



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Tissiane Eid Barbosa Ashino

**AÇÃO DA PIPERLONGUMINA EM MODELO DE EXPOSIÇÃO
PULMONAR AO CARCINÓGENO BENZOPIRENO**

São José Do Rio Preto

2020

TISSIANE EID BARBOSA ASHINO

**AÇÃO DA PIPERLONGUMINA EM MODELO DE EXPOSIÇÃO
PULMONAR AO CARCINÓGENO BENZOPIRENO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª Dra. Ana Paula Girol

São José Do Rio Preto

2020

A825 Ashino, Tissiane Eid Barbosa
Ação da piperlongumina em modelo de exposição pulmonar ao
carcinógeno benzopireno / Tissiane Eid Barbosa Ashino. -- São José
do Rio Preto, 2020
44 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto
Orientadora: Ana Paula Girol

1. Câncer de pulmão. 2. Tabagismo. 3. Compostos bioativos
naturais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Tissiane Eid Barbosa Ashino

**AÇÃO DA PIPERLONGUMINA EM MODELO DE EXPOSIÇÃO
PULMONAR AO CARCINÓGENO BENZOPIRENO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Ana Paula Girol

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Girol
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Andréia de Haro Moreno
UNIFIPA – Catanduva

Prof^ª. Dr^ª. Giovana Aparecida Gonçalves Vidotti
UNIFIPA – Catanduva

São José do Rio Preto
05 de março de 2020

RESUMO

A poluição do ar e o uso de cigarro são as principais fontes de inalação e exposição a agentes carcinógenos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) resultantes da combustão incompleta de matéria orgânica e distribuídos amplamente no ambiente. O benzopireno é um dos principais HAP presentes no ambiente e com alta capacidade carcinogênica, sendo, portanto, usado em modelos experimentais in vivo. Investigações têm mostrado que os fármacos anti-inflamatórios podem reduzir a incidência de câncer de pulmão. Os compostos bioativos naturais (CBN) como os terpenos e flavonoides apresentam muitas propriedades, entre elas, redução da inflamação, estimulação do sistema imune e modulação de enzimas detoxificantes. Entre os CBNs destacamos a piperlongumina (PL), um alcaloide da *Piper longum*, que pode representar uma possibilidade de tratamento para o câncer de pulmão. Para o desenvolvimento do trabalho foram usados camundongos Balb/c divididos em 3 grupos (n=10/grupo): controle (sham), induzido por benzopireno (100 mg/kg, diluído em DMSO e administrado intraperitonealmente, i.p.) não tratado (BaP) e induzido por benzopireno e tratado com PL (2 mg/kg em DMSO a 10%, i.p.) a partir da oitava semana pós-indução (BaP/PL). Os animais foram pesados diariamente. A pletismografia para verificação de volume, frequência e ventilação pulmonares foi realizada na última semana do protocolo (12ª semana). Após, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue, lavado broncoalveolar e fragmentos dos pulmões. Os materiais foram processados para a quantificação de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA), genotoxicidade pelo teste do cometa em linfócitos e níveis de hemoglobina no sangue, análise histopatológica do pulmão, estudos imuno-histoquímicos da proteína anti-inflamatória anexina A1 (AnxA1), enzima pró-inflamatória ciclooxigenase 2 (COX-2), proteína anti-apoptótica Bcl-2 e fator de transcrição nuclear NF-kB, bem como dosagem das citocinas interleucina(IL)-1 β , IL-17 e fator de necrose tumoral (TNF)- α . Os resultados mostraram que não houve diferença de peso entre os grupos. Os níveis de volume pulmonar, frequência respiratória e ventilação pulmonar foram elevados em animais BaP em comparação com Sham (p <0,001). Houve redução significativa desses parâmetros pulmonares foi observada em camundongos tratados com PL (p <0,001). Ocorreu aumento de linfócitos, monócitos e neutrófilos (p <0,001) no LBA do grupo BaP em comparação com o Sham, mas a PL reduziu o número dessas células (p <0,05). Da mesma forma, níveis mais altos de hemoglobina foram encontrados no grupo BaP (p <0,01) em comparação ao Sham, com redução nos animais BaP / PL (p <0,01). Ainda, maior dano ao DNA foi identificado no

grupo BaP comparado ao sham. Houve redução significativa desses danos no grupo tratado com a PL. O tratamento também preservou a arquitetura pulmonar em comparação com os animais não tratados. Além disso, expressões elevadas de AnxA1 ($p < 0,01$), COX-2 ($p < 0,001$), Bcl-2 ($p < 0,01$) e NF-kB ($p < 0,001$) foram observadas no grupo BaP em relação ao Sham. O efeito anti-inflamatório e protetor do PL foi evidenciado pela redução significativa de COX-2 ($p < 0,05$), Bcl-2 ($p < 0,01$) e NF-kB ($p < 0,001$) e manutenção dos altos níveis de AnxA1. Ainda a administração da PL também reduziu os níveis de IL-1 β , IL-17 e TNF- α próximos aos animais controle. Os resultados desse estudo mostram a potencialidade da PL para tratamento de condições anti-inflamatórias e antitumorais do pulmão, com implicações terapêuticas promissoras.

Palavras-chave: Câncer de pulmão. Tabagismo. Compostos bioativos naturais.

ABSTRACT

Air pollution and cigarette use are the main sources of inhalation and exposure to carcinogenic agents, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) resulting from incomplete combustion of organic matter and widely distributed in the environment. Benzopyrene is one of the main PAHs present in the environment and has a high carcinogenic capacity, being therefore used in experimental models *in vivo*. Research has shown that anti-inflammatory drugs can reduce the incidence of lung cancer. Natural bioactive compound (NBC) such as terpenes and flavonoids have many properties, including reducing inflammation, stimulating the immune system and modulating detoxifying enzymes. Among the NBC we highlight piperlongumin (PL), an alkaloid of *Piper longum*, which may represent a possibility of treatment for lung cancer. For the development of the work, Balb / c mice divided into 3 groups (n = 10 / group) were used: control (sham), induced by benzopyrene (100 mg / kg, diluted in DMSO and administered intraperitoneally, ip) untreated (BaP) and induced by benzopyrene and treated with PL (2 mg / kg in 10% DMSO, ip) from the eighth week post-induction (BaP / PL). The animals were weighed daily. Plethysmography to check lung volume, frequency and ventilation was performed in the last week of the protocol (12th week). Afterwards, the animals were euthanized for blood collection, bronchoalveolar lavage and fragments of the lungs. The materials were processed for the quantification of inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage (BAL), genotoxicity by the comet test in lymphocytes and blood hemoglobin levels, histopathological analysis of the lung, immunohistochemical studies of the anti-inflammatory protein annexin A1 (AnxA1) , proinflammatory enzyme cyclooxygenase 2 (COX-2), anti-apoptotic protein Bcl-2 and nuclear transcription factor NF-kB, as well as measurement of cytokines interleukin (IL) - 1 β , IL-17 and tumor necrosis factor (TNF) - α . Our results showed that there was no difference in weight between the groups. Levels of lung volume, respiratory rate and lung ventilation were high in BaP animals compared to Sham (p <0.001). There was a significant reduction in these pulmonary parameters in mice treated with PL (p <0.001). There were increases in lymphocytes, monocytes and neutrophils (p <0.001) in the BAL of the BaP group compared to the Sham. But PL reduced the number of these cells (p <0.05). Likewise, higher levels of hemoglobin were found in the BaP group (p <0.01) compared to Sham, with a reduction in the BaP / PL animals (p <0.01). In addition, greater damage to DNA was identified in the BaP group compared to sham. There was a significant reduction in these damages in the group treated with PL. The treatment also preserved the lung architecture compared to untreated animals. In addition, high expressions of AnxA1 (p <0.01), COX-2 (p

<0.001), Bcl-2 (p <0.01) and NF-kB (p <0.001) were observed in the BaP group in relation to Sham. The anti-inflammatory and protective effect of PL was evidenced by the significant reduction of COX-2 (p <0.05), Bcl-2 (p <0.01) and NF-kB (p <0.001) and maintenance of high levels of AnxA1. PL administration also reduced the levels of IL-1 β , IL-17 and TNF- α close to the control animals. The results of this study show the potential of PL to treat anti-inflammatory and anti-tumor conditions of the lung, with promising therapeutic implications.

Keywords: Lung cancer. Smoking. Natural bioactive compound.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração de algumas das principais origens dos Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP).....	14
Figura 2 - Estrutura molecular do Benzopireno.....	15
Figura 3 - Estrutura molecular da Piperlongumina.....	16
Figura 4 –Pletismógrafo.....	20
Figura 5 - Análises fisiológicas de pletismografia e peso.....	24
Figura 6 – Análise bioquímica da hemoglobina no sangue total.....	25
Figura 7 – Núcleos de linfócitos pelo ensaio do cometa.....	26
Figura 8 – Análise quantitativa do lavado broncoalveolar.....	27
Figura 9 – Análise histopatológica do pulmão.....	28
Figura 10 – Análises das expressões de AnxA1, COX-2, Bcl-2 e NF-kB no pulmão.....	29
Figura 11 - Expressão da AnxA1 por <i>Western blotting</i>	30
Figura 12 - Dosagem de citocinas no macerado do pulmão.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos parâmetros de danos pelo ensaio do cometa.....	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
Akt	Proteína serina/treonina quinase
AO	Ácido ocadaico
ANOVA	Análise de variância
AnxA1	Proteína anexina A1
BALT	Tecido linfático associado ao brônquio
BaP	Benzopireno
Bax	Bcl-2 associada à proteína X
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
CBR1	carbonil-redutase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetro
CBN	Composto bioativo natural
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CPCNP	Câncer Pulmonar de células não-pequenas
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio

g Grama

GSTP1 Glutathione S-transferase P 1

HAP Hidrocarboneto aromático policíclico

H.E. Hematoxilina-Eosina

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

IL-1 β Interleucina - 1beta

IL-17 Interleucina – 17

INCA Instituto Nacional de Câncer

I.P. Intraperitoneal

JNK c-Jun NH2 Quinase Terminal

Kg Quilograma

L Litro

LBA Lavado broncoalveolar

MAPK Mitogen-activated Protein Kinases

Mg Miligrama

mL Mililitro

N Normal

NaCl Cloreto de sódio

NaOH Hidróxido de sódio

NF-kB Fator de transcrição nuclear-kappa B

OMS Organização Mundial da Saúde

P Valor de p (significância de teste estatístico)

PBS Phosphate buffered solution (solução tampão de fosfato)

Ph Potencial Hidrogeniônico

PL Piperlongumina

PMA *Phorbol-12-miristato-13-acetato*

R.P.M. Rotação por minuto

S.E.M. Standard error of mean = Erro padrão da média

Sham Grupo experimental testado apenas com o veículo usado para diluição das drogas

STAT 3 Proteínas Transdutoras de Sinais e Ativadoras da Transcrição

TNF- α Tumor necrosis factor-alpha (Fator de necrose tumoral-alpha)

UDPE Unidade didática e de pesquisa experimental

UNIFIPA Centro Universitário Padre Albino

V Volts

Vs versus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Aspectos gerais.....	13
1.2. Piperlongumina	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. METODOLOGIA.....	19
3.1. Animais	19
3.2. Exposição ao BaP e protocolo de tratamento com a PL	19
3.3. Análises fisiológicas de pesagem e pletismografia.....	19
3.4. Dosagem de hemoglobina	21
3.5. Ensaio do cometa.....	21
3.6. Análises do lavado broncoalveolar	22
3.7. Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas	22
3.8. Avaliação da proteína anti-inflamatória anexina A1 por <i>Western blotting</i>	22
3.9. Dosagem de citocinas.....	23
3.10. Análises estatísticas	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Análises fisiológicas	24
4.2. Dosagem de hemoglobina	25
4.3. Ensaio do cometa.....	25
4.4. Análise quantitativa do lavado broncoalveolar	26
4.5. Análises histopatológicas	27
4.6. Análises imuno-histoquímicas e de <i>Western blotting</i>	28
4.7. Dosagem de citocinas.....	30
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

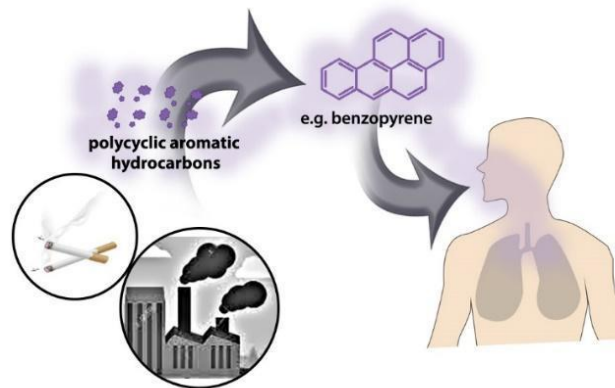
O câncer de pulmão figura entre as principais causas de mortalidade no mundo (SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2016). No Brasil, segundo dados do INCA, a ocorrência de casos novos de câncer de pulmão no ano de 2018 foi estimada em 31.270, sendo 18.740 homens e 12.530 mulheres. Nos homens o câncer de pulmão é considerado o segundo tipo de câncer com maior incidência, atrás apenas do câncer de próstata, enquanto nas mulheres está na quarta posição, sendo menos frequente apenas que os cânceres de mama, colo retal e colo do útero. (INCA, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o câncer de pulmão em dois subtipos: câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) e câncer de pulmão de pequenas células (CPCP) (TRAVIS *et al.*, 2015). O CPCNP representa 85% dos casos de câncer de pulmão e é dividido em adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (epidermoide) e carcinoma de células grandes (OSER *et al.*, 2015).

As células tumorais no microambiente do câncer de pulmão, bem como citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios secretados por células intersticiais, interagem e ativam vias de sinalização pró-inflamatórias e de crescimento celular. Esta interação promove o comportamento biológico maligno do câncer de pulmão e a progressão tumoral (WU *et al.*, 2016). Estudos mostram que no CPCNP metastático, o índice de inflamação pode ser utilizado para avaliar o prognóstico dos pacientes (JAFRI, SHI, MILLS, 2013). Mesmo antes do surgimento do tumor, a existência de um processo inflamatório crônico atuando como força motriz da carcinogênese é um fator bem estabelecido (HUANG *et al.*, 2015).

Tabaco, exposição ocupacional, dieta, fatores biológicos, como infecção por vírus da hepatite B e papiloma vírus humano e poluição do ambiente (Figura 1) são fatores críticos (GOVINDAN *et al.* 2006, ZHOU *et al.*, 2016) que estão profundamente associados às doenças pulmonares inflamatórias, tais como fibrose e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). Pacientes portadores de DPOC possuem risco aumentado para câncer de pulmão e, caso este mesmo paciente seja fumante, esse risco aumenta em dez vezes se comparado a tabagistas sem DPOC (ARLT *et al.*, 2015).

Figura 1 - Ilustração de algumas das principais origens dos Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), entre eles, o Benzopireno, um dos fatores críticos para o desenvolvimento de afecções pulmonares.



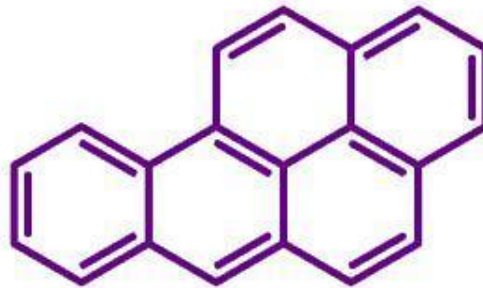
Fonte: Os autores, 2019.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) são produtos químicos que contêm ao menos dois anéis benzeno fundidos, sem heteroátomos e são liberados no meio ambiente pela combustão incompleta de material orgânico, tais como: carvão, petróleo e polímeros orgânicos, sendo que no meio urbano, são principalmente lançados ao ar pelos automóveis (YU *et al.*, 2019). A combustão do cigarro, com a consequente liberação de substâncias químicas, se divide em duas fases: gasosa e sólida. Na fase gasosa, o fumante inala a fumaça, que passa pelo filtro do cigarro e se dirige diretamente aos pulmões. O filtro retém a fase sólida que é caracterizada pela fumaça que emana da queima do cigarro e atinge tanto o fumante quanto as pessoas presentes no mesmo ambiente (fumante passivo) e é nesta fase em que o benzopireno é liberado (RUIZ *et al.*, 2004). O benzopireno (Figura 2) é o um dos principais HAP presentes no ambiente e com alta capacidade carcinogênica comprovada em humanos (PETIT *et al.*, 2019), portanto, usado em modelos experimentais *in vivo*. (HARRIGAN *et al* 2003; HUDLIKAR *et al.*, 2016).

O progresso dos adenomas pulmonares em murinos apresenta diversas similaridades com o adenocarcinoma pulmonar humano, que é a forma mais comum de câncer de pulmão. Apesar dessa semelhança, algumas espécies são mais susceptíveis que outras para desencadear este tipo de tumor de acordo com sua variabilidade genética (MALKINSON, 1983). O Balb/c apresenta maior facilidade de indução comparado ao C57, que é mais resistente (MILLER, 2003; MALKINSON, 1983). Outros autores como Anandakumar (2012) e Wang (2015) também lançaram mão do mesmo modelo de indução de câncer de pulmão em camundongos BALB/c por benzopireno.

As alterações inflamatórias desencadeadas por instilação intrapulmonar de benzopireno tais como hiperplasia e formação de tecido linfoide associado aos brônquios (BALT) são características na formação de neoplasias (SALINAS, LEIVA, GONZÁLES 2006; PORTER *et al* 2004). Os metabólitos formados pelo benzopireno a partir da ação das isoenzimas P-450 se ligam em regiões nucleofílicas do DNA causando danos que, caso não sejam corrigidos pela maquinaria de reparo do DNA, levam à duplicações e erros de cópias, dando lugar às mutações que serão passadas da célula mutada para suas cópias (RUIZ *et al*, 2004; LIMA, 2016)

Figura 2 - Estrutura molecular do Benzopireno.



Fonte: Os autores, 2019.

Investigações têm mostrado que as substâncias com atividade anti-inflamatória podem reduzir a incidência de câncer de pulmão (ARYAL e DIAZ-GUZMAN, 2014; MANNINO, 2014; WU *et al.*, 2016). Nesse cenário, os compostos bioativos naturais (CBNs) como os terpenos e flavonoides que apresentam muitas propriedades, entre elas, redução da inflamação, estimulação do sistema imune, modulação de enzimas detoxificantes e do metabolismo de esteroides (BEZERRA *et al.*, 2013), podem representar uma possibilidade de tratamento preventivo para o câncer de pulmão.

1.2. Piperlongumina

Os benefícios terapêuticos obtidos através de CBNs se dão por um simples componente ou mesmo por uma combinação de seus constituintes, relatados como metabólitos secundários, sendo que os mais comuns são os alcaloides, flavonoides, terpenos, taninos, ácido fenólico e óleos essenciais (SHARIFI-RAD *et al.*, 2018; SANT'ANA *et al.*, 2020).

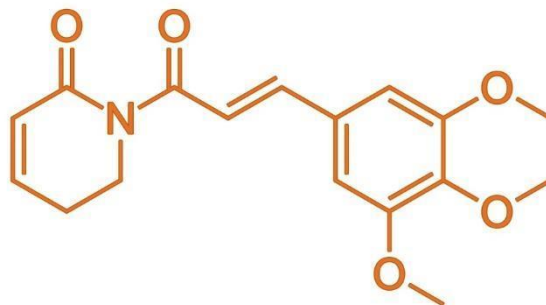
Atualmente, diversos fármacos anticâncer são derivados de plantas, tais como o Vincristina, Vinblastina, Taxol e Topotecan. Como os fito-constituintes das plantas são

bastantes variados, podem atuar por diferentes mecanismos, como controle de estresse oxidativo e vias inflamatórias, modulação de fatores de transcrição, controle de proteínas do ciclo celular, de adesão, anti e pró-apoptóticas (YADAV *et al.*, 2019)

Entre os CBNs destacamos a piperlongumina (PL) (piperlongumina, 5,6-di-hidro-1-[(2E)-1-oxo-3 (3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-2(1H) piridinona) (Figura 3), o componente biologicamente ativo das espécies de Piper (Piperaceae), isolado na Índia em 1963 e que apresenta grande importância econômica e medicinal (BEZERRA *et al.*, 2008). Um trabalho de revisão publicado por Salehi e colaboradores (2019) avaliou mais de 100 plantas do gênero *Piper* e a atuação de seus diferentes compostos em diversas pesquisas em áreas da saúde variadas, tais como psiquiatria, oncologia, gastroenterologia, pneumologia, entre outras, mostrando a importância da *Piper* para o meio científico.

Em particular, a PL é o principal alcaloide da pimenta longa (*Piper longum* L.), com diferentes ações farmacológicas (BEZERRA *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2015), que incluem, entre outros, efeitos citotóxicos (BEZERRA *et al.*, 2008; JYOTHI *et al.*, 2009; RAJ *et al.*, 2012; GOLOVINE *et al.*, 2013), atividade antitumoral e antimetastática (BEZERRA *et al.*, 2006, 2008; RAJ *et al.*, 2012; SRIVASTAVA *et al.*, 2017), antiangiogênica (RAJ *et al.*, 2012), antiagregação plaquetária (IWASHITA *et al.*, 2007; FONTENELE *et al.*, 2009; SRIVASTAVA *et al.*, 2017), antibacteriana (NAIKA *et al.*, 2010) e antifúngica (NAVICKIENE *et al.*, 2000). Uma particularidade bastante benéfica da PL é a sua atuação seletiva em células tumorais de diferentes linhagens e a ausência de efeito tóxico em linhagens normais (HANG *et al.*, 2018).

Figura 3 - Estrutura molecular da Piperlongumina.



Fonte: Os autores, 2019.

Raj e colaboradores (2012) relataram que a PL induz a apoptose ao interferir com reguladores homeostáticos, redox e espécie reativa de oxigênio (EROs), como a glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1) e carbonil-redutase (CBR1). A atividade antitumoral da PL envolve parada do ciclo celular, ativação de caspases e proteínas quinases ativadas por

mitógenos (MAPKs), desregulação de proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2 e do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) (KONG *et al.*, 2008; GINZBURG *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014). Em células de câncer de mama, a PL reduziu a expressão da Bcl-2 e promoveu parada do ciclo celular por meio da desestabilização dos microtúbulos de tubulina (MEEGAN *et al.*, 2017).

O potencial da PL sobre a via do NF-kB foi abordado em processos inflamatórios. Segundo Han e colaboradores (2014), a PL inibe a ativação de NF-kB induzida por agentes cancerígenos e estímulos inflamatórios como a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS), ácido ocadaico (OA), Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e cigarro em diferentes linhagens celulares. A ação anti-inflamatória da PL também foi avaliada na artrite reumatoide, mostrando atividade eficaz ao induzir proliferação, migração e invasão, além de reduzir a produção de EROS intracelular induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF)- α e inibir a ativação das vias *mitogen-activated protein kinases* (p38 MAPK), *c-jun amino-terminal kinase* (JNK), *signal transducers and activators of transcription* (STAT3) e NF-kB em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (XU *et al.*, 2018). Yao e colaboradores (2014), verificaram que a PL regula a frequência de células TH17 no lupus nefrótico e reduz significativamente os níveis de interleucina (IL)-17 e fator de necrose tumoral TNF- α em culturas de esplenócitos de camundongos tratados com a PL em comparação ao grupo controle. Outro importante estudo mostrou que o tratamento com PL atenuou a encefalomielite autoimune experimental, *in vivo* e *in vitro*, por meio da inibição da atividade NF-kB (GU *et al.*, 2017). Desta forma, a literatura que cerca o assunto é amplo e complexo.

A citotoxicidade da PL foi observada em células tumorais, mas não em células normais (RAJ *et al.*, 2012). Investigações têm utilizado fármacos anticâncer em combinação com a PL a fim de reduzir os mecanismos de resistência à quimioterapia. Jyothi e colaboradores (2009) avaliaram o tratamento concomitante da PL com diferuloylmetano, um agente anti-inflamatório e anticâncer. Esse tratamento aumentou a citotoxicidade induzida pela PL e a atividade antitumoral do quimioterápico. No entanto, existem poucos relatos das ações da PL nas condições inflamatórias e neoplásicas de pulmão.

Diante disso, se faz pertinente a busca do entendimento da ação da PL no tratamento dos processos inflamatórios pré-cancerígenos no pulmão, induzidos pela administração do benzopireno em modelo experimental, como possível alternativa terapêutica preventiva ou adjuvante, no tratamento dos cânceres de pulmão.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito da administração da PL em modelo de carcinogênese pulmonar induzida por benzopireno em camundongos Balb/c.

2.2. Objetivos Específicos

Em animais induzidos e tratados ou não com a PL e em animais controle, verificar:

- a) Os aspectos fisiológicos (peso e pletismografia);
- b) Os níveis de hemoglobina no sangue;
- c) Genotoxicidade em linfócitos;
- d) As células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA);
- e) As características histopatológicas dos pulmões;
- f) A expressão das proteínas anexina A1 (AnxA1), Bcl-2, ciclo-oxigenase (COX)-2 e NF-kB no pulmão.
- g) No sobrenadante do macerado pulmonar, as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-17.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Camundongos Balb/c (n=30) foram obtidos da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE) do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) de Catanduva-SP. Os camundongos foram mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios Multidisciplinares, UNIFIPA. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA UNIFIPA), após aprovação do projeto sob o número 10/18 e com acompanhamento do veterinário da instituição.

3.2. Exposição ao BaP e protocolo de tratamento com a PL

Os animais foram divididos em 3 grupos: sham (veículo), induzidos por benzopireno (Sigma – B1760) sem tratamento (BaP) e induzidos e tratados com piperlongumina (BaP/PL) (n=10/grupo). Para a administração do benzopireno, dois grupos de animais foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com 0,2ml/100g de ketamina e 0,05ml/100g de xilasina e administrados com 0,2ml da solução de benzopireno (100mg/kg) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (KAMARAJ *et al*, 2010; YEO *et al*, 2014).

A eficácia terapêutica da PL (Sigma – SML 0221), contra os processos inflamatórios e carcinogênicos causados pela exposição ao benzopireno, foi avaliada em um dos grupos induzidos, a partir da oitava semana pós-indução, com administração i.p. da PL (2,0mg/Kg, diluída em DMSO a 10%), 3x por semana, em dias alternados, (RAJ *et al.*, 2012; SANT'ANA *et al.* 2020), por 5 semanas. O grupo sham foi administrado apenas com o veículo (DMSO a 10%), pelo mesmo período do tratamento.

A eutanásia dos animais se deu por excesso do anestésico Isoflurano embebido em algodão, em caixa transparente, hermeticamente fechada de acordo com as diretrizes de prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A morte foi confirmada por avaliação veterinária que observou ausência de movimentação corneal e batimentos cardíacos.

3.3. Análises fisiológicas de pesagem e pletismografia

Animais de todos os grupos foram pesados semanalmente. No final do experimento, os animais foram avaliados quanto à pletismografia, por meio da medição da capacidade de respiração, ventilação, frequência e volume inspirado em aparelho específico e adaptado ao

uso (Figura 4) (*PowerLab, AD Instruments-Gas Analyzer, Austrália*). A ventilação foi medida pelo método da pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado. Durante a realização de cada medida da ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara com o animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~1 min). As oscilações de pressão, causadas pela respiração do animal foram captadas por um dispositivo conectado à câmara que contém o transdutor de pressão e o amplificador de sinais (ML141 *spirometer, PowerLab, ADInstruments*). Esses sinais foram enviados para o sistema de aquisição e análise dos dados (*PowerLab, ADInstruments*). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume de ar conhecido dentro da câmara do animal (1ml) com o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias foram medidas, a frequência respiratória (f_R) e o volume corrente (V_T) que foi calculado pela fórmula: $V_T = P_T/P_K \times T_A/T_{amb} \times (P_B - P_A)/P_B - T_A/T_C(P_B - P_C)$, onde:

V_K : volume de ar injetado na câmara do animal para calibração;

P_T : deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente;

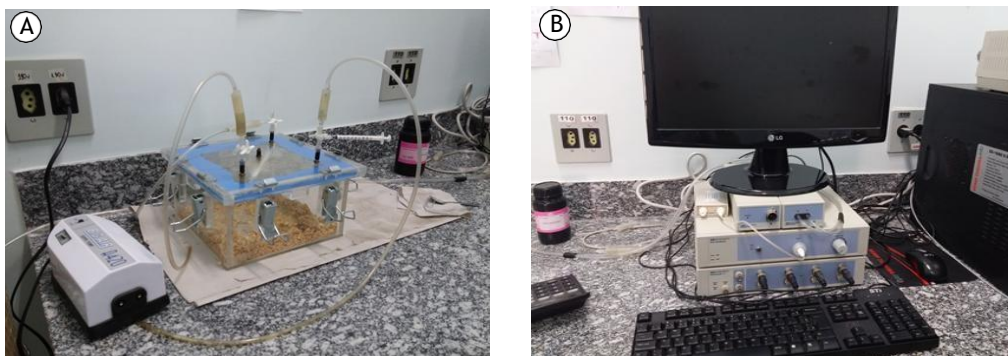
P_K : deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração,

T_C : temperatura corporal; T_{amb} : temperatura ambiente;

T_A : temperatura do ar dentro da câmara;

P_B : pressão de vapor d'água à temperatura corporal; P_A : pressão de vapor d'água à temperatura da câmara

Figura 4 – Pletismógrafo. Caixa de ventilação (A) e sistema de aquisição de dados acoplado ao computador (B).



Fonte: Os autores, 2019.

3.4. Dosagem de hemoglobina

O sangue foi coletado por punção cardíaca em seringas heparinizadas e separado em alíquotas para análise de hemoglobina com Kit comercial (Labtest) e leitura no espectrofotômetro.

3.5. Ensaio do cometa

Para o Ensaio Cometa foram preparadas duas lâminas por animal utilizando uma mistura de agarose na concentração de 1,5% em PBS. A agarose foi fervida por um minuto, esfriada e solidificada por três vezes e, após a terceira vez, as lâminas foram banhadas e acondicionadas sob refrigeração para uso posterior. Uma alíquota de 10µl de sangue foi adicionada à 1000µl de solução salina em um microtubo e reservada. Uma segunda agarose *Low Melting* (0,5%) foi preparada e acondicionados 120µl por amostra em banho maria a 37°C juntamente a 10µl da solução salina/sangue e esta mistura foi colocada sobre as lâminas, cobertas com lamínula e levadas à geladeira por pelo menos trinta minutos para solidificar a agarose *Low Melting*. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas dispostas em cuba de vidro para ficarem mergulhadas em solução de lise pH 10 (NaCl 2,5M, EDTA 100nM, Tris 10mM, Lauril 35mM) a 4°C por, pelo menos, uma hora em geladeira e ao abrigo de luz.

Após o tempo de lise, a fonte de eletroforese foi ajustada a 25V e 300mA por 20 minutos, em cuba horizontal, para a migração do material genético formando a cauda do cometa. Antes de iniciar a eletroforese, as lâminas ficaram na solução tampão de eletroforese pH13 (EDTA 200mM, NaOH 10N) por cerca de 30 minutos. Em seguida, foi realizada a neutralização das lâminas, que foram dispostas em um suporte e lavadas por 3x de cinco minutos com 5ml de solução de neutralização pH7,5 (Tris 0,4M). Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em etanol 100% por 10 minutos para a fixação. Depois de secas, foram acrescentados 100µl de solução para coloração com brometo de etídeo e as lâminas foram cobertas com lamínula para análise em microscópio de fluorescência (Fluo 3, Bel), do Laboratório Multidisciplinar II, UNIFIPA.

As células foram visualmente classificadas de acordo com o comprimento da cauda em: classe 0, não danificadas, sem cauda; classe 1: com cauda curta, menor que o diâmetro do núcleo; classe 2, com cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3, comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo (BEZERRA *et al.*, 2008).

Foram contados 50 linfócitos por grupo experimental e os danos no DNA (comprimento da cauda, porcentagem de dano ao DNA e momento da cauda) foram determinados com uso do *software CometScore* versão 1.5 (KIANMEHR, HAJAVI, GAZERI, 2017).

3.6. Análises do lavado broncoalveolar

Para a obtenção do LBA, os animais tiveram a traqueia canulada e o pulmão direito clampado. O pulmão esquerdo foi lavado 3 vezes com PBS e o líquido obtido foi centrifugado por 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi armazenado a -70°C para posterior dosagem de citocinas e o pellet foi ressuspensão em 500 µl de PBS e alíquotas de 10µl foram coradas em Turk (1:10) para contagem de células inflamatórias em câmara de Neubauer (valores como número de células x 10³/ml).

3.7. Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas

Após coleta do LBA, o pulmão direito foi retirado, fixado em formol a 4% e processado para inclusão em parafina. Secções de 4µm foram usadas para análises histopatológicas após coloração com hematoxilina-eosina (HE), no microscópio Leica (DM500) do Laboratório Multidisciplinar I da UNIFIPA.

Nos estudos imuno-histoquímicos foram avaliadas as expressões da proteína anti-inflamatória AnxA1, da proteína antiapoptótica Bcl-2, da enzima pró-inflamatória COX-2 e do fator de transcrição nuclear NF-kB. Para avaliar a expressão dessas proteínas as secções foram processadas para recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 e bloqueio da atividade da peroxidase endógena e incubadas com os anticorpos primários policlonais rabbit: anti AnxA1 (1:1000) (*Invitrogen*), anti-Bcl-2 (1:150), anti-COX-2 (1:500) e anti-NF-kB (1:1000) (*Abcam, Cambridge, UK*) por 12 horas. A seguir, incubadas com o anticorpo secundário biotilado e imersas em complexo estreptavidina peroxidase conjugada. O substrato diaminobenzidina (DAB) foi usado para revelação (*Kit DAB, Invitrogen*) e, após, as secções foram contracoradas com Hematoxilina. As proteínas foram quantificadas por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) no analisador de imagens (*software Leica Image Analysis*), a partir da marcação de 20 pontos sobre as células presentes nos alvéolos, em cinco campos fotografados com objetiva de 40x e selecionados aleatoriamente em cada amostra.

3.8. Avaliação da proteína anti-inflamatória anexina A1 por *Western blotting*

Fragmentos de pulmão foram macerados em nitrogênio líquido e colocados em

ependorfs, onde foram adicionados 650µL da solução de inibidor de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail Set I, Millipore Corporation, USA*) e fosfatases (*PhosphoSafe, Novagen, Millipore Corporation, USA*), segundo as instruções do fabricante. O material foi incubado por 20 minutos, a 4°C, sob agitação constante, e, em seguida, centrifugado a 14.000 RPM, por 10 minutos, a 4°C, sendo os sobrenadantes coletados e imediatamente congelados a -80°C.

A determinação da concentração de proteínas presentes nos sobrenadantes foi feita em ensaio de Bradford (Biorad, Hemel Hempsted, UK) e ajustada para 2mg/ml. Uma alíquota foi misturada (1:1) com 2X “loading buffer” (Tris base a 125mM, pH 6,8, contendo mercaptoetanol a 10%, dodecil sulfato de sódio a 4%, glicerol a 20%, azul de bromofenol a 0.1%) e desnaturada em água a 100°C por 5 minutos. As amostras (20 mg de proteína por poço) e marcadores de peso molecular foram separados em gel SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio a 10% – gel de poliacrilamida a 10%) e, posteriormente, transferidas para membrana de nitrocelulose. A proteína AnxA1 foi detectada utilizando o anticorpo primário anti-AnxA1 (1:1000) (*life Technologies*). O sinal foi amplificado utilizando anticorpo secundário anti-rabbit IgG HRP conjugado (*Promega*) e o produto da reação visualizado com revelação em DAB (*Kit DAB, Invitrogen*). O anticorpo α -Tubulina (1:500, *Sigma*) foi usado como controle. As expressões das proteínas nas membranas foram quantificadas por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) no analisador de imagens (*software Leica Image Analysis*).

3.9. Dosagem de citocinas

Em todos os grupos as citocinas IL-1 β , IL-17 e TNF- α foram quantificadas no sobrenadante do macerado pulmonar, por meio de Kits de ensaio imunológico ELISA comercialmente disponíveis e conforme a especificação do fabricante.

3.10. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos previamente à análise descritiva e determinação da normalidade. Como as amostras mostraram distribuição normal, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de *Bonferroni*. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

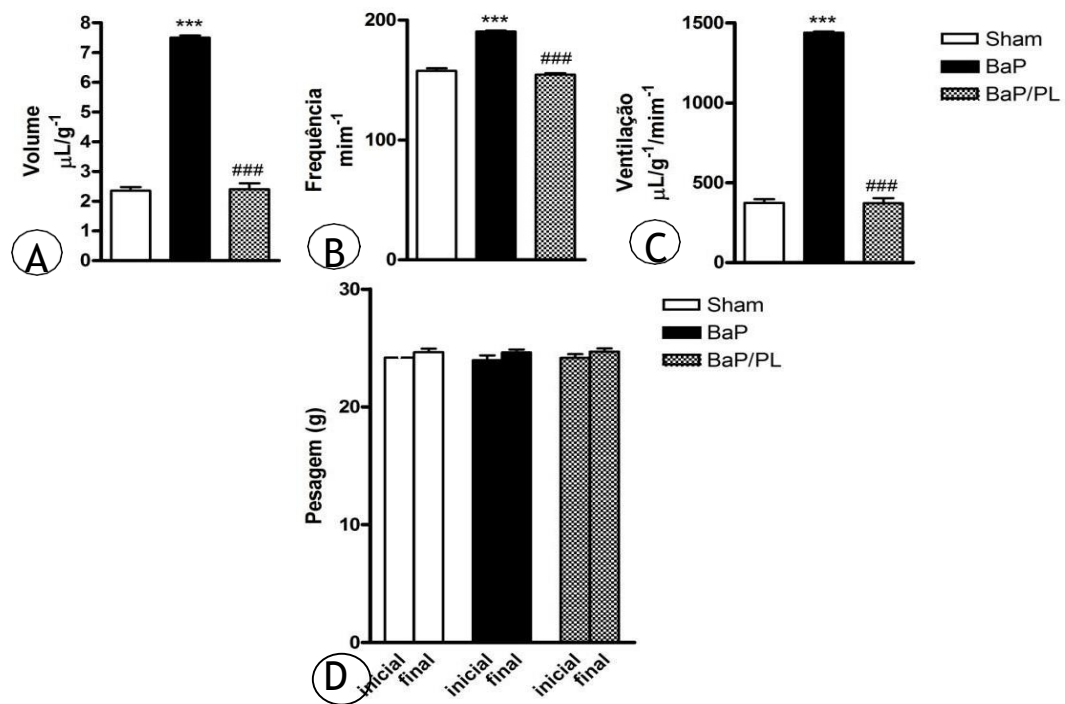
4. RESULTADOS

4.1. Análises fisiológicas

Nas análises pletismográficas foram avaliados os parâmetros da frequência, volume e ventilação pulmonares após os protocolos de exposição ao benzopireno e tratamento com PL. Os dados obtidos, relacionados ao volume pulmonar (Figura 5A), frequência respiratória (Figura 5B) e ventilação pulmonar (Figura 5C) mostraram aumento no grupo induzido sem tratamento (BaP) em relação ao grupo sham ($p < 0,001$) e redução significativa dos parâmetros pulmonares nos animais tratados com a PL (BaP/PL) ($p < 0,001$) (Volume pulmonar: Sham $2,356 \pm 0,120$; BaP $7,505 \pm 0,065$; BaP/PL $2,411 \pm 0,194$; Frequência respiratória: Sham $157,9 \pm 1,908$; BaP $190,5 \pm 0,712$; BaP/PL $154,5 \pm 1,274$; Ventilação pulmonar: Sham $374,3 \pm 22,65$; BaP $1439 \pm 7,976$; BaP/PL $371,2 \pm 31,56$).

As avaliações da pesagem não mostraram diferenças significantes entre os grupos (Figura 5D).

Figura 5 - Análises fisiológicas de pletismografia e peso – Capacidade do volume de ar inspirado (A). Avaliação da frequência pulmonar (B), capacidade de ventilação pulmonar (C) por minuto. Pesagem inicial e final (D). Grupos sham, induzidos por benzopireno sem tratamento (BaP) e induzidos e tratados com piperlongumina (BaP/PL). Resultados apresentados como média \pm S.E.M. ($n=10$), *** $p < 0,001$ vs grupo sham; ### $p < 0,001$ vs grupo BaP.

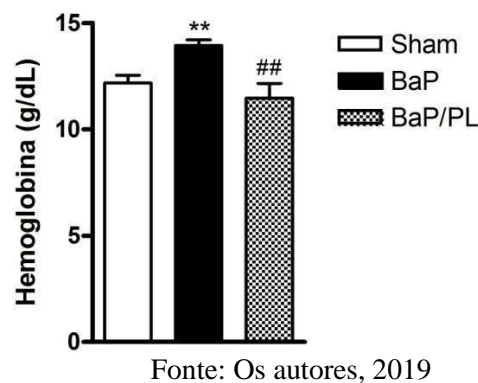


Fonte: Os autores, 2019

4.2. Dosagem de hemoglobina

As dosagens da hemoglobina mostraram aumento no sangue dos animais expostos benzopireno sem tratamento (BaP) ($13,94 \pm 0,26$; $p < 0,01$) comparados ao grupo sham ($12,19 \pm 0,36$) (Figura 6) bem como, redução nas concentrações dessa proteína nos animais tratados com PL (BaP/PL) ($11,47 \pm 0,68$ $p < 0,01$) comparados aos não tratados (BaP), sendo os níveis observados após o tratamento com a PL semelhantes aos do grupo sham.

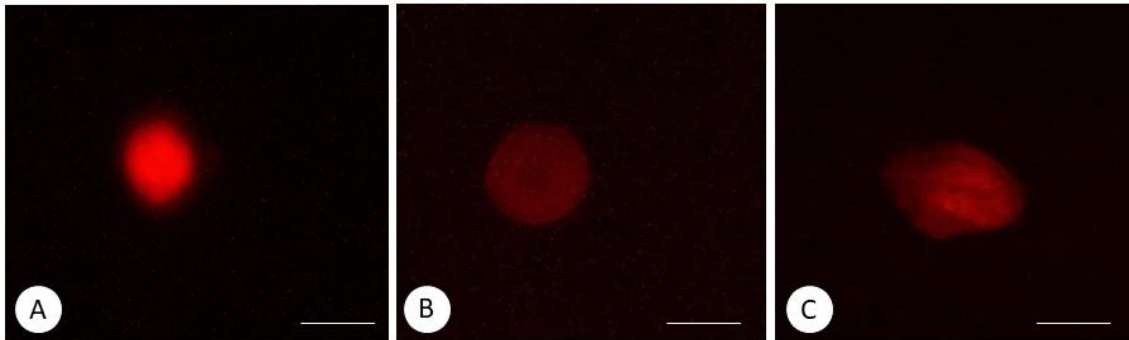
Figura 6 – Análise bioquímica da hemoglobina no sangue total – A dosagem de hemoglobina foi realizada no sangue total por g/dL nos grupos sham, induzidos por benzopireno sem tratamento (BaP) e induzidos e tratados com piperlongumina (BaP/PL). Resultados apresentados como média \pm S.E.M. ($n=10$ /grupo). ** $p < 0,01$ vs grupo sham; ## $p < 0,01$ vs grupo BaP.



4.3. Ensaio do cometa

Células com maior dano ao DNA exibem maior migração do DNA do núcleo em direção ao ânodo sob uma corrente elétrica, dando a aparência de uma cauda de cometa (Figura 7C). As médias dos parâmetros do ensaio do cometa usados para mensurar danos no DNA nos três grupos de estudo são mostradas na Tabela 1. Os parâmetros mensurados (comprimento da cauda, dano ao DNA e momento da cauda) indicaram maior dano ao DNA no grupo BaP comparado ao grupo sham. Houve redução significativa desses danos no grupo tratado com a PL.

Figura 7 – Núcleos de linfócitos pelo ensaio do cometa – Célula classe 0, sem dano aparente, grupo Sham (A), célula classe 1, onde o comprimento da cauda é menor que o diâmetro do núcleo, grupo induzido pelo benzopireno e tratado com a PL (BaP/PL) (B) e célula classe 2, com cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo, grupo induzido pelo benzopireno sem tratamento (BaP) (C).



Fonte: Os autores, 2019

Tabela 1 - Comparação dos parâmetros de danos pelo ensaio do cometa

Grupos/Parâmetros	Comprimento da cauda (μm)	Dano ao DNA (%)	Momento da cauda (μm)
Sham	275,5 \pm 8,150	7,330 \pm 0,4630	14,67 \pm 2,093
BaP	4862 \pm 1005***	59,26 \pm 2,540***	3163 \pm 776,0*
BaP/PL	944,6 \pm 326,2##	27,51 \pm 3,883***/###	814,8 \pm 694,5#

Fonte: Os autores, 2019

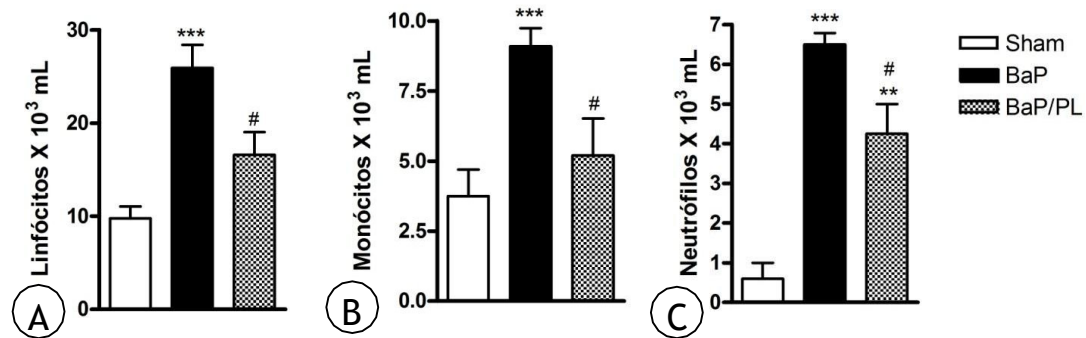
BaP, grupo exposto ao benzopireno sem tratamento; BaP/PL, grupo exposto ao benzopireno e tratado com piperlongumina. Resultados apresentados como média \pm S.E.M., * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs grupo sham; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs grupo BaP.

4.4. Análise quantitativa do lavado broncoalveolar

A quantificação de leucócitos no LBA mostrou aumento significativo de linfócitos (25,92 \pm 2,46; $p < 0,001$) (Figura 8A), monócitos (9,10 \pm 0,64; $p < 0,001$) (Figura 8B) e neutrófilos (6,50 \pm 0,29; $p < 0,001$) (Figura 8C) no grupo BaP comparado ao sham (Linfócitos: 9,78 \pm 1,28; Monócitos: 3,75 \pm 0,94; Neutrófilos: 0,60 \pm 0,40).

A ação anti-inflamatória da PL foi observada pela redução do número de linfócitos (16,57 \pm 2,44; $p < 0,05$), monócitos (5,20 \pm 1,32; $p < 0,05$) e neutrófilos (4,25 \pm 0,75; $p < 0,05$) em relação aos camundongos sem tratamento (BaP).

Figura 8 – Análise quantitativa do lavado broncoalveolar – Quantificação de Linfócitos (A), Monócitos (B) e Neutrófilos (C), em câmara de Neubauer, nos grupos sham, induzidos por benzopireno sem tratamento (BaP) e induzidos e tratados com piperlongumina (BaP/PL). Resultados apresentados como média \pm S.E.M. (n=10), ** p<0,01; *** p<0,001 vs grupo sham; # p<0,05 vs grupo BaP.

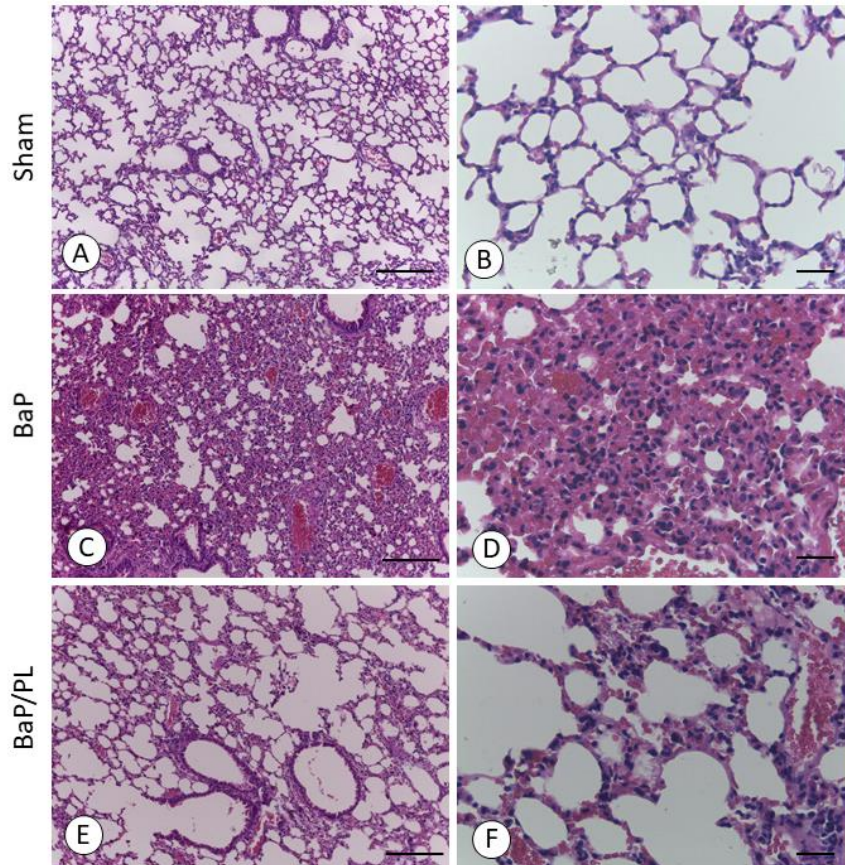


Fonte: Os autores, 2019

4.5. Análises histopatológicas

Nas análises histopatológicas foram observadas estruturas pulmonares de aspecto normal no grupo sham (Figura 9A e B) com bronquíolos terminais de epitélio simples cúbico, alvéolos, ductos alveolares e sacos alveolares bem definidos e septos intra-alveolares delgados, mas importantes modificações ocorreram na arquitetura pulmonar pela administração do benzopireno. Nos animais induzidos sem tratamento (BaP) foram observados congestão difusa, regiões de fibrose e focos de hiperplasia envolvendo alvéolos e bronquíolos terminais e consistindo de células cuboides, com cromatina densa e atipia celular e nuclear. (Figura 9C e D). Também foram observados neutrófilos junto às regiões de hiperplasia. Contudo, nos animais tratados com a PL (BaP/PL) ocorreu preservação da arquitetura pulmonar que manteve as características histológicas semelhantes aos animais não induzidos (Sham) (Figura 9E e F). Os achados histopatológicos foram confirmados por avaliação de patologista da UNIFIPA, Dr. Daniel Henrique Gonçalves.

Figura 9 – Análise histopatológica do pulmão– Grupo sham com aspecto normal, (A) e septos intra-alveolares delgados (B). Grupo exposto ao benzopireno sem tratamento (C e D) com desarranjo da arquitetura pulmonar e extensas regiões de hiperplasia. Células atípicas com cromatina densa (D). Grupo tratado exposto ao benzopireno e tratado com a piperlongumina (BaP/PL) com arquitetura pulmonar preservada. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: 200µm (A, C, E) e 50µm (B, D, F).



Fonte: Os autores, 2019

4.6. Análises imuno-histoquímicas e de *Western blotting*

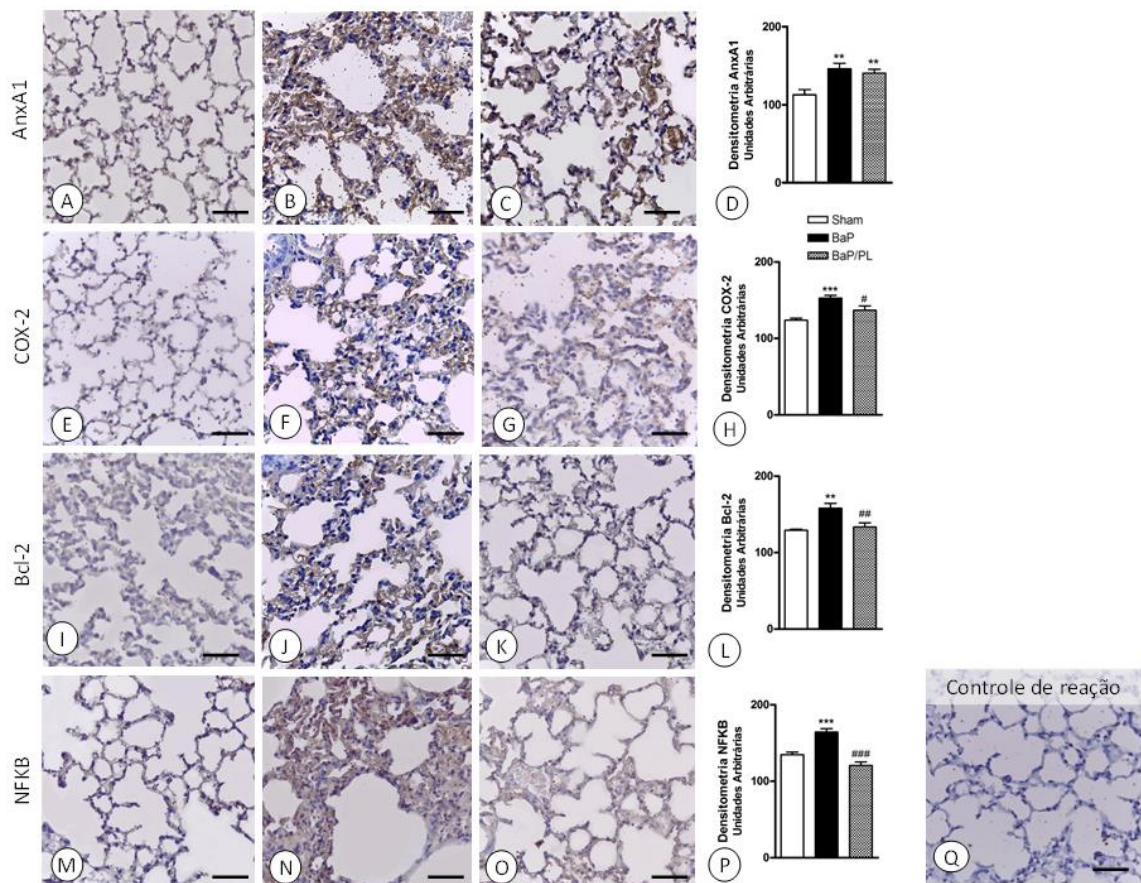
As análises imuno-histoquímicas mostraram que nos animais induzidos pelo benzopireno sem tratamento (BaP) ocorreu aumento da expressão da proteína anti-inflamatória AnxA1 ($p < 0,01$; Figura 10A-D), da enzima pró-inflamatória COX-2 ($p < 0,001$; Figura 10E-H), da proteína antiapoptótica Bcl-2 ($p < 0,01$; Figura 10I-L) e do fator de transcrição nuclear NF-kB ($p < 0,001$; Figura 10M-P) comparados ao grupo sham.

O efeito anti-inflamatório e protetor da PL (BaP/PL) foi observado pela redução significativa da expressão da COX-2 ($p < 0,05$), Bcl-2 ($p < 0,01$) e NF-kB ($p < 0,001$) em relação aos animais não tratados (BaP). Diferentemente, a expressão da proteína AnxA1 permaneceu elevada após tratamento com a PL. A especificidade das imunomarcações foi confirmada pelos controles de reação de cada anticorpo (Figura 10Q).

A expressão da proteína AnxA1 também foi verificada no sobrenadante do macerado

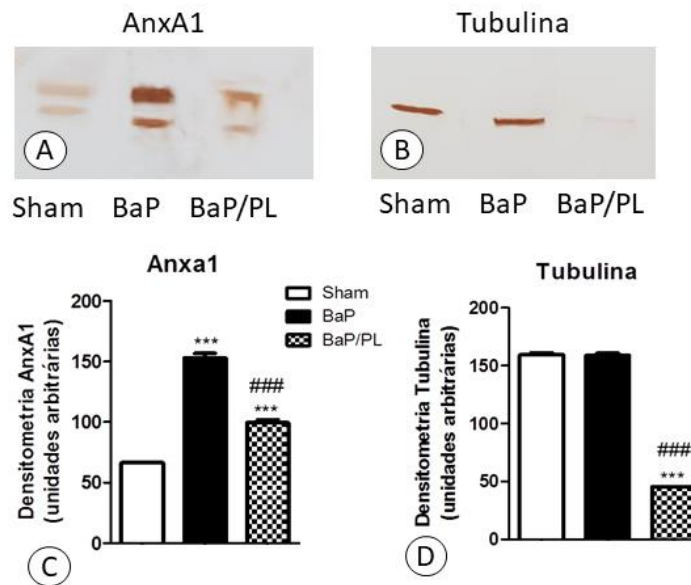
pulmonar por meio de *Western blotting* e os resultados obtidos corroboram as observações da imuno-histoquímica (Figura 11 A e C). De maneira interessante, o tratamento com a PL reduz de maneira acentuada a expressão de α -Tubulina (Figura 11B e D)

Figura 10 – Análises das expressões de AnxA1, COX-2, Bcl-2 e NF- κ B no pulmão: Imuno-histoquímica da proteína anti-inflamatória AnxA1 (A, B, C), da enzima pró-inflamatória COX-2 (E, F, G), da proteína antiapoptótica Bcl-2 (I, J, K) e do fator de transcrição nuclear NF- κ B (M, N, O) nos grupos sham, induzidos por benzopireno sem tratamento (BaP) e induzidos e tratados com piperlongumina (BaP/PL). Análises densitométricas de AnxA1 (D), COX-2 (H), Bcl-2 (L) e NF- κ B (P). Resultados apresentados como média \pm S.E.M. (n=10/grupo). ** p<0,01 e *** p<0,001 vs grupo sham; # p<0,05; ## p<0,01 e ### p<0,001 vs grupo BaP. Ausência de imunomarcação no controle de reação (Q). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 50 μ m.



Fonte: Os autores, 2019

Figura 11 - Expressão da AnxA1 por *Western blotting* (A), Controle de reação com a proteína tubulina (B), análises densitométricas da AnxA1 (C) e tubulina (D).



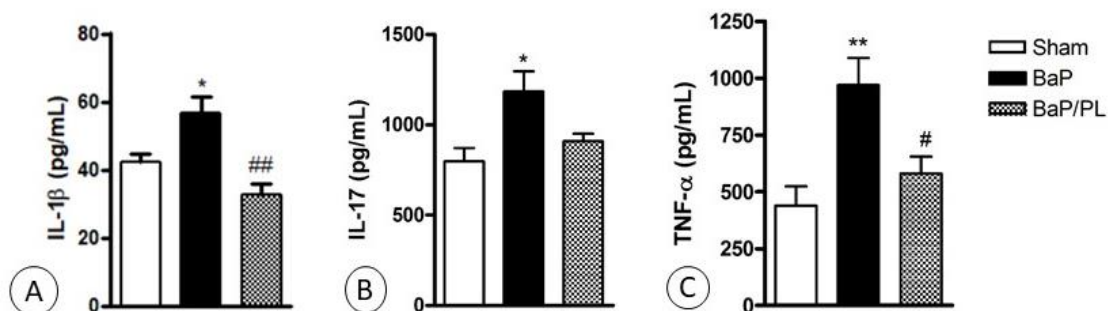
Fonte: Os autores, 2019

4.7. Dosagem de citocinas

No sobrenadante pulmonar dos camundongos do grupo BaP foram observados níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β ($p < 0,05$), IL-17 ($p < 0,05$) e TNF- α ($p < 0,01$) comparados ao controle (Figura 12).

A administração da PL promoveu redução dos níveis desses mediadores pró-inflamatório sendo significativa para IL-1 β ($p < 0,001$) e TNF- α ($p < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12- Dosagem de citocinas no macerado do pulmão. IL-1 β (A); IL-17 (B); TNF- α (C). Resultados apresentados como média \pm S.E.M. ($n=10$ /grupo). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs Sham # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs grupo exposto benzopireno sem tratamento.



Fonte: Os autores, 2019

5. DISCUSSÃO

Doenças respiratórias são responsáveis por cerca de 10% da mortalidade mundial e estas disfunções pulmonares se caracterizam pela inadequação das trocas gasosas que levam à tosse, dor no peito, dispneia e ao câncer pulmonar (ARLT,2015). Segundo dados do Fórum Internacional de Sociedades Respiratórias de 2017, a poluição, a exposição ocupacional e o uso persistente de cigarros são os principais causadores dos distúrbios do sistema respiratório. O benzopireno é um dos principais hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na fumaça do cigarro e ambiente e com alta capacidade carcinogênica (HUDLIKAR *et al.*, 2016). Desse modo, o desenvolvimento de novas terapias, direcionadas à prevenção da progressão das doenças inflamatórias pulmonares e redução das exacerbações e mortalidade, é importante (COMPTON *et al.*, 2013). A piperlongumina (PL) é um extrato bioativo natural que tem mostrado potencial terapêutico em processos inflamatórios e tumorais (BEZERRA *et al.*, 2013). Diante disso, avaliamos o potencial terapêutico da PL em modelo de carcinogênese induzida por benzopireno em camundongos Balb/c.

Inicialmente foram analisados os dados fisiológicos de pesagem e pletismografia. Embora o peso dos animais não mostrou variação entre os grupos estudados, nossos resultados mostraram aumento dos parâmetros pletismográficos (volume, frequência e ventilação pulmonares) no grupo induzido pelo benzopireno e sem tratamento (BaP) em comparação com o grupo Sham, além de redução significativa dos mesmos parâmetros nos animais induzidos pelo benzopireno e tratados com PL (BaP/PL). Resultados fisiológicos semelhantes foram observados em camundongos expostos à fumaça do cigarro e tratados com a PL (SANT'ANA *et al.*, 2020). Nas pesquisas *in vivo* que visam testar a capacidade de ventilação pulmonar, a pletismografia de corpo inteiro é um recurso interessante que permite avaliar o animal de forma consciente e espontânea, verificando o volume de ar inspirado, a frequência e a capacidade de ventilação de modo mais fidedigno e sem as interferências referentes à anestesia que os métodos mais invasivos necessitam (LIM *et al.*, 2014). Além disso, é primordial que o animal esteja bem adaptado, calmo e sob as condições mais confortáveis possíveis para que o padrão respiratório seja regular e para que os resultados sejam replicáveis sem que haja interferentes causados por estresse (MAILHOT-LAROUCHE *et al.*, 2018). Dessa forma, os dados obtidos da pletismografia podem ser considerados bons indicadores da capacidade pulmonar nos animais estudados.

As dosagens de hemoglobina no sangue acompanharam os dados de pletismografia, com aumento pela administração do benzopireno e redução dos níveis pós tratamento com a PL. O processo de carcinogênese pode levar a várias patologias, incluindo complicações hematológicas, sendo a hipóxia tumoral frequentemente considerada como um problema terapêutico potencial. A hipóxia continuada pode resultar em alterações celulares que levam a um fenótipo tumoral mais agressivo, progressão maligna acelerada, aumento do potencial de invasividade local e disseminação de células tumorais (HOCKEL *et al.*, 2001). Contudo, no modelo a condição é inflamatória crônica e o ambiente é pré-tumoral, desse modo o aumento da hemoglobina pode representar um mecanismo de compensação, como observado em pesquisa anterior no modelo de doença obstrutiva pulmonar crônica (POSSEBON *et al.*, 2018b, SANT'ANA *et al.*, 2020).

O hábito tabagista, importante causa na carcinogênese pulmonar (SHI, GODSCHALK, SCHOOTEN, 2017), está ligado à elevação dos níveis de hemoglobina, que ocorre devido à alta afinidade do monóxido de carbono, resultante da queima do tabaco, ao ligar-se à hemoglobina formando a carboxihemoglobina. Essa associação, indisponibiliza o sítio de ligação para a molécula de oxigênio, diminuindo suas concentrações no sangue. Dessa forma, para compensar essa redução, os fumantes mantêm o nível de hemoglobina aumentado (MALENICA *et al.*, 2017). Diferentemente, após tratamento com PL, a dosagem de hemoglobina foi semelhante ao grupo sham, indicando o papel protetor desse CBN, como também observado por Sant'Ana e colaboradores (2020) em modelo de inflamação pulmonar induzida por fumaça do cigarro. Ainda, no modelo de carcinogênese induzida por benzopireno e tratamento com capsaicina, foi observado o restabelecimento dos níveis de hemoglobina próximos ao do grupo controle (ANANDAKUMAR *et al.*, 2012).

Após verificarmos as alterações dos parâmetros pulmonares provocadas pelo benzopireno, avaliamos a genotoxicidade, pelo teste do cometa. As análises mostraram que o benzopireno promoveu danos ao DNA dos linfócitos, mas a administração da PL reduziu parcialmente essas alterações. O ensaio do cometa tem sido usado para avaliar danos ao DNA por exposição a agentes genotóxicos no ambiente de trabalho. Um estudo envolvendo 104 taxistas iranianos mostrou que a exposição à poluição do trânsito coloca estes motoristas em uma condição maior de risco de desenvolverem desordens pulmonares (HACHESU, 2019). Maiores danos ao DNA foram observados em linfócitos obtidos do sangue periférico de padeiros expostos à queima de lenha e querosene (KIANMEHR, HAJAVI, GAZERI, 2017). A exposição de células de hepatoma de rato a diferentes concentrações de combustível de jato (JP-8) também promoveu danos ao DNA (GRANT *et al.*, 2001). Níveis aumentados de

dano ao DNA foram observados em pneumócitos II de ratos expostos à fumaça de cigarro por períodos de 3 e 6 semanas, com efeito cumulativo (DALRYMPLE *et al.*, 2016). Ainda, danos induzidos pelo benzopireno foram observados em células do nematoide *Caenorhabditis elegans*, de maneira dose-dependente (IMANIKIA *et al.*, 2016).

Em pesquisas relacionadas especialmente ao tumor de pulmão, a PL apresentou grande potencial terapêutico inibindo a proliferação celular em estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo de câncer de pulmão de células não pequenas, por meio de diferentes vias como Akt (WANG *et al.*, 2015; SEOK *et al.*, 2018, ZHOU *et al.*, 2019), NF-κB (ZHENG *et al.*, 2016) e como indutora de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KARKI *et al.*, 2017). De maneira interessante, a PL induziu danos no DNA de células de fibroblastos pulmonares de hamster chinês, detectado por ensaio do cometa neutro e alcalino, sendo que o aumento no dano ocorreu de maneira dose-dependente (BEZERRA *et al.*, 2008). Ainda, a genotoxicidade da PL também foi indicada pelo ensaio do cometa em células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, nas quais os danos ao DNA e níveis EROs foram elevados após tratamento com a PL (HANG *et al.*, 2018). Esses autores sugerem que o tratamento com a PL aumenta seletivamente os níveis de EROs e induz a morte celular em células cancerosas em relação às normais.

Na sequência deste estudo, analisamos as células inflamatórias no lavado broncoalveolar e observamos aumento de linfócitos, monócitos e neutrófilos nos animais expostos ao benzopireno. Este agente desencadeia no pulmão alterações inflamatórias como hiperplasia e formação de tecido linfoide associado aos brônquios (BALT) (SALINAS, LEIVA, GONZÁLEZ, 2006). Os efeitos deletérios causados pelo excesso de estresse oxidativo que ocorre pelo uso de cigarros também desestabiliza o citoesqueleto de células fagocitárias levando à deficiência do controle bacteriano e limpeza de restos apoptóticos (BOZINOVSKI, 2014).

As células tumorais no microambiente do câncer de pulmão, bem como citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios secretados por células intersticiais interagem, ativando vias de sinalização pró-inflamatórias e de crescimento celular. Esta interação promove o comportamento biológico maligno do câncer de pulmão e a progressão tumoral (WU *et al.*, 2016). Estudos mostram que no câncer de pulmão de células não pequenas metastático, o índice de inflamação pode ser utilizado para avaliar o prognóstico dos pacientes (JAFRI, SHI, MILLS, 2013). Infiltrados de células do sistema imune, como os linfócitos, neutrófilos e macrófagos tem significado importante no manejo clínico, podendo contribuir para um prognóstico favorável ou não dependendo de sua densidade e localização

(CATACCHIO, 2018). Pesquisas no modelo de carcinogênese pulmonar induzida por benzopireno (ANANDAKUMAR *et al.*, 2012; VISWANATHAN, BERLIN GRACE, 2018) mostraram redução de linfócitos e monócitos, mas aumento de neutrófilos. Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foram apontados aumento de linfócitos e macrófagos nos animais expostos à fumaça do cigarro (POSSEBON *et al.*, 2018a; POSSEBON *et al.*, 2018b).

O efeito anti-inflamatório, com redução de linfócitos, monócitos e neutrófilos no lavado broncoalveolar observado com a administração da PL no presente estudo corrobora os dados positivos obtidos em outra pesquisa, realizada por nosso grupo, em modelo de inflamação respiratória em camundongos induzida pela exposição à fumaça do cigarro e com aplicação da PL (SANT'ANA *et al.*, 2020). Um estudo com outro CBN, a capsaicina, derivada de pimenta chilli, gênero *Capsicum*, mostrou redução de leucócitos, especialmente neutrófilos, quando administrada em camundongos induzidos à carcinogênese pulmonar por benzopireno (ANANDAKUMAR *et al.*, 2012).

Nas análises histopatológicas, observamos no grupo sham arquitetura pulmonar normal, enquanto que no grupo induzido sem tratamento houve congestão difusa, regiões de fibrose e focos de hiperplasia envolvendo alvéolos e bronquíolos terminais, consistindo de células cuboides, com cromatina densa e atipia celular e nuclear. O grupo tratado com a PL mostrou características semelhantes ao grupo sham. Esses achados confirmam, não só, a validade do modelo de indução da inflamação crônica pelo benzopireno, com alteração progressiva do ambiente pulmonar, propiciando a carcinogênese, como também a eficácia da PL no tratamento proposto. Desarranjo semelhante na arquitetura pulmonar com a presença de hiperplasia também foi observado por outros autores em modelos de carcinogênese induzida por benzopireno por períodos maiores do que 14 semanas (WANG *et al.*, 2015; HUDLIKAR *et al.*, 2016). Mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e enzimas extracelulares modulam eventos moleculares nos tumores induzidos pelo benzopireno (SHI, GODSCHALK, SCHOOTEN, 2017). Novamente, o tratamento com a PL mostrou efeito protetor aos danos causados pelo benzopireno e estão de acordo com outro trabalho que revelou diferenças importantes após tratamento com PL na inflamação pulmonar induzida por fumaça do cigarro, evidenciadas pela redução da migração celular de células inflamatórias no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar, preservação das estruturas alveolares e atenuação da atividade de proteases (SANT'ANA *et al.*, 2020).

Para aprofundar as análises, procedemos ao estudo da expressão de proteínas anti e pró inflamatórias, anti-apoptótica e fator de transcrição nuclear. Os resultados indicaram a

inibição das expressões de COX-2, Bcl-2 e NF-kB com a administração da PL, enquanto a expressão da AnxA1 continuou elevada. Os efeitos da atividade molecular pró-apoptótica da PL incluem a baixa expressão de Bcl-2 (PISKA, 2018), suportando nossos resultados de menor expressão no grupo tratado. Han e colaboradores (2014) avaliaram a ação da PL em várias linhagens celulares induzidas por diferentes estímulos, incluindo cigarro. Esses autores mostraram que a PL regulou a expressão de COX-2 através da inibição do NF-kB e reduziu a produção de IL-6 de maneira dose-dependente. Son e colaboradores (2012) também mostraram que a PL inibe a ativação do NF-kB em lesões ateroscleróticas. Ainda, um trabalho recente realizado por nosso grupo de pesquisa também mostrou a redução do NF-kB e da COX-2 e aumento da AnxA1 após tratamento com a PL na inflamação pulmonar induzida pela exposição a fumaça do cigarro (SANT'ANA *et al.*, 2020). A superexpressão da AnxA1 foi avaliada em células epiteliais brônquicas tratadas com benzopireno (CUI, YANG, 2018). Esse estudo indicou que a AnxA1 exerce efeito protetor na injúria brônquica induzida pelo benzopireno, com inibição da apoptose por meio da regulação das expressões de Bcl-2 e, Bax e ciclina D1.

De acordo com Miyata e colaboradores (2015) a expressão aumentada da COX-2 está associada ao elevado grau de inflamação na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Estudos prévios do nosso grupo também mostraram a expressão aumentada de AnxA1, COX-2 e NF-kB em ratos e camundongos expostos à fumaça de cigarro (LEBRON *et al.*, 2019, POSSEBON *et al.*, 2018a,b; SANT'ANA *et al.*, 2020).

Diferentes autores têm mostrado o papel protetor dos fitoterápicos em afecções pulmonares. Investigações mostraram que a atividade anti-inflamatória da *Camellia sinensis* (chá verde) é mediada pela redução na expressão da COX-2, prostaglandina 2 e superexpressão da AnxA1 (LU *et al.*, 2012). Os efeitos anti-inflamatórios de uma mistura de ervas medicinais (*Arctium lappa*, *Plantago major*, *Mikania glomerata Spreng* e *Equisetum arvense*) reduziram a expressão de NF-kB em modelo de DPOC (POSSEBON *et al.*, 2018a). A ação anti-inflamatória de polifenóis do chá preto em modelo de carcinogênese pulmonar foi demonstrada pela redução da expressão de COX-2. Os polifenóis do chá preto regularam negativamente a proliferação celular induzida pelo benzopireno e aumentaram a apoptose, pela via AKT, com redução da expressão de Bcl-2 e aumento de Bax (HUDLIKAR *et al.*, 2016).

A exposição ao benzopireno induz níveis aumentados de produção de IL-1 β , TNF- α e EROs, por meio da ativação do NF-kB. A ativação dessa via estimula a proliferação e diferenciação celulares, inibe a apoptose e estimula a inflamação e a angiogênese (JI *et al.*,

2013; SHI, GODSCHALK, SCHOOTEN, 2017). Além disso, os mediadores envolvidos recrutam e ativam leucócitos, principalmente neutrófilos, para o local da inflamação, o que cria um microambiente que promove a liberação ainda mais pronunciada de mediadores inflamatórios (MULTHOFF; MOLLS, RADONS, 2012; SHI, GODSCHALK, SCHOOTEN, 2017).

Diante dos resultados obtidos, complementamos as análises de mediadores químicos por meio da dosagem de citocinas pró-inflamatórias. Os estudos indicaram níveis aumentados de IL-1 β , IL-17 e TNF- α nos sobrenadantes do macerado pulmonar dos animais induzidos pelo benzopireno e a redução desses níveis pela administração da PL, reforçando as análises anteriores.

Bao e colaboradores (2016) verificaram níveis elevados de IL-17A, IL-23, IL-1 β e TGF- β 1 em pacientes com adenocarcinoma de pulmão e diminuição desses níveis após ressecção do tumor. Os autores indicam que as células Th17, Tc17, $\gamma\delta$ T17 e citocinas associadas a IL-17A contribuem para o desenvolvimento do adenocarcinoma de pulmão e, portanto, representam alvos promissores para estratégias terapêuticas.

A avaliação do nível de citocinas indicou que neutrófilos e células polimorfonucleares imaturas fenotipicamente semelhantes a neutrófilos (PMN-MDSC) estão associados a diferentes citocinas em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (BARRERA *et al.*, 2018). Os níveis de IL-17 foram correlacionados positivamente com a porcentagem de neutrófilos, mas não com a porcentagem de PMN-MDSC. Por outro lado, os níveis de IL-1 β , IL-2, IL-27 e IL-29 foram associados com a porcentagem de PMN-MDSC, mas não com a porcentagem de neutrófilos. Esses perfis podem auxiliar no prognóstico dos pacientes (BARRERA *et al.*, 2018).

Outros estudos indicam que a IL-17 atua de maneira sinérgica com ativadores de NF- κ B como TNF- α e IL-1 β e que a IL-17 pode promover o desenvolvimento tumoral por meio da inflamação tecidual crônica (MACGEACHY, CUA, GAFFEN, 2019). A IL-17A também pode contribuir para a progressão da doença em pacientes com DPOC severa (LORÈ, BRAGONZI, CIGANA, 2015). Ainda, ratos expostos à poluição ambiente mostraram expressão aumentada de IL-1 β no parênquima pulmonar, numerosos macrófagos e altos níveis de IL-1 β , COX-2, TGF- α no lavado broncoalveolar (YOSHIZAKI *et al.*, 2017).

Com relação ao tratamento, outros fitoterápicos, em diferentes modelos, também reduziram níveis de mediadores inflamatórios. O extrato de *Ginko Biloba* inibiu a expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α e COX-2 na cóclea de ratos com perda auditiva induzida por barulho (DOGAN *et al.*, 2017). A dicentrina, alcaloide de aporfina encontrado nas raízes de *Lindernis*

megaphylla, aumentou a morte celular induzida por TNF- α em células de câncer de pulmão A549, reduzindo a invasão celular devido, pelo menos em parte, à supressão de vias de sinalização KB (OOPPACHAI, LIMTRAKUL, YODKEEREE, 2019).

Níveis aumentados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em camundongos portadores de câncer induzidos por benzopireno foram alterados após o tratamento com limonina, encontrada nas sementes de limão e laranja, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios. O tratamento com limonina resultou na ativação da caspase-9 de maneira dose-dependente, o que aumentou simultaneamente a atividade da caspase-3. Esses resultados enfatizam que a limonina induziu apoptose pela via intrínseca dependente de mitocôndrias e produziu ERO (GONG *et al.*, 2019).

Finalmente, um resultado interessante obtido pela técnica de *Western blotting* foi a intensa redução da proteína α -Tubulina com a administração da PL. Esse achado está relacionado à presença de um anel trimetoxiaromático na estrutura do PL, o que pode favorecer uma interação com tubulina (SALUM *et al.*, 2013). Além disso, Meegan e colaboradores (2017) indicaram a PL como um agente desestabilizador de microtúbulos com efeitos antiproliferativos, o que fornece evidências de que a PL afeta a polimerização da tubulina. Esse efeito da PL é importante para controle da proliferação celular de células cancerígenas.

Diante do exposto, os resultados encontrados são condizentes com os dados de literatura e confirmam a potencialidade terapêutica da PL em condições inflamatórias e tumorais do pulmão, por meio da regulação de diferentes proteínas e mediadores químicos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo, em modelo de carcinogênese induzida por benzopireno e tratamento com a PL, permitem concluir que:

- a) Ocorre aumento dos parâmetros pulmonares (ventilação, frequência e volume) e de hemoglobina nos animais induzidos e não tratados. A administração da PL mantém esses valores semelhantes ao grupo sham. Não há variação de peso entre grupos;
- b) Há redução de danos ao DNA, do número de células inflamatórias (linfócitos, monócitos e neutrófilos) no LBA e preservação da arquitetura pulmonar no grupo induzido por benzopireno e tratado com PL;
- c) O benzopireno eleva as expressões da AnxA1, COX-2, Bcl-2 e NF- κ B, enquanto a administração da PL mantém os níveis aumentados de AnxA1 mas reduz as expressões de COX-2, Bcl-2 e NF- κ B.
- d) As citocinas IL-1 β , IL-17 e TNF- α são aumentadas pelo benzopireno mas retornam aos níveis próximos aos controles com o tratamento pela PL.

Em conjunto, os dados indicam a potencialidade da PL para futuras estratégias anti-inflamatória e antitumoral em afecções pulmonares.

7. REFERÊNCIAS

- ANANDAKUMAR, P. *et al.* Capsaicin inhibits benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in an in vivo mouse model. **Inflammation Research**, v. 61, n. 11, p. 1169-1175, 2012.
- ARLT, Volker M. *et al.* Pulmonary inflammation impacts on CYP1A1-mediated respiratory tract DNA damage induced by the carcinogenic air pollutant benzo [a] pyrene. **Toxicological Sciences**, v. 146, n. 2, p. 213-225, 2015.
- ARYAL, Shambhu; DIAZ-GUZMAN, Enrique; MANNINO, David M. Influence of sex on chronic obstructive pulmonary disease risk and treatment outcomes. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 9, p. 1145, 2014.
- BAO, Zhang *et al.* IL-17A-producing T cells are associated with the progression of lung adenocarcinoma. **Oncology reports**, v. 36, n. 2, p. 641-650, 2016.
- BARRERA, Lourdes *et al.* Levels of peripheral blood polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and selected cytokines are potentially prognostic of disease progression for patients with non-small cell lung cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 67, n. 9, p. 1393-1406, 2018.
- BEZERRA, Daniel P. *et al.* Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 652, n. 2, p. 164-174, 2008.
- BEZERRA, Daniel P. *et al.* Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 453-463, 2013.
- BOZINOVSKI, Steven; ANTHONY, Desiree; VLAHOS, Ross. Targeting pro-resolution pathways to combat chronic inflammation in COPD. **Journal of thoracic disease**, v. 6, n. 11, p. 1548, 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Diretrizes para a prática de eutanásia do CONCEA. 2013.
- CATACCHIO, Ivana *et al.* Immune prophets of lung cancer: the prognostic and predictive landscape of cellular and molecular immune markers. **Translational oncology**, v. 11, n. 3, p. 825-835, 2018.
- COMPTON, C. *et al.* The Novartis view on emerging drugs and novel targets for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 26, n. 5, p. 562-573, 2013.
- CUI, Yanfei; YANG, Shengya. Overexpression of Annexin A1 protects against benzo [a] pyrene-induced bronchial epithelium injury. **Molecular medicine reports**, v. 18, n. 1, p. 349-357, 2018.

- DALRYMPLE, Annette *et al.* Cigarette smoke induced genotoxicity and respiratory tract pathology: evidence to support reduced exposure time and animal numbers in tobacco product testing. **Inhalation toxicology**, v. 28, n. 7, p. 324-338, 2016.
- DIAZ-GUZMAN, Enrique; MANNINO, David M. Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease. **Clinics in chest medicine**, v. 35, n. 1, p. 7-16, 2014.
- DOGAN, Remzi *et al.* Influence of Ginkgo Biloba extract (EGb 761) on expression of IL-1 Beta, IL-6, TNF- α , HSP-70, HSF-1 and COX-2 after noise exposure in the rat cochlea. **Auris Nasus Larynx**, v. 45, n. 4, p. 680-685, 2018.
- FONTENELE, Juvenia B. *et al.* Antiplatelet effects of pipartine, an alkamide isolated from Piper tuberculatum: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 511-515, 2009.
- GINZBURG, Serge *et al.* Piperlongumine inhibits NF- κ B activity and attenuates aggressive growth characteristics of prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 74, n. 2, p. 177-186, 2014.
- GOLOVINE, Konstantin V. *et al.* Piperlongumine induces rapid depletion of the androgen receptor in human prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 73, n. 1, p. 23-30, 2013.
- GONG, Cuike *et al.* Anticancer effect of Limonin against benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice and the inhibition of A549 cell proliferation through apoptotic pathway. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, 2019.
- GOVINDAN, Ramaswamy *et al.* Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. **Journal of clinical oncology**, v. 24, n. 28, p. 4539-4544, 2006.
- GRANT, Geraldine M. *et al.* JP-8 jet fuel-induced DNA damage in H4IIE rat hepatoma cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 490, n. 1, p. 67-75, 2001.
- GU, Sun Mi *et al.* Piperlongumine attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis through inhibition of NF- κ B activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 103, p. 133-145, 2017.
- HACHESU, Vida Rezaei *et al.* Carbon load in airway macrophages, DNA damage and lung function in taxi drivers exposed to traffic-related air pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 7, p. 6868-6876, 2019.
- HAN, Jia Gang *et al.* Piperlongumine chemosensitizes tumor cells through interaction with cysteine 179 of I κ B α kinase, leading to suppression of NF- κ B-regulated gene products. **Molecular cancer therapeutics**, v. 13, n. 10, p. 2422-2435, 2014.
- HANG, Wei *et al.* Piperlongumine and p53-reactivator APR-246 selectively induce cell death in HNSCC by targeting GSTP1. **Oncogene**, v. 37, n. 25, p. 3384, 2018.

HOCKEL, Michael; VAUPEL, Peter. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **Journal of the National Cancer Institute**, v.93,n.4,p.266-276, 2001.

HUANG, Haishan *et al.* PHLPP2 downregulation contributes to lung carcinogenesis following B [a] P/B [a] PDE exposure. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 16, p. 3783-3793, 2015.

HUDLIKAR, Rasika R. *et al.* Polymeric black tea polyphenols (PBPs) inhibit benzo (a) pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung carcinogenesis potentially through down-regulation of p38 and Akt phosphorylation in A/J mice. **Molecular carcinogenesis**, v. 56, n. 2, p. 625-640, 2017.

IMANIKIA, Soudabeh *et al.* The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 45, p. 356-361, 2016.

IWASHITA, Masaya *et al.* Piperlongumine, a constituent of *Piper longum* L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A2 receptor antagonist. **European journal of pharmacology**, v. 570, n. 1-3, p. 38-42, 2007.

JAFRI, Syed H.; SHI, Runhua; MILLS, Glenn. Advance lung cancer inflammation index (ALI) at diagnosis is a prognostic marker in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): a retrospective review. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 158, 2013.

JYOTHI, D. *et al.* Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of piplartine isolated from *Piper chaba*. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1085-1091, 2009.

KARKI, Keshav *et al.* Piperlongumine induces reactive oxygen species (ROS)-dependent downregulation of specificity protein transcription factors. **Cancer Prevention Research**, v. 10, n. 8, p. 467-477, 2017.

KIANMEHR, Mojtaba; HAJAVI, Jafar; GAZERI, Javad. Assessment of DNA damage in blood lymphocytes of bakery workers by comet assay. **Toxicology and industrial health**, v. 33, n. 9, p. 726-735, 2017.

KONG, Eun-Hee *et al.* Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. **Oncology reports**, v. 20, n. 4, p. 785-792, 2008.

LEBRON, Isabella de Souza Lima *et al.* Modulation of the endogenous Annexin A1 in a cigarette smoke cessation model: Potential therapeutic target in reversing the damage caused by smoking?. **Pathology-Research and Practice**, v. 215, n. 10, p. 152614, 2019.

LIMA, Ana Rita Rego de. **O efeito do tabaco na fertilidade masculina**. 2016. Tese de Doutorado.

LIU, Yuanyuan *et al.* Biodegradable nanoassemblies of piperlongumine display enhanced anti-angiogenesis and anti-tumor activities. **Nanoscale**, v. 6, n. 8, p. 4325-4337, 2014.

LORÈ, Nicola Ivan; BRAGONZI, Alessandra; CIGANA, Cristina. The IL-17A/IL-17RA axis in pulmonary defence and immunopathology. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 30, p. 19-27, 2016.

LU, Qing-Yi *et al.* Green tea inhibits cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer cells through the induction of Annexin-1. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 427, n. 4, p. 725-730, 2012.

MAILHOT-LAROCHE, Samuel *et al.* Repeated airway constrictions in mice do not alter respiratory function. **Journal of Applied Physiology**, v. 124, n. 6, p. 1483-1490, 2018.

MALENICA, Maja *et al.* Effect of cigarette smoking on haematological parameters in healthy population. **Medical Archives**, v. 71, n. 2, p. 132, 2017.

MALKINSON, Alvin M.; BEER, Deborah S. Major Effect on Susceptibility to Urethan-Induced Pulmonary Adenoma by a Single Gene in BALB/cBy Mice. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 70, n. 5, p. 931-936, 1983.

MCGEACHY, Mandy J.; CUA, Daniel J.; GAFFEN, Sarah L. The IL-17 family of cytokines in health and disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 892-906, 2019.

MEEGAN, Mary J. *et al.* Piperlongumine (piplartine) and analogues: Antiproliferative microtubule-destabilising agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 125, p. 453-463, 2017.

MILLER, York E. *et al.* Induction of a high incidence of lung tumors in C57BL/6 mice with multiple ethyl carbamate injections. **Cancer letters**, v. 198, n. 2, p. 139-144, 2003.

MULTHOFF, Gabriele; MOLLS, Michael; RADONS, Jürgen. Chronic inflammation in cancer development. **Frontiers in immunology**, v. 2, p. 98, 2012.

NAIKA, Raja; PRASANNA, K. P.; GANAPATHY, PS Sujana. Antibacterial activity of piperlongumine an alkaloid isolated from methanolic root extract of Piper Longum L. **Pharmacophore**, v. 1, n. 2, p. 141-148, 2010.

NAVICKIENE, Hosana Maria D. *et al.* Antifungal amides from Piper hispidum and Piper tuberculatum. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621-626, 2000.

OOPPACHAI, Chanatip *et al.* Dicentrine Potentiates TNF- α -Induced Apoptosis and Suppresses Invasion of A549 Lung Adenocarcinoma Cells via Modulation of NF- κ B and AP-1 Activation. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4100, 2019.

OSER, Matthew G. *et al.* Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 4, p. e165-e172, 2015.

PETIT, Pascal *et al.* Lung cancer risk assessment for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in various industries. **Environment international**, v. 124, p. 109-120, 2019.

PISKA, Kamil *et al.* Piperlongumine (pipartine) as a lead compound for anticancer agents– Synthesis and properties of analogues: A mini-review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 156, p. 13-20, 2018.

POSSEBON, Lucas *et al.*(a) Anti-inflammatory actions of herbal medicines in a model of chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 591-597, 2018.

POSSEBON, Lucas *et al.*(b) Mimetic peptide AC2-26 of annexin A1 as a potential therapeutic agent to treat COPD. **International immunopharmacology**, v. 63, p. 270-281, 2018.

RAJ, Chenna Govindaraju Darshan *et al.* In vivo peritoneal antiangiogenesis and in vitro antiproliferative properties of some bischalcone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 4, p. 453-458, 2012.

RUIZ, A. Martín *et al.* Efectos tóxicos del tabaco. **Revista de toxicología**, v. 21, n. 2-3, p. 64-71, 2004.

SALEHI, Bahare *et al.* Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019.

SALINAS, José; LEIVA, Isabel; GONZÁLEZ, SERGIO. Proliferaciones linforreticulares del pulmón. **Revista chilena de enfermedades respiratorias**, v. 22, n. 2, p. 108-116, 2006.

SALUM, Livia B. *et al.* Cytotoxic 3, 4, 5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 63, p. 501-510, 2013.

SANT'ANA, M; SOUZA, HR; POSSEBON, L; CORNÉLIO, ML; RIFFO-VASQUEZ, Y; GIROL, AP; OLIANI, SM. **Effect of piperlongumine during exposure to cigarette smoke reduces inflammation and lung injury**. *Pulm Pharmacol Ther.* 2020 Jan 24;61:101896. doi: 10.1016/j.pupt.2020.101896.

SEOK, Jin Sil *et al.* Piperlongumine decreases cell proliferation and the expression of cell cycle-associated proteins by inhibiting Akt pathway in human lung cancer cells. **Food and chemical toxicology**, v. 111, p. 9-18, 2018.

SHARIFI-RAD, Mehdi *et al.* Antiulcer agents: From plant extracts to phytochemicals in healing promotion. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1751, 2018.

SHI, Q.; GODSCHALK, R. W. L.; VAN SCHOOTEN, F. J. Inflammation and the chemical carcinogen benzo [a] pyrene: Partners in crime. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 774, p. 12-24, 2017.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016.

SRIVASTAVA, Raghvendra M. *et al.* CD137 stimulation enhances cetuximab-induced natural killer: dendritic cell priming of antitumor T-cell immunity in patients with head and neck cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 3, p. 707-716, 2017.

SUN, Lan-Di *et al.* Development and mechanism investigation of a new piperlongumine derivative as a potent anti-inflammatory agent. **Biochemical pharmacology**, v. 95, n. 3, p. 156-169, 2015.

TRAVIS, William D. *et al.* (Ed.). **WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart**. International Agency for Research on Cancer, 2015.

VISWANATHAN, S.; GRACE, VM Berlin. Reduced RAR- β gene expression in Benzo (a) Pyrene induced lung cancer mice is upregulated by DOTAP lipo-ATRA treatment. **Gene**, v. 668, p. 18-26, 2018.

WANG, Feng *et al.* Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 362-373, 2015.

WU, Feng *et al.* The role of interleukin-17 in lung cancer. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

YAO, Lan; CHEN, Hai-ping; MA, Qing. Piperlongumine alleviates lupus nephritis in MRL-Fas (lpr) mice by regulating the frequency of Th17 and regulatory T cells. **Immunology letters**, v. 161, n. 1, p. 76-80, 2014.

YADAV, Vaishali; KRISHNAN, Anuja; VOHORA, Divya. A systematic review on Piper longum L.: Bridging traditional knowledge and pharmacological evidence for future translational research. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 112255, 2019.

YOSHIZAKI, Kelly *et al.* The effects of particulate matter on inflammation of respiratory system: Differences between male and female. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 284-295, 2017.

YU, Feng *et al.* Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons derived from vehicle exhaust gas induces premature senescence in mouse lung fibroblast cells. **Molecular medicine reports**, v. 19, n. 5, p. 4326-4334, 2019.

XU, Siqi *et al.* Piperlongumine inhibits the proliferation, migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Inflammation Research**, v. 67, n. 3, p. 233-243, 2018.

ZHENG, Jie *et al.* Piperlongumine inhibits lung tumor growth via inhibition of nuclear factor kappa B signaling pathway. **Scientific reports**, v. 6, p. 26357, 2016.

ZHOU, Li *et al.* Repression of Hexokinases II-Mediated Glycolysis Contributes to Piperlongumine-Induced Tumor Suppression in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **International journal of biological sciences**, v. 15, n. 4, p. 826, 2019.