meio da obtenção de imagens cintilográficas (Figura 4), foi quantificada a razão entre a relação alvo/não alvo inicial e final dos tratamentos a partir do delineamento da região alvo (tumor) e não alvo (músculo contralateral).

As imagens foram obtidas 4 h após administração IV do radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, e possibilitou avaliar os dados de massa tumoral residual viável (MTRV) para cada grupo de tratamento.

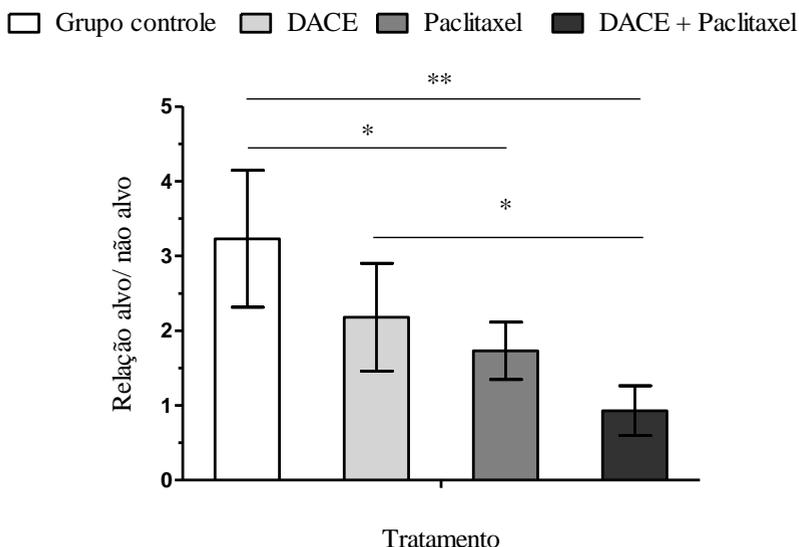
Figura 4. Imagens cintilográficas representativas de tumores xenográficos de pulmão humano, antes e após os diferentes tratamentos.



As imagens foram obtidas 4 h após a administração IV do radioisótopo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, antes e após os tratamentos. A região circutada na cor vermelha indica a região alvo (tumor). Cada imagem representa: (A) imagens no tempo zero; após tratamentos com: (B) grupo controle; (C) DACE 1mg/Kg; (D) Paclitaxel 10mg/Kg; (E) DACE 1mg/Kg+Paclitaxel 10mg/Kg.

Conforme apresentado na Figura 5, as razões das relações alvo/não alvo obtidas para os grupos controle, DACE, paclitaxel e DACE+paclitaxel foram, respectivamente, de: $3,23 \pm 0,374$; $2,18 \pm 0,294$; $1,73 \pm 0,383$ e $0,93 \pm 0,136$. Além de inibirem o crescimento dos tumores, os tratamentos também reduziram a MTRV. Na comparação com o grupo controle, os tratamentos com DACE 1 mg/Kg, paclitaxel 10 mg/Kg e a combinação reduziram a MTRV em 32,5%; 46,4% e 71,2%, respectivamente.

Figura 5. Valores de razão entre a relação alvo/não final e inicial obtidos por meio de imagens cintilográficas de camundongos Balb/c nude com tumor de pulmão submetidos a diferentes tratamentos.



Ao longo de 25 dias de experimento, os animais receberam seis administrações IV de veículo (grupo controle), DACE 1mg/Kg, Paclitaxel 10mg/Kg e a DACE 1mg/Kg + Paclitaxel 10mg/Kg. Por meio da obtenção de imagens cintilográficas, foi quantificada a razão entre a relação alvo/não alvo inicial e final dos tratamentos a partir do delineamento da região alvo (tumor) e não alvo

(músculo contralateral). O nível de significância foi considerado para valores de $p < 0,05$ e os dados expressos como média \pm erro padrão da média ($n=6$ animais por grupo). Os símbolos indicam diferenças estatísticas significativas da relação alvo/não alvo final do tratamento, quando comparada ao início do tratamento de cada grupo experimental, sendo $*p < 0,005$ e $**p < 0,0001$, após análise de variância (One-Way ANOVA, seguida do teste t Tukey).

Conforme já apresentado e discutido em relação à medida tumoral, novamente o tratamento combinado foi o mais eficaz ao reduzir a MTRV em 71,2%. Este dado é interessante e confirma a hipótese deste estudo, já que o tratamento combinado apresentou inibição do crescimento do tumor de 59% e redução da MTRV de 71,2%, possivelmente devido ao aparecimento de áreas de necrose, fibrose e morte celular via apoptose no tecido tumoral após a administração do tratamento combinado.

A redução mais potente da MTRV relativa ao tratamento combinado, quando comparada com as dos tratamentos individuais permite inferir que este regime de tratamento é menos susceptível ao surgimento de resistência das células tumorais de pulmão, justamente um dos principais objetivos da aplicação de esquemas de terapia antitumoral combinada (CHOU, 2006; CUSTODIO; MÉNDEZ; PROVENCIO, 2012; KOH et al., 2012).

Os valores encontrados para essas razões corroboram os dados já apresentados e discutidos para a atividade antitumoral, no item 3.1, e também reproduzem e comprovam os resultados do tratamento combinado obtidos com os experimentos de elucidação do mecanismo dos efeitos citotóxicos *in vitro*, apresentados e discutidos no capítulo II desta Tese. Nele, foi demonstrado que os efeitos sinérgicos da combinação DACE+paclitaxel foram devidos ao bloqueio da fase G2/M do ciclo celular, à inibição da sinalização de vias de proliferação celular, tais como AKT e STAT3, ao aumento da expressão da p53, à redução da expressão da survivina, alterações da actina do citoesqueleto, e à indução de morte celular via apoptose dependente de caspases nas células tumorais A549. Nos experimentos *in vitro*, foi observado que o tratamento combinado reduziu a expressão de proteases de matriz extracelular envolvidas com metástase, principalmente a MMP-2. Assim, a modulação de metástase poderia ser outro efeito que pode auxiliar a explicar a maior atividade antitumoral observada no modelo *in vivo*. Outro ponto que pode auxiliar a explicar a maior eficácia antitumoral da combinação é com relação à proteína de efluxo glicoproteína-P. Sabe-se que o paclitaxel é um fármaco passível de

efluxo por ser substrato desta proteína (JANG; WIENTJES; AU, 2001). Tumores resistentes e recorrentes aos tratamentos quimioterápicos, na maioria dos casos, superexpressam genes de resistência aos fármacos, os quais codificam a síntese da glicoproteína-P, induzindo ao maior efluxo dos fármacos para o meio extracelular, com prejuízo da ação farmacológica e o desenvolvimento de resistência das células tumorais ao tratamento quimioterápico (CALLAGHAN; LUK; BEBAWY, 2014). Neste contexto, também é conhecido que as cucurbitacinas, inclusive a cucurbitacina B, precursora de síntese da DACE, atuam como inibidores de efluxo mediado pela glicoproteína-P, sendo um dos fatores responsáveis pelo promissor sinergismo antitumoral demonstrado para esta classe de moléculas, quando administradas em esquemas de tratamento com fármacos antineoplásicos (RAMALHETE et al., 2009; ABDALLAH et al., 2015; SUN et al., 2015). Estes achados confirmam que a quantidade residual de células tumorais viáveis presentes nos animais tratados com a combinação DACE + paclitaxel foi significativamente reduzida, em comparação com o grupo controle e os tratamentos individualmente, o que comprova a maior efetividade terapêutica e o sinergismo obtido com o esquema de tratamento combinado neste modelo de tumor xenográfico de pulmão humano.

3.3 Investigação da toxicidade subcrônica dos tratamentos

3.3.1 Monitoramento do peso dos animais

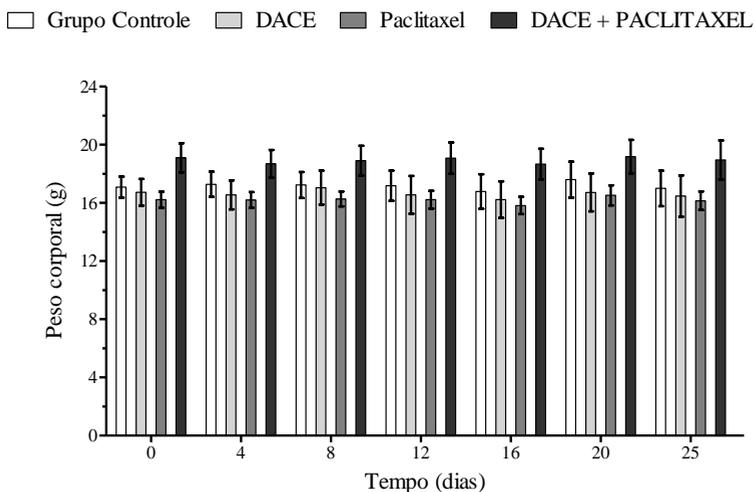
A variação do peso corporal é um importante indicador de toxicidade aguda proveniente de tratamentos com fármacos e, portanto, constitui um dos parâmetros que devem ser monitorados durante ensaios pré-clínicos com modelos experimentais em animais (ANVISA, 2010).

Conforme apresentado na Figura 6, pode-se observar que as variações de peso detectadas para todos os animais dos quatro grupos experimentais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o peso dos animais no tempo zero para cada tratamento.

Durante o procedimento experimental, foi observado que os animais do grupo controle mantiveram o peso até o dia 12, com uma discreta redução do peso no dia 16, o qual foi recuperado no dia 20 e mantido similar ao início do tratamento no final do experimento no dia 25. Em relação aos animais que receberam somente a DACE, na dose de 1 mg/Kg, foi observada uma discreta redução do peso no dia 4 após a primeira dose, com recuperação do peso do tempo zero no dia 8, seguido de uma redução mínima do peso nos dias 12 e 16, com recuperação e

manutenção do peso do tempo zero nos dias 20 e 25. Para os animais do grupo tratado com paclitaxel, na dose de 10 mg/Kg, foi observada manutenção do peso nos dias 4, 8 e 12, com uma discreta redução do peso no dia 16, seguida de ganho e recuperação do peso no dia 20 e manutenção de peso similar ao do tempo zero no dia 25. No grupo de animais que recebeu a combinação DACE 1mg/Kg+paclitaxel 10 mg/Kg foi detectada uma discreta redução do peso após a primeira dose no dia 4, com recuperação do peso do tempo zero nos dias 8 e 12, seguido de uma discreta redução do peso no dia 16, ganho de peso no dia 20 e manutenção do peso inicial ao final do tratamento no dia 25.

Figura 6. Variação do peso corporal de camundongos Balb/c nudes com tumor xenográfico de pulmão, após diferentes tratamentos.



Ao longo dos 25 dias de experimento, os animais receberam seis administrações IV de: veículo (grupo controle), DACE 1mg/Kg, Paclitaxel 10 mg/Kg e a combinação DACE 1mg/Kg + Paclitaxel 10 mg/Kg. O peso corporal dos animais foi mensurado a cada 4 dias após cada dose administrada. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), e os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n=6$ animais por grupo).

Analisados em conjunto, estes dados comprovam que todos os grupos experimentais não apresentaram alterações significativas de peso

durante os tratamentos e, inclusive, mantiveram o peso inicial ao final do protocolo experimental.

Ao final dos tratamentos, foi observado o aparecimento de uma moderada reação de hipersensibilidade e área de necrose nas caudas de aproximadamente 50% dos animais de todos os grupos experimentais (Figura 7). Nas últimas duas doses dos tratamentos administrados, essa reação de hipersensibilidade foi detectada de modo mais evidente.

Figura 7. Fotografia ilustrativa da reação cutânea observada após administração intravenosa caudal dos tratamentos.



Possivelmente, este efeito foi causado pelo veículo no qual foram preparadas as soluções da DACE e do paclitaxel, que foi uma mistura de Cremophor®/etanol com solução salina 0,9% (1:5, v/v). A reação de hipersensibilidade cutânea é um dos principais efeitos adversos causados pela administração intravenosa do Cremophor®, inclusive em pacientes que recebem terapia antitumoral com paclitaxel preparada com este veículo (GELDERBLOM et al., 2001; SINGLA, GARG, AGGARWAL, 2002; DESAI et al, 2006). Neste estudo, o Cremophor® foi selecionado como veículo dos tratamentos porque é o veículo no qual o paclitaxel é preparado para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão e também devido ao caráter hidrofóbico tanto da DACE como do paclitaxel, o que exigiu o uso de um veículo que possibilitasse a solubilização dos mesmos. Apesar da hipersensibilidade cutânea observada na cauda dos animais, não foram observadas alterações significativas de peso durante todos os tratamentos, o que sugere que a hipersensibilidade relacionada ao Cremophor® foi uma reação localizada e limitada à cauda dos animais.

Também é importante ressaltar que nenhuma morte foi observada para os animais dos quatro grupos experimentais avaliados. Estes dados corroboram os resultados já apresentados e discutidos quanto à variação do peso dos animais, o que permite inferir que os tratamentos com o veículo (grupo controle), DACE e paclitaxel individualmente e

combinados parecem exercer efeitos mínimos de toxicidade subcrônica nos animais Balb/c nusdes com tumor xenográfico de pulmão.

3.3.2 Avaliação histológica dos tecidos hepático e renal após os diferentes tratamentos

Não foram observadas alterações histológicas relacionadas com toxicidade no cérebro, coração e baço dos animais de todos os grupos de tratamento. No entanto, o tecido hepático apresentou alterações histológicas sugestivas de toxicidade, principalmente nos animais tratados com paclitaxel individualmente, na dose de 10 mg/Kg.

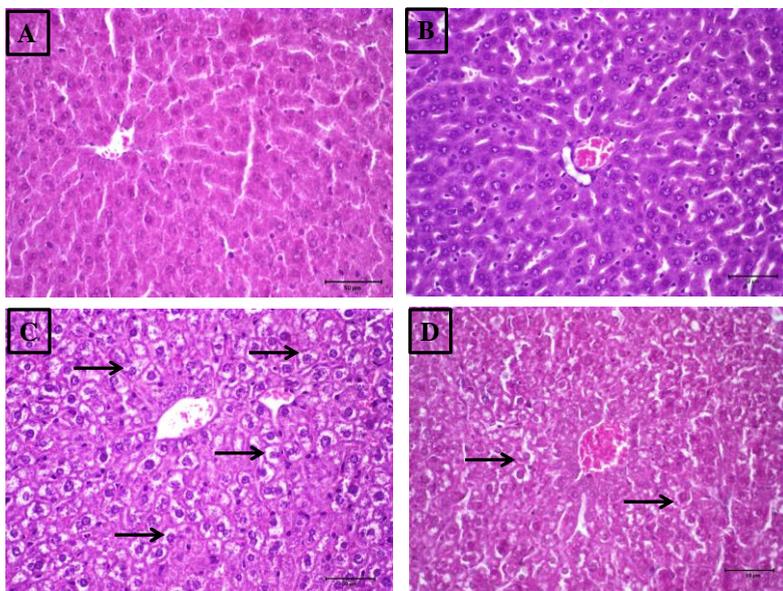
Conforme apresentado nas imagens da Figura 8, pode-se observar que o tecido hepático dos animais do grupo controle e do tratamento com DACE 1 mg/Kg não apresentou alterações histológicas (Figuras 8A e 8B). Por outro lado, o tecido hepático dos animais que receberam tratamento com paclitaxel 10 mg/Kg (figura 8C) apresentou alterações histológicas classificadas como degeneração hidrópica severa, enquanto que os animais que receberam tratamento combinado DACE+paclitaxel (Figura 8D) também apresentaram degeneração hidrópica dos hepatócitos, porém classificada como discreta.

Morfologicamente, as células com degeneração hidrópica apresentam citoplasma volumoso e pálido, porém sem alterações de núcleo. Órgãos acometidos por este processo apresentam volume aumentado, perda da elasticidade e palidez devido à compressão da microcirculação (BRASILEIRO FILHO, 2013). No tratamento realizado somente com paclitaxel (Figura 8C), ficou evidente que a maioria dos hepatócitos apresenta degeneração hidrópica, enquanto que com o tratamento combinado (Figura 8D), os hepatócitos apresentaram pouco edema celular e com menor frequência, em comparação com os hepatócitos da Figura 8C. Para o grupo controle (Figura 8A) e o grupo tratado com a DACE individualmente (Figura 8B) não foram observadas alterações histológicas.

A degeneração hidrópica, também descrita como edema celular ou tumefação celular, é um processo de lesão celular não letal caracterizado por acúmulo de água no citoplasma das células, neste caso nos hepatócitos. Tal processo de degeneração é observado com mais frequência em células parenquimatosas, principalmente, dos rins, fígado e coração. Pode ser causada por agentes físicos, químicos (toxinas, fármacos) e/ou biológicos (hipóxia, infecções virais, processo inflamatório), o que causa um desequilíbrio do gradiente osmótico com perda da regulação do volume celular, devido ao comprometimento da bomba de Na^+/K^+ ATPase. É um processo reversível e, caso o agente

lesivo seja retirado, as células podem retomar as funções normais, geralmente sem nenhum comprometimento funcional do órgão (BRASILEIRO FILHO, 2013).

Figura 8. Fotomicrografias (400X) representativas de preparações histológicas coradas com hematoxilina-eosina do tecido hepático de camundongos Balb/c nude fêmeas com tumor xenográfico de pulmão, após diferentes tratamentos.



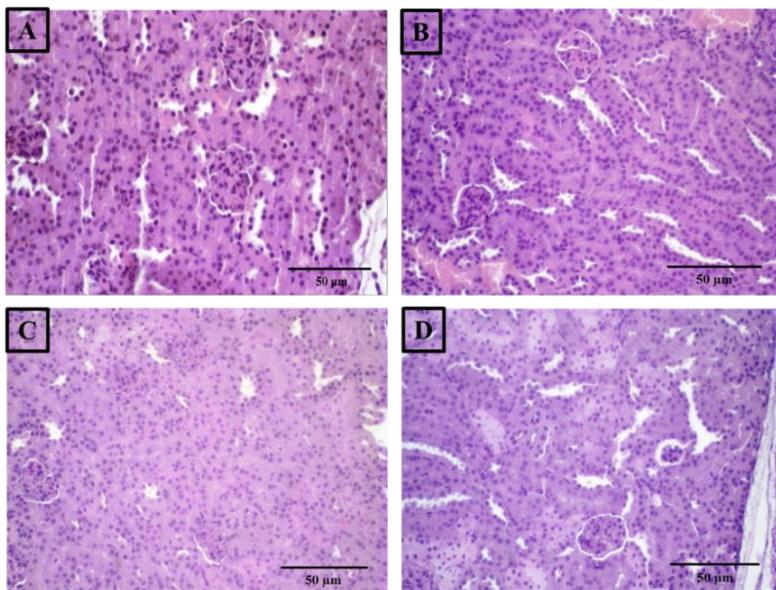
Os animais receberam seis doses por via IV. (A) grupo controle; (B) DACE 1mg/Kg; (C) Paclitaxel 10mg/Kg; (D) DACE 1mg/Kg + Paclitaxel 10mg/Kg. As setas indicam hepatócitos com degeneração hidrópica.

É conhecido que o paclitaxel pode induzir alterações discretas na função hepática, principalmente com elevações na atividade de enzimas, tais como a fosfatase alcalina, as transaminases, e nos teores de bilirrubina. Apesar disso, não tem sido relatado na literatura casos de necrose ou de insuficiência hepática diretamente relacionados e comprovados, após o tratamento com paclitaxel (MANDALIYA et al., 2015). No entanto, sabe-se que pacientes com câncer e outras comorbidades, que interferem na função hepática, tais como hepatites, tumor hepático e cirrose, apresentam metabolismo e excreção mais lentos do paclitaxel, o que pode comprometer ainda mais a função hepática e potencializar o quadro de toxicidade hepática nestes pacientes

(VENOOK et al., 1998; JOERGER et al., 2007). Estes dados histológicos também corroboram a hipótese deste estudo. Além de o tratamento combinado ter apresentado uma atividade antitumoral mais potente e promissora, ele também demonstrou discretas alterações histológicas dos hepatócitos, na comparação com o tratamento com paclitaxel individualmente, a qual foi classificada como severa. Portanto, a função hepática dos animais tratados com a combinação DACE+paclitaxel parece ter sido menos prejudicada, em comparação com o tratamento realizado com paclitaxel individualmente. Cumpre citar que o tratamento somente com a DACE não induziu degeneração hidrópica dos hepatócitos.

Em relação ao tecido renal, não foram observadas alterações histológicas relacionadas com lesão glomerular e nefrotoxicidade, conforme as fotomicrografias representativas apresentadas na Figura 9. Portanto, nenhum esquema de tratamento induziu algum tipo de dano no tecido renal.

Figura 9. Fotomicrografias (400X) representativas de preparações histológicas coradas com hematoxilina-eosina do tecido renal de camundongos Balb/c nude fêmeas com tumor xenográfico de pulmão, após diferentes tratamentos.



Os animais receberam seis doses por via IV. (A) grupo controle; (B) DACE 1mg/Kg; (C) Paclitaxel 10mg/Kg; (D) DACE 1mg/Kg + Paclitaxel 10mg/Kg.

Diferentemente do observado em nosso estudo, Rabah (2010) demonstrou que o tratamento somente com paclitaxel, em doses únicas de 0,6; 1,15 e 1,7 mg/Kg, pela via intraperitoneal de camundongos induziu nefrotoxicidade aguda, evidenciada pela observação de áreas de necrose e apoptose dos túbulos renais, atrofia focal dos glomérulos, congestão vascular e degeneração dos vasos sanguíneos renais e dano à membrana glomerular.

3.3.3 Estudo dos marcadores bioquímicos das funções hepática e renal

Além da análise histológica dos tecidos hepático e renal, também foi avaliado se os diferentes tratamentos causaram alterações de parâmetros bioquímicos indicadores das funções hepática e renal. Foram analisados os seguintes parâmetros no soro de todos os animais: albumina, proteínas totais, fosfatase alcalina, transaminases hepáticas (TGO e TGP) e uréia, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2, a seguir.

Tabela 2. Análise dos marcadores bioquímicos das funções hepática e renal no soro de camundongos Balb/c nudes com tumor xenográfico de pulmão, após diferentes tratamentos.

| Parâmetro bioquímico | Grupo controle | DACE 1 mg/Kg | Paclitaxel 10 mg/Kg | DACE 1 mg/Kg + Paclitaxel 10 mg/Kg |
|--------------------------|----------------|---------------|---------------------|------------------------------------|
| Albumina (mg/dL) | 2,15 ± 0,14 | 1,98 ± 0,11 | 2,22 ± 0,16 | 2,18 ± 0,15 |
| Proteínas totais (mg/dL) | 3 ± 0,13 | 3,02 ± 0,13 | 3,41 ± 0,20 | 2,82 ± 0,13 |
| Fosfatase Alcalina (U/L) | 61,80 ± 8,15 | 68,10 ± 12,12 | 67,30 ± 13,30 | 58,10 ± 7,80 |
| AST (U/L) | 82,5 ± 9,93 | 95,4 ± 17,8* | 78,2 ± 8,32 | 49,1 ± 4,40* |
| ALT (U/L) | 13,1 ± 2 | 24,6 ± 5,10* | 20,6 ± 2,86 | 14,1 ± 2,60* |
| Uréia (mg/dL) | 48,70 ± 2,50 | 50,20 ± 13,90 | 60,80 ± 2,80 | 62 ± 6,75 |

Dados expressos como média ± erro padrão da média (n = 6 animais/grupo de tratamento). Os resultados dos tratamentos avaliados foram comparados estatisticamente. *Foram observadas diferenças estatísticas significativas apenas na comparação dos parâmetros de função hepática, TGO e TGP, entre os grupos

que receberam tratamento com DACE individualmente e DACE+paclitaxel ($p < 0,05$, ANOVA One-Way, seguida do post teste de Tukey).

Todos os esquemas de tratamento testados não alteraram significativamente os parâmetros bioquímicos de albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina na comparação dos grupos tratados com o grupo controle. No entanto, foi detectada a elevação da atividade das enzimas hepáticas AST e ALT nos grupos que receberam tratamento com a DACE e o paclitaxel, individualmente, quando comparados com o grupo controle. Estes dados corroboram parcialmente os dados do estudo de Mandaliya e colaboradores (2015), no qual foi descrito que o tratamento combinado do paclitaxel com trastuzumabe, administrado para uma paciente com tumor de mama, induziu inicialmente elevações discretas na atividade das enzimas TGO e TGP, mas com posterior indução de necrose hepática aguda, que foi detectada somente após o óbito da paciente. Este caso é inédito e preocupante, porque foi o primeiro relato de necrose hepática aguda, após tratamento com paclitaxel, já que se sabia que o tratamento com este fármaco induzia apenas alterações discretas nos níveis dos marcadores de função hepática, sem maiores complicações.

Em relação a concentração sérica de uréia, marcador de função renal, não foi observada alteração estatística significativa nos diferentes grupos de tratamento avaliados, o que indica que nenhum esquema de tratamento induziu dano à função renal. Estes dados também corroboram com os dados histológicos do tecido renal após os tratamentos. Portanto, nenhum esquema de tratamento avaliado demonstrou induzir alterações sugestivas de nefrotoxicidade nos animais, já que não foram observadas alterações histológicas (Figura 9) e bioquímicas (Tabela 2) da função renal.

DISCUSSÃO GERAL

Os produtos naturais, obtidos a partir de diferentes fontes, tais como plantas, fungos, organismos marinhos e microorganismos, constituem fonte inesgotável e promissora para a obtenção e desenvolvimento de fármacos com as mais distintas atividades farmacológicas (CRAGG; NEWMAN, 2013). Alguns fármacos obtidos direta ou indiretamente de fontes naturais são bastante conhecidos por seus efeitos antiproliferativos, sendo inclusive aplicados com sucesso na clínica oncológica para o tratamento de diferentes tipos de tumor. Como exemplos, pode-se citar: vinblastina e vincristina, que são alcaloides da vinca e isoladas de *Catharanthus roseus*; a camptotecina isolada de *Camptotheca acuminata* (OBERLIES, KROLL, 2004) e o paclitaxel obtido da *Taxus brevifolia* (WANI, WALL, 1996; BARBUTI; CHEN, 2015). Também foram desenvolvidos e aprovados para uso clínico os derivados semissintéticos da vinblastina, a vinorelbina e a vindesina (ALI et al., 2012), o irinotecano como derivado da camptotecina (BASILI; MORO, 2009), e o docetaxel como derivado do taxol (MONTERO et al., 2005). Inclusive, os compostos obtidos por síntese ou semissíntese orgânica também podem ser protótipos para novas moléculas, com possibilidade de melhorar a eficácia terapêutica e o perfil de toxicidade (KEEP et al., 2011; FOX; MYUNG, 2012).

No grupo diversificado dos metabólitos secundários de plantas, estão inseridas as cucurbitacinas, reconhecidas por suas comprovadas atividades citotóxica e antitumoral (RÍOS et al., 2012). Nos últimos anos, as cucurbitacinas e seus derivados semissintéticos foram extensivamente estudados, principalmente com relação aos seus efeitos citotóxicos frente a diferentes células tumorais humanas, e seus efeitos antitumorais em animais. Estas informações constam na Revisão Bibliográfica (capítulo I), no item das Cucurbitacinas.

Apesar da promissora atividade citotóxica das cucurbitacinas e seus derivados, a aplicação das cucurbitacinas como opção terapêutica para tratamento do câncer ainda não é uma realidade, devido a sua toxicidade considerável (GABRIELSEN et al., 2013), sendo descrito somente o relato de um estudo clínico para esta classe de compostos (LU; YU; XU, 2012). Uma possibilidade interessante para atenuar a toxicidade das cucurbitacinas pode ser a associação desta em esquemas combinados com fármacos antineoplásicos já aplicados na clínica, conforme referenciado no item 3.1 do capítulo IV, quando da apresentação e discussão dos resultados. Na área da oncologia, é comum o uso de fármacos em esquemas de tratamento combinado, com a finalidade de

umentar a eficácia dos mesmos e reduzir o risco de reaparecimento de células tumorais multirresistentes após os tratamentos. Tais combinações de fármacos que demonstram potencial sinergismo *in vitro* possibilitam o mesmo ou até maior efeito terapêutico com menor dose *in vivo* e, possivelmente, redução da toxicidade sistêmica (CHEONG et al., 2005; CHOU, 2006; KOMAROVA; BOLAND, 2013). Assim, o sinergismo entre novos derivados de cucurbitacinas e fármacos já empregados na clínica representa uma estratégia a ser explorada para o tratamento de diferentes tipos de tumores. Por isso, o objetivo geral desta Tese foi avaliar os efeitos citotóxicos dos tratamentos combinados da DACE com três fármacos antineoplásicos (cisplatina, irinotecano e paclitaxel) frente às células de tumor humano de pulmão de células não pequenas (linhagem A549), propor o mecanismo de morte celular *in vitro* para tais combinações, e avaliar a ação antitumoral da combinação mais ativa em um modelo xenográfico murino de tumor de pulmão.

Inicialmente, foi avaliada qual linhagem celular tumoral seria mais sensível aos efeitos antiproliferativos da DACE. As linhagens celulares humanas analisadas foram: RD (rabdomyosarcoma), LNCaP (próstata), HCT8 (ileocecal) e A549 (pulmão) (ver Table 1 do artigo 1, capítulo II). As células A549 foram as mais sensíveis aos efeitos da DACE e, portanto, selecionadas para a continuidade do estudo (ver Table 2 do artigo 1, capítulo II). A etapa seguinte consistiu da investigação dos efeitos antiproliferativos sinérgicos da DACE com cisplatina, irinotecano ou paclitaxel, nas células A549. Todas as combinações apresentaram efeitos sinérgicos (ver Table 3 do artigo 1, capítulo II). Para o estudo do mecanismo de ação citotóxica, foram usadas diferentes estratégias metodológicas, com a finalidade de comparar os efeitos dos tratamentos individualmente e combinados. Os tratamentos combinados foram mais ativos e induziram bloqueio da fase G2/M do ciclo celular, modularam a expressão de proteínas, tais como survivina e p53, interferiram em vias de sinalização de proliferação celular como as vias da AKT e STAT3, além de inibirem completamente o potencial clonogênico das células tumorais A549, após a remoção dos tratamentos. As combinações da DACE com os três fármacos também induziram alterações morfológicas na F-actina do citoesqueleto e causaram morte celular via apoptose. Também foi demonstrado que a morte celular induzida pelos tratamentos foi dependente da atividade de caspases. Outro ponto interessante observado foi que o pré-tratamento com um agente oxidante, o BSO, potencializou o efeito citotóxico dos tratamentos, enquanto que o pré-tratamento com um agente antioxidante, a NAC, atenuou este efeito. Os esquemas de tratamento

combinado também não alteraram a proliferação de células não tumorais de pulmão humano (MRC-5). O tratamento com a DACE, individualmente, também apresentou potencial inibitório nos ensaios de invasão e migração celulares. Já os tratamentos combinados modularam de modo mais ativo as vias de sinalização celular relacionadas com a progressão de metástase (MMP-2, MMP-9, E-caderina, FAK e cofilina-1). Todos estes dados foram compilados e publicados recentemente (MAROSTICA et al., 2015a), e constam no capítulo II. De posse deste conjunto de dados, pode-se concluir que todos os esquemas combinados de tratamento foram mais ativos do que os tratamentos individualmente, de acordo com os resultados comentados acima, sendo o mais promissor a combinação DACE+paclitaxel.

Na etapa seguinte, foi estabelecido um modelo de tumor xenográfico de pulmão por meio da inoculação de células tumorais A549, pela via subcutânea, em camundongos fêmeas nudes da linhagem Balb/c. Após 30 dias da inoculação, os tumores cresceram e se desenvolveram satisfatoriamente. Histologicamente, os tumores apresentaram características de malignidade, com células de núcleo proeminente e relação núcleo/citoplasma aumentada, além da característica de invasividade aos tecidos adjacentes. O padrão de organização das células nos tumores foi heterogêneo, com aspecto misto, sólido, acinar ou mucinoso lepidico. Esta característica de heterogeneidade histopatológica dos tumores de pulmão é, inclusive, descrita como um dos principais fatores que dificultam seu tratamento e contribuem diretamente para a alta taxa de mortalidade dos pacientes com este tipo de câncer (JAKOBSEN; SORENSEN, 2012; CHEN et al., 2014). Para detectar e monitorar os tumores por meio de uma técnica de imagem, foi testada a administração do radioisótopo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ como agente de imagem, já que os tumores de pulmão geralmente superexpressam receptores de bombesina (REUBI et al., 2002). Após 4 h da administração intravenosa de uma dose de 37 MBq do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, foi possível obter imagens cintilográficas dos tumores nos animais. Estes dados relativos ao estabelecimento do modelo xenográfico de tumor de pulmão, classificação histopatológica e detecção através de imagens cintilográficas também já foram publicados, e constam no capítulo III (MAROSTICA et al., 2015b). É importante mencionar que os resultados obtidos nesta etapa possibilitaram a continuidade do estudo, visando avaliar a atividade antitumoral e o perfil de toxicidade, após a administração aos animais do tratamento que se mostrou mais promissor

in vitro, que foi a combinação DACE+paclitaxel. Esta opção se deve ao fato de que a combinação selecionada apresentou sinergismo forte, testando-se a metade dos valores de IC_{50} da DACE e do paclitaxel, obtidos *in vitro*, em comparação com as combinações da DACE com cisplatina ou irinotecano, conforme apresentado no capítulo II (ver Table 3, artigo 1).

Para a avaliação da atividade antitumoral no modelo xenográfico de tumor de pulmão, os animais foram divididos em quatro grupos de tratamento: grupo controle (veículo), DACE 1 mg/Kg, paclitaxel 10 mg/Kg e DACE+paclitaxel nas mesmas doses dos tratamentos individuais. Foram administradas duas doses por semana, pela via intravenosa, num total de seis doses. Ao final dos tratamentos, não foi constatado óbito algum decorrente dos tratamentos ou da progressão tumoral. De modo geral, todos os esquemas de tratamento foram bem tolerados pelos animais, sendo que durante o período experimental (25 dias), o peso corporal dos animais não apresentou variações significativas. O grupo de animais tratados com a combinação DACE+paclitaxel apresentou o menor valor de volume relativo do tumor (VRT) e o maior percentual de inibição do crescimento dos tumores. Também, o tratamento combinado testado foi o único esquema capaz de reduzir significativamente o volume dos tumores, após cada dose administrada. Estes dados corroboram os dados obtidos com a análise da relação alvo/não alvo final e inicial dos tumores nos animais. Através do cálculo desta relação, foi demonstrado que os animais que receberam o tratamento combinado apresentaram o menor valor, o que indica que este grupo, ao final do tratamento, apresentou maior redução da massa residual tumoral viável. O tecido hepático dos animais tratados somente com paclitaxel apresentou um quadro severo de degeneração hidrópica dos hepatócitos, enquanto que no tecido do grupo de animais tratados com a combinação, tal alteração foi discreta. Todos os tratamentos avaliados não induziram alterações significativas nos parâmetros bioquímicos indicadores de função hepática: albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina. Entretanto, nos grupos de tratamento com a DACE e paclitaxel individualmente, foram observadas elevações na atividade das enzimas hepáticas TGO e TGP, o que indica que estes esquemas de tratamento induzem algum dano para a função hepática, o que não foi observado no grupo controle e com o tratamento combinado. Para o tecido renal, não foram observadas alterações histológicas relacionadas com nefrotoxicidade para todos os esquemas de tratamento avaliados. Em relação aos níveis de uréia, um importante marcador bioquímico de função renal, também não foram observadas

alterações nos diferentes grupos. Portanto, o conjunto dos dados obtidos *in vivo* confirma o mais promissor efeito antitumoral e sinérgico da combinação DACE+paclitaxel, já observados *in vitro*, sem induzir danos para a histologia e as funções hepática e renal.

Conforme já abordado no item 2.3 da Revisão Bibliográfica, três requisitos são essenciais para que a investigação de uma potencial estratégia terapêutica ultrapasse os ensaios pré-clínicos e siga para as fases dos ensaios clínicos. Primeiro, o ideal é que a redução do crescimento do tumor no modelo pré-clínico não seja inferior a 50%, já que valores de inibição menores geralmente apresentam falha de eficácia terapêutica quando nas fases clínicas. Segundo, é obrigatório que o ensaio pré-clínico apresente um ganho de sobrevida, em relação aos fármacos já empregados na terapia padrão, sendo este um dos principais critérios de eficácia *in vivo*. Além disso, é importante que a terapia avaliada no modelo pré-clínico apresente resposta terapêutica eficiente, após o término do tratamento, pois se a terapia for descontinuada e o tumor retomar o crescimento, a probabilidade de a mesma ser eficaz no posterior ensaio clínico é reduzida consideravelmente (SANDLER et al., 2006; NATALE et al., 2009; KELLAR; EGAN; MORRIS, 2015). Neste estudo, o primeiro requisito foi alcançado com êxito apenas para a terapia combinada DACE+paclitaxel, que apresentou uma redução do crescimento tumoral de 59%. Apesar de esse dado ser relevante, é necessário continuar os estudos com ensaios de sobrevida e de análise da eficácia da resposta terapêutica, após a finalização dos tratamentos, usando o mesmo modelo animal, que possibilitem complementar e justificar a realização de ensaios clínicos com a combinação DACE+paclitaxel.

Os resultados desta Tese de Doutorado demonstraram correlação entre os dados obtidos *in vitro* e *in vivo* para os tratamentos avaliados, partindo do pressuposto que todas as etapas foram criteriosamente planejadas e executadas. Por fim, é importante ressaltar que esses dados são inéditos, tanto em relação aos tratamentos testados quanto ao modelo experimental empregado *in vivo*, e espera-se que eles possam contribuir para o aperfeiçoamento do conhecimento na área e estimular novos estudos que busquem eficácia terapêutica e melhoria na qualidade de vida dos pacientes em tratamento de câncer de pulmão do tipo células não pequenas.

CONCLUSÕES

- Foram detectados efeitos citotóxicos da DACE frente a quatro diferentes linhagens celulares tumorais humanas: RD (rabdiosarcoma), LNCaP (próstata), HCT8 (ileocecal) e A549 (pulmão), sendo que essa última foi a mais sensível e, por isso, selecionada para os estudos de sinergismo com diferentes fármacos antineoplásicos.
- A DACE apresentou efeitos antiproliferativos sinérgicos frente às células A549 com os três fármacos testados: cisplatina, irinotecano e paclitaxel.
- O mecanismo da ação antiproliferativa sinérgica da DACE associada com cisplatina, irinotecano e paclitaxel, nas células A549, ocorreu via: bloqueio da fase G2/M do ciclo celular, modulação da expressão de survivina e p53, inibição das vias de proliferação celular AKT e STAT3, perda da homeostase da F-actina do citoesqueleto e morte celular via apoptose.
- O mecanismo de morte celular via apoptose potencializado pelos tratamentos combinados foi dependente da ação de caspases. Os efeitos antiproliferativos foram potencializados pelo agente oxidante BSO, e foram atenuados pelo agente antioxidante NAC.
- Os tratamentos combinados da DACE com os três fármacos também inibiram completamente o potencial clonogênico das células A549, após a remoção dos mesmos.
- Proteínas que atuam em vias de migração celular, tais como E-caderina, cofilina e FAK, foram moduladas pelos tratamentos combinados da DACE com os três fármacos, inibindo a migração das células A549. A expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 também foi reduzida pelos tratamentos combinados, sugerindo que os mesmos são promissores por reduzirem a disseminação de metástases.
- Devido ao forte sinergismo, obtido com a metade das concentrações inibitórias a 50% da DACE e do paclitaxel, esta combinação foi selecionada para o estudo da atividade antitumoral em modelo xenográfico de tumor de pulmão.

- Após 30 dias da inoculação das células A549, através da via subcutânea, em animais Balb/c nudes fêmeas, foi estabelecido um modelo ectópico xenográfico de tumor de pulmão.
- Os tumores xenográficos de pulmão desenvolvidos nos animais apresentaram heterogeneidade quanto ao padrão de classificação histopatológica, com características de invasividade e malignidade, e com padrão variado quanto à organização das células tumorais.
- Os tumores xenográficos de pulmão desenvolvidos nos animais foram detectados por meio da administração do radioisótopo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ e obtenção de imagens cintilográficas, o que permitiu monitorar os tumores, antes e após a administração dos tratamentos.
- O tratamento combinado DACE+paclitaxel foi mais efetivo em inibir o crescimento dos tumores e reduzir a massa tumoral residual viável, quando comparado com os tratamentos individualmente.
- Todos os tratamentos administrados aos animais foram bem tolerados, sem alterações significativas de peso dos mesmos, ao longo do período experimental de 25 dias.
- O tratamento somente com paclitaxel induziu alterações histológicas significativas no tecido hepático dos animais; entretanto, com o tratamento combinado DACE+paclitaxel as mesmas foram apenas discretas.
- Na função hepática, nenhum esquema de tratamento testado causou alteração significativa dos parâmetros de albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina. No entanto, nos grupos tratados com a DACE e o paclitaxel, individualmente, foi detectado aumento da atividade das enzimas AST e ALT. Na função renal, nenhum esquema de tratamento induziu alteração dos níveis de uréia.

PERSPECTIVAS

- Determinar a sobrevivência dos animais, o comportamento dos tumores e a eficácia da resposta terapêutica, após a remoção dos mesmos esquemas de tratamentos já testados.
- Complementar os dados obtidos *in vivo*, por técnicas de imunohistoquímica para avaliação da morte celular via apoptose, atividade de caspases, angiogênese, MMP-2 e efeitos na via de sinalização do EGFR.
- Repetir os mesmos esquemas de tratamento administrados *in vivo* em cultura de células A549 para avaliar resistência e possível interferência da proteína de efluxo glicoproteína P nos tratamentos, com protocolo experimental de perfil crônico e de longa duração (60 dias). Inclusive testar o mesmo protocolo de tratamento com células de outros tipos de tumores humanos.
- Escrever um artigo de revisão com a totalidade de dados já publicados para o efeito antitumoral das cucurbitacinas tanto em modelos *in vitro* como também *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, H.M. et al. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 45-62, 2015.

ALI, R. et al. New anticâncer agentes: Recent developments in tumor therapy. **Anticancer Research**, v. 32, p. 2099-3006, 2012.

ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

ARIBI, A. et al. The triterpenoid cucurbitacin B augments the antiproliferative activity of chemotherapy in human breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 132, p. 2730-2737, 2012.

BARBUTI, A.M.; CHEN, Z. Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: Exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. **Cancers**, v. 7, p. 2360-2371, 2015.

BASILI, S.; MORO, S. Novel camptothecin derivatives as topoisomerase I inhibitors. **Expert Opinion on Therapeuti Patents**, v. 19, n. 5, p. 555-574, 2009.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

CALLAGHAN, R.; LUK, F.; BEBAWY, M. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: Time for a change of strategy? **Drug Metabolism & Disposition**, v. 42, p. 623-631, 2014.

CHEN, Z. et al. Non- small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, p. 535-546, 2014.

CHEONG, K. et al. Combination therapy versus single agent chemotherapy in non-small cell lung cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 6, p. 1693-1700, 2005.

CHOU, T.C. Theoretical basis, experimental design and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 621-681, 2006.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUSTODIO, A.; MÉNDEZ, M.; PROVENCIO, M. Targeted therapies for advanced non-small-cell lung cancer: current status and future implications. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 36-53, 2012.

De BARROS, A.L.B. et al. ^{99m}Tc-labeled bombesin analog for breast cancer identification. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 295, p. 2083-2090, 2013.

DESAI, N. et al. Increased Antitumor Activity, Intratumor Paclitaxel Concentrations, and Endothelial Cell Transport of Cremophor-Free, Albumin-Bound Paclitaxel, ABI-007, Compared with Cremophor-Based Paclitaxel. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1317-1324, 2006.

DINIZ, S. O. F. et al. Scintigraphic imaging using technetium-99m-labeled ceftizoxime in a experimental model of acute osteomyelitis in rats. **Nuclear Medicine Communications**, v. 29, p. 830-836, 2008.

FOX, J.T.; MYUNG, K. Cell-based high-throughput screens for the discovery of chemotherapeutic agents. **Oncotarget**, v. 3, p. 581-585, 2012.

GABRIELSEN, M. et al. Cucurbitacin covalent bonding to cysteine thiols: the filamentous-actin severing protein Cofilin1 as an exemplary target. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, p. 1-11, 2013.

GELDERBLUM, H. et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. **European Journal of Cancer**, v. 37, n. 13, p. 1590-1598, 2001.

HOU, W.J. et al. Dexamethasone inhibits the effect of paclitaxel on human ovarian carcinoma xenografts in nude mice. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, p. 2902-2908, 2013.

HUANG, G.S. et al. Potentiation of taxol efficacy by discodermolide in ovarian carcinoma xenograft-bearing mice. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 298-304, 2006.

IWANSKI, G.B. et al. Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 4, p. 998-1007, 2010.

JAKOBSEN, J.N.; SORENSEN, J.B. Intratumor heterogeneity and chemotherapy-induced changes in EGFR status in non-small cell lung cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, p. 289-299, 2012.

JANG, S.H.; WIENTJES.; AU, J.L. Kinetics of P-glycoprotein-mediated efflux of paclitaxel. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, p. 1236-1242, 2001.

JOERGER, M. et al. Safety and pharmacology of paclitaxel in patients with impaired liver function: a population pharmacokinetic-pharmacodynamic study. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 5, p. 622-633, 2007.

KAUSAR, H. et al. Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: Identification of intracellular thiols as critical targets. **Cancer Letters**, v. 332, p. 35-45, 2013.

KELLAR, A.; EGAN, C.; MORRIS, D. Preclinical murine models for lung cancer: Clinical trial applications. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-17, 2015.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 221-237, 2011.

KOH, P.K. et al. Targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC): Clinical developments and rationale for the combination with thoracic radiotherapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, 626-640, 2012.

KOMAROVA, N.L.; BOLAND, C.R. Cancer: Calculated treatment. **Nature**, v. 499, p. 291-292, 2013.

KUBOTA, K. From tumor biology to clinical PET: A review of positron emission tomography (PET) in oncology. **Annals of Nuclear Medicine**, v. 15, n. 6, p. 471–486, 2001.

LANG, K.L. et al. New cytotoxic cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Planta Medica**, v. 77, p. 1648-1651, 2011.

LANG, K.L. et al. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 3016-3030, 2012.

LANG, K.L. et al. Multivariate SAR and QSAR of cucurbitacin derivatives as cytotoxic compounds in a human lung adenocarcinoma cell line. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 48, p. 70-79, 2014.

LEITE, E. A. **Avaliação da toxicidade aguda e atividade antitumoral de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina**. 2010. 162 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2010.

LIU, T. et al. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, p. 15-22, 2010.

LU, P.; YU, B.; XU, J. Cucurbitacin B regulates myeloid cell differentiation and enhances antitumor immunity in patients with lung cancer. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 27, p. 495-503, 2012.

MANDALIYA, H. et al. A rare case of paclitaxel and/or trastuzumab induced acute hepatic necrosis. **Case Reports in Oncological Medicine**, v.2015, p. 1-2, 2015.

MAROSTICA, L.L. et al. Synergistic antiproliferative effects of a new cucurbitacin B derivative and chemotherapy drugs on lung cancer cell line A549. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, p. 1949-1960, 2015a.

MAROSTICA, L.L. et al. Feasibility study with ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin(7-14) as an agent to early visualization of lung tumour cells in nude mice. **Nuclear Medicine Communications**, p. 1-5, 2015b.

MILANOVIC, D. et al. The influence of the combined treatment with vadimezan (ASA404) and taxol on the growth of U251 glioblastoma xenografts. **BMC Cancer**, v. 12, p. 1-8, 2012.

MONTERO, A. et al. Docetaxel for treatment of solid tumours: A systematic review of clinical data. **The Lancet Oncology**, v. 6, n. 4, p. 229-239, 2005.

NATALE, R.B. et al. Vandetanib versus gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer: results from a two part , double-bind, randomized phase ii study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 15, p. 2523-2529, 2009.

OBERLIES, N.; KROLL, D. Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 129-135, 2004.

OLIVA, P. et al. Cisplatin plus paclitaxel and maintenance of bevacizumab on tumour progression, dissemination, and survival of ovarian carcinoma xenograft models. **British Journal of Cancer**, v. 107, p. 360-369, 2012.

RABAH, S.O. Acute Taxol nephrotoxicity: Histological and ultrastructural studies of mice kidney parenchyma. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, p. 105-114, 2010.

RAMALHETE, C. et al. New potent P-glycoprotein modulators with the cucurbitane scaffold and their synergistic interaction with doxorubicin on resistant cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 6942-6951, 2009.

REUBI, J.C. et al. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14). **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 1139-1146, 2002.

RÍOS, J.L. et al. Cucurbitacins as inducers of cell death and a rich source of potential anticancer compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 1663-1676, 2012.

ROLLAND, C. L. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 7, p. 1761-1771, 2009.

SANDLER, A. et al. Paclitaxel-Carboplatin alone or with Bevacizumab for non-small cell lung cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 24, p. 2542-2550, 2006.

SHAN, S.L. et al. Inhibitory effect of cucurbitacin E on the proliferation of ovarian cancer cells and its mechanism. **Chinese Journal of Cancer**, v. 29, p. 20-24, 2010.

SILVA, I.T. et al. Proliferative inhibition and apoptotic mechanism on human non-small cell lung cancer (A549 cells) of a novel Cucurbitacin from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **International Journal of Cancer Research**, v. 9, p. 54-68, 2013.

SILVA, I.T. et al. In vitro and in vivo antitumor activity of a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B. **Plos One**, v. 10, p. 1-19 2015.

SINGLA, A.K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 179-192, 2002.

SUN, Y. et al. Synergistic effect of cucurbitacin B in combination with curcumin *via* enhancing apoptosis induction and reversing multidrug resistance in human hepatoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 768, p. 28-40, 2015.

VENOOK, A.P. et al. Phase I and pharmacokinetic trial of paclitaxel in patients with hepatic dysfunction: Cancer and leukemia group B 9264. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 5, p. 1811-1819, 1998.

WAKIMOTO, N. et al. Cucurbitacin B has a potente antiproliferative effect on breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Science**, v. 99, p. 1793-1797, 2008.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: discovery to clinic – thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. **Cancer Research**, v. 55, n. 4, p. 753-760, 1995.

WANI, M. E.; WALL, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, n.1-2, p. 239-253, 1996.

YAMORI, T. et al. Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 88, n. 12, p. 1205-1210, 1997.

APÊNDICE I

Artigos publicados correspondentes a outras atividades de colaboração realizadas durante o período do doutorado (2012-2016):

MORITZ, M.I.G.; **MAROSTICA, L.L.**; BIANCO, E.M.; ALMEIDA, M.T.R.; CARRARO, J.L.; CABRERA, G.M.; PALERMO, J.A.; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. Polyoxygenated steroids from the octocoral *Leptogorgia punicea* and in vitro evaluation of their cytotoxic activity. **Marine Drugs**, v. 12, p. 5864-5880, 2014. **DOI:** 10.3390/md12125864

SCHNEIDER, N.F.Z.; GELLER, F.C.; PERSICH, L.; **MAROSTICA, L.L.**; PÁDUA, R.M.; KREIS, W.; BRAGA, F.C.; SIMÕES, C.M.O. Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by the cardenolides digitoxigenin monodigitoxoside and convallatoxin in human lung cancer cell line. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2015. **DOI:** 10.1080/14786419.2015.1055265

ANEXO A - Comprovante de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor (a) Professor (a) Mônica Cristina de Oliveira,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Investigação da Atividade antitumoral da associação de um derivado semissintético da cucurbitacina B (DACE) com paclitaxel em modelo animal, submetido a esta comissão pelo Protocolo 118/2015, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 22/06/2015.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>
Belo Horizonte, 22/06/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br