



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

GIULLIANO REZENDE SILVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL TERATOGENICO DA
PIPLARTINA NO DESENVOLVIMENTO DE CAMUNDONGOS (*Mus
musculus*).**

BRASÍLIA-DF

2022

GIULLIANO REZENDE SILVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL TERATOGENICO DA
PIPLARTINA NO DESENVOLVIMENTO DE CAMUNDONGOS (*Mus
musculus*)**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília

Orientador: Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

Co-orientador: Dr. Prof. Dr. José Eduardo Baroneza

BRASÍLIA – DF

2022

GIULLIANO REZENDE SILVA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL TERATOGENICO DA
PIPLARTINA NO DESENVOLVIMENTO DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, pelo Programa de Pós-Graduação.

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

Universidade de Brasília – UnB

(Presidente)

Dr. José Eduardo Baroneza

Universidade de Brasília – UnB

(Co-orientador)

Dra. Leiz Maria Costa Vêras

(UFDFPar e IESVASP)

(Membro externo)

Dr. David Fernandes Lima

(UNIVASF)

(Membro externo)

Dr. Amilcar Sabino Damazo

Universidade de Brasília – UnB

(Membro interno)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pelo dom da vida e por toda sabedoria, Ele esteve ao meu lado em todos os momentos, nos mais difíceis foi Ele quem me fez forte para que aqui eu chegasse.

Aos meus pais Maria Aparecida Rezende Silva (*in memoriam*) e Jair da Silva, que foram pilares indispensáveis em minha construção pessoal.

A minha namorada Sandra, por toda paciência durante toda essa jornada, pelo incentivo e por todo companheirismo, além de toda a ajuda no tratamento dos animais, abrindo mão de vários finais de semana.

Aos meus orientadores, os professores José Roberto Leite e José Eduardo Baroneza, agradeço por todo o incentivo e apoio durante toda essa trajetória do mestrado.

A Dra. Andreanne Gomes Vasconcelos e Dr. Daniel Carneiro, companheiros de laboratório, por toda a contribuição e colaboração.

A Glorinha, minha amiga e parceira de trabalho, por todo incentivo a fazer o mestrado.

A Ariane, amiga e doutoranda pela grande ajuda na etapa final da parte escrita.

Aos médicos veterinários Rafael, Mariana e Fernanda por terem me acompanhado durante os procedimentos e me ensinado nos tratamentos dos animais.

Aos tratadores de animais, Hercules, Wilson e Derison, por terem gentilmente me instruído nesse processo.

As alunas de IC, Shirley Aline da Costa Arteaga da Silva e Livia Thais Gontijo Miranda, pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Ao Bruno Silva Sá, por toda colaboração e disposição para auxiliar na escrita.

Ao Elivaldo Ribeiro de Santana, mestrando e servidor da Universidade de Brasília.

Aos professores Jorge Kato Massuo, Aline Pic-Taylor, Laise Rodrigues de Andrade por toda disposição e contribuição para elevar o nível deste trabalho.

EPÍGRAFE

Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas
aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.

Clarice Lispector - Escritora e Jornalista (1920-1977)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade geral do uso da piplartina (*Piper tuberculatum*), como também, analisar seu potencial teratogênico no desenvolvimento fetal de camundongos (*Mus musculus*). Para a execução do trabalho, os camundongos foram dispostos na proporção de três fêmeas para um macho, para a realização do coito. Na sequência após a constatação da gravidez da fêmea, por meio da presença da rolha vaginal, iniciou-se o tratamento com a piplartina nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/kg. O tratamento das fêmeas grávidas, foi realizado via gavagem, uma vez ao dia, no intervalo do sexto ao décimo oitavo dia de gestação, e os animais monitorados. Neste trabalho foram analisados aspectos como, toxicidade materna, toxicidade embrio-fetal, análise visceral fetal, análise esquelética fetal, análise hematológica e bioquímica e, por fim, a fragmentação de DNA e ciclo celular. No geral, a toxicidade materna foi avaliada por meio de observações referentes ao peso dos órgãos, como fígado, baço, coração, intestino, pulmão e placenta, no qual foram retirados e pesados. Estes dados demonstram que mesmo não apresentando diferença estatística entre os grupos, dos órgãos analisados, o coração apresentou o maior ganho de peso no grupo experimental de 100mg/kg e os demais órgãos nas outras concentrações testadas. Além disso, a toxicidade embrio-fetal não apresentou diferença estatística entre os camundongos estudados. Em relação as anomalias fetais, e análises esqueléticas fetais também não foram apresentadas alterações ligadas a piplartina. As análises hematológicas e bioquímica também foram realizadas, onde podemos observar que não houve mudança significativa nos eritogramas, leucogramas e plaquetogramas avaliados. Na avaliação de fragmentação do DNA em células da medula óssea, os resultados expressam taxas de fragmentação inferior a 22% nos grupos experimentais, similar a fragmentação de aproximadamente 19% do controle. A distribuição de subpopulação de células no ciclo celular, evidencia diferença estatística significativa na fase S do grupo experimental tratado na concentração de 50 mg/Kg de piplartina. Os resultados corroboram com a segurança da exposição da piplartina às concentrações e modelo animal avaliado, sendo possível observar que a piplartina não demonstrou efeitos tóxicos significativos e/ou correlacionados à exposição dos grupos experimentais. O estudo demonstrou potencial inovador referente a molécula, proporcionando resultados promissores para estudos posteriores e corroborando com aplicações biomédicas, nanotecnológicas e farmacêuticas.

Palavra-chave: teratogênese, produtos naturais, biotecnologia, Piperaceae.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the general toxicity of the use of piplartine (*Piper tuberculatum*), as well as to analyze its teratogenic potential in the embryonic development of mice (*Mus musculus*). For the execution of the work, the mice were arranged in the proportion of three females for one male, for the accomplishment of the coitus. Following the confirmation of the female's pregnancy, through the presence of the vaginal plug, treatment with piplartine at concentrations of 25, 50 and 100 mg/Kg was started. Treatment of pregnant females was performed via gavage, once a day, between the sixth and eighteenth day of gestation, and the animals were monitored. In this work, aspects such as maternal toxicity, embryo-fetal toxicity, fetal visceral analysis, fetal skeletal analysis, hematological and biochemical analysis and finally, DNA fragmentation and cell cycle were analyzed. Overall, maternal toxicity was assessed through visual observations regarding the weight of organs, such as liver, spleen, heart, intestine, lung and placenta, from which they were removed and weighed. These data demonstrate that even with no statistical difference between the groups of Organs analyzed organs, the heart showed the greatest weight gain in the experimental group of 100mg/kg and the other organs in the other concentrations tested. In addition, embryo-fetal toxicity showed no statistical difference between the mice studied. Regarding fetal anomalies, and fetal skeletal analyses, there were also no changes related to piplartine. Hematological and biochemical analyzes were also performed, where we can observe that there was no significant change in the erythograms, leukograms and plateletograms evaluated. In the evaluation of DNA fragmentation in bone marrow cells, the results expressed fragmentation rates of less than 22% in the experimental groups, similar to fragmentation of approximately 19% in the control. The distribution of subpopulation of cells in the cell cycle shows a statistically significant difference in the S phase of the experimental group treated at the concentration of 50 mg/Kg of piplartine. The results corroborate the safety of piplartine exposure to the concentrations and animal model evaluated, and it is possible to observe that piplartine did not demonstrate significant toxic effects and/or correlated with the exposure of the experimental groups. The study demonstrated innovative potential regarding the molecule, providing promising results for further studies and corroborating biomedical, nanotechnological and pharmaceutical applications.

Keywords: teratogenesis, natural products, biotechnology, Piperaceae.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** (A) *Piper tuberculatum* Jacq. (“Pimenta de Macaco (B) Estrutura molecular da piplartina (1-[(E)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-enoyl]-2,3-dihydropyridin-6-one, IUPAC).....34
- Figura 2.** Imagens representativas do material biológico processado para os estudos toxicológicos. (A) Planos de secções fetais para análise visceral: a. Secção transversal na altura da cavidade oral. b. Secção frontal na região pré-glabealar; c. Secção frontal na região orbital; d. Secção frontal na região do vértex; e. Secção transversal na região cervical; f. Secção transversal na região abdominal, logo abaixo do diafragma; g. Secção transversal na região pélvica, passando pelo umbigo. (B): Rim direito com glândula adrenal aderida à porção superior e ureter esquerdo aumentado (I) e rim esquerdo com glândula adrenal não aderida à porção superior (II). (C): Medula espinhal (I); rim direito (II) e rim esquerdo (III) com suas respectivas glândulas adrenais aderidas à porção superior. O rim esquerdo apresenta-se bilobado e com formato anormal em comparação ao rim direito. Sobre o rim direito, há duas suprarrenais. (D) Ausência da glândula adrenal no rim direito (I); rim esquerdo com aspecto normal e glândula adrenal aderida à porção superior (II); ureteres direito (III) e esquerdo (IV); gônadas masculinas direita (VII) e esquerda (V); bexiga (6). (E) Feto de camundongo corado com alizarina, vista lateral esquerda. (F) Esternébra reduzida.38
- Figura 3.** Número de implantações, reabsorções (A) e fetos vivos e mortos (B) expostos aos grupos experimentais de 25, 50 e 100 mg/kg e controle DMSO 2%.....42
- Figura 4.** Massa em grama dos órgãos maternos em relação aos grupos experimentais de 25, 50 e 100 mg/kg e controle DMSO 2%.....44
- Figura 5.** Efeito da piplartina em células de medula óssea. (A) Porcentagem de DNA fragmentando e (B) porcentagem da população de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo células. Estatística: Kruskal-Wallis e Dunn post hoc. *Diferença significativa se comparado ao controle (p valor 0,0095)50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Revisão bibliográfica da piplartina.....	22
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Alterações no peso materno, órgãos maternos e no ganho de peso corporal corrigido (D peso) nas diferentes doses entre o 6º e 18º dia de experimento.....	41
---	----

Tabela 2. Média e desvio padrão da avaliação embrio-fetal por grupo e medidas do teste estatístico*.....	43
---	----

Tabela 3. Anomalias viscerais observadas nos grupos experimentais.....	45
---	----

Tabela 4. Anomalias esqueléticas observadas nos grupos experimentais.....	46
--	----

Tabela 5. Análise hematológica observada nos grupos experimentais.....	48
---	----

Tabela 6. Análise bioquímica observada nos grupos experimentais.....	49
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
Referências bibliográficas	17
 CAPÍTULO I	
1. Introdução	20
2. Material e Métodos	21
3. Resultados e discussão	21
4. Conclusão	28
Referências Bibliográficas	28
 CAPÍTULO II	
1. Introdução	34
2. Material e Métodos	35
2.1 Obtenção da iplartina.....	35
2.2 Animais.....	36
2.3 Acasalamento dos animais.....	36
2.4 Toxicidade materna.....	37
2.5 Laparotomia.....	37
2.6 Análise de anomalias fetais.....	38
2.7 Análises hematológica e bioquímica.....	39
2.8 Fragmentação de DNA e ciclo celular.....	39
2.9 Análises estatísticas.....	40
3. Resultados e discussão	40
3.1 Toxicidade materna.....	40
3.2 Toxicidade embrio-fetal.....	43
3.3 Análise visceral fetal.....	44
3.4 Análise esquelética fetal.....	46
3.5 Análises hematológica e bioquímica.....	47

3.6 Estudos de fragmentação do DNA e ciclo celular.....	50
4. Conclusão.....	51
Referências Bibliográficas.....	52
ANEXOS.....	55

INTRODUÇÃO

A procura por compostos bioativos a partir de produtos naturais têm se tornado cada vez mais usual, uma vez que estes compostos, podem vir a ser uma alternativa eficaz e acessível para o tratamento e prevenção de doenças. Além disso, a disponibilidade de bibliotecas de compostos naturais vêm sendo uma ferramenta significativa para a identificação de novos compostos bioativos. Nesse contexto, a pesquisa por alternativas terapêuticas tem trazido inúmeros benefícios, já que através dessas moléculas naturais podem ser estudadas suas atividades biológicas, propiciando aplicações farmacêuticas, alimentícias e cosméticas (KOEHN, CARTER, 2005).

O uso terapêutico de plantas medicinais está presente desde os primórdios da história humana; é descrito na literatura que as plantas do gênero *Piper* possuem ampla atividade na medicina tradicional sendo utilizado para diversos fins como tumores, bronquite, asma, tosse, infecções respiratórias, cólera, malária, hepatite viral, gonorréia, constipação, diarreia, dor de estômago, paralisia da língua, doenças do baço e doenças tropicais negligenciadas em geral (BEZERRA *et al*, 2013; BEZERRA *et al*, 2009).

A piperlongumina, também conhecida como piperlongumina, é caracterizada por ser um composto amida alcalóide proveniente das plantas do gênero *Piper* e pode ser encontrada nas espécies: *Piper alatabaccum*, *Piper chaba Hunter*, *Piper cenocladum*, *Piper longum*, *Piper tuberculatum*, e *Piper puberulum* (BEZERRA *et al*, 2013). Tem sido descrito na literatura que esse composto apresenta atividades leishmanicida, esquistossomicida, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e imunomodulatória, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BEZERRA *et al*, 2006; BEZERRA *et al*, 2013; ARAÚJO-VILGES *et al*, 2017; MOREIRA *et al*, 2018; MENGARDA *et al*, 2020; BEZERRA, 2007).

Na medicina ayurvedica a piperlongumina se apresenta como uma alternativa terapêutica contra tumores devido a seus efeitos genotóxicos e indutores do estresse oxidativo (COSTA-LOTUFO *et al*, 2005). Esse composto, também demonstra capacidade na redução de angiogênese e na inibição de vasos sanguíneos em xenoenxertos tumorais de camundongos. Relatos recentes, mostram a análise da piperlongumina como um promissor inibidor da migração de células de câncer de mama, e indutor seletivo na morte de celular de células cancerosas (ROH *et al*, 2014; LEE, 2009).

A farmacocinética da piplartina ainda não foi bem estabelecida, indicando que essa substância possui melhor biodisponibilidade em modelos murinos por administração oral. Estudos prévios com modelos murinos, como os de linhagem Swiss, foram realizados testando a piplartina, para determinação da toxicidade. Em modelos *in vivo* tratados com a piplartina, foram analisados parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos e morfológicos, não havendo nenhuma alteração significativa nos parâmetros bioquímicos e hematológicos quando comparados ao controle. A análise histopatológica indicou apenas uma leve e reversível alteração nos rins, indicando que a piplartina possui toxicidade sistêmica fraca para esses modelos (BEZERRA, 2013).

Diante deste cenário, podemos salientar que a piplartina é uma molécula promissora que já demonstrou apresentar características, antiparasitárias e efeitos citotóxicos, podendo dessa forma, ser utilizada como planta medicinal. A aplicação da piplartina é comprovadamente variada, podendo ser usada inclusive em tratamentos de doenças digestivas e respiratórias, sedativo e soro antiofídico (DE SOUZA OLIVEIRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2021; DOS SANTOS SALES *et al.*, 2017; BRAGA, 1960; SIMÕES, 2009; SILVA *et al.*, 2016). Todos esses efeitos relatados estão relacionados direta ou indiretamente à presença dos metabólitos secundários voláteis e não voláteis produzidos por essa planta.

Tradicionalmente, estudos realizados em modelos murinos, proporcionam uma triagem confiável para a pesquisa do potencial teratogênico em humanos. E, apesar da constatação de baixa toxicidade da piplartina, ainda existem algumas questões a serem debatidas, e dentre elas, o efeito citotóxico deste composto em modelos experimentais murinos gestantes, uma vez que a malformação de fetos pode estar intimamente ligada ao uso de medicamentos (SCHULER-FACCINI *et al.*, 2002).

Um marco histórico em relação ao uso de medicamentos por grávidas, foi o uso da Talidomida (1957), hoje considerado um teratogênico potente à saúde humana. Após 5 anos da sua comercialização no mercado farmacêutico, já havia mais de 10 mil casos de defeitos congênitos associados ao medicamento. Este episódio, serviu como alerta sobre a importância dos riscos do uso incorreto de medicamentos. No Brasil, existe uma rede nacional de informação a respeito de substâncias teratogênicas, o Sistema Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos (SIAT), com serviços gratuitos em várias cidades do país (SCHULER-FACCINI *et al.*, 2002).

Há um grande número de substâncias cujo o potencial teratogênico ainda não se conhece, e com isso as instituições passaram a se preocupar, não apenas com a

comercialização e produção de medicamentos, mas sim com as pacientes gestantes. Nesse sentido, a farmacovigilância têm exercido seu papel, operando na avaliação, compreensão e prevenção de efeitos adversos ou qualquer possível problema relacionado a medicamento (SCHULER-FACCINI *et al*, 2002).

Segundo dados do boletim de saúde, o uso indevido de remédios durante a gravidez, acarretam em cerca de 3% das malformações fetais, principalmente quando estes são administrados no primeiro trimestre. Devido à alta toxicidade das drogas existentes para gestantes, torna-se necessário estudos realizados com moléculas naturais alternativas para aplicações biomédicas, e que não apresentem riscos ao feto. A exposição a fármacos na ocasião da concepção e implantação do óvulo fecundado pode matar o feto, e a paciente pode nunca saber que esteve grávida. Os primeiros 3 meses são os mais críticos em termos de malformações. Defeitos funcionais e comportamentais têm sido associado com exposição a drogas em fases posteriores da gestação (SCHULER-FACCINI *et al*, 2002).

O efeito tóxico de um agente químico pode ocorrer durante todos os períodos do desenvolvimento embriológico e fetal de um mamífero, no entanto, as consequências podem variar conforme o período de exposição (BERNARDI; SPINOSA, 2017). Muitas agências reguladoras, tais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estimulam que sejam realizados testes com modelos animais para avaliar os possíveis efeitos teratogênicos oriundos da exposição de fármacos em potencial, tendo em vista a segurança na administração destes compostos no decorrer do período gestacional.

O presente trabalho associou o teste de produtos naturais a partir da biodiversidade brasileira, com foco em teratogênese e toxicidade em fetos. A matéria-prima utilizada foram raízes dos espécimes de *Piper tuberculatum*, previamente coletados e identificados por especialistas, e na sequência, foram obtidos os extratos puros para a testagem em camundongos murinos gestantes.

P. tuberculatum é comumente conhecida como pimenta comprida, pimenta-de-macaco, pimenta-longa ou pimenta d'arda (CASTRO, 2007; BRAGA, 1960; SILVA *et al.*, 2016; GUIMARÃES; DA SILVA GIORDANO, 2004; DE SOUZA OLIVEIRA *et al.*, 2018;). As plantas de *P. tuberculatum* geralmente são arbustos com cerca de 2-2,5 m de altura e largura de 3,6-12,2 m. Desenvolvem-se em altitudes de aproximadamente 550 m, em encostas úmidas. Presentes nos continentes Americano e Antilhas, no Brasil são encontradas nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba,

Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso (GUIMARÃES; DA SILVA GIORDANO, 2004).

Diversos estudos, apontam as substâncias de *P. tuberculatum* como potencial controlador de pragas, tendo altas taxas de mortalidades de insetos e larvas de mosquitos (NAVICKIENE *et al.*, 2007; SCOTT *et al.*, 2002; SCOTT *et al.*, 2005). Geralmente são utilizados os extratos de sementes, caule e folhas dessa espécie, para provocar a mortalidade de pragas, ou seja, apresentam potencial inseticida (DEBONSI NAVICKIENE *et al.*, 2006; CASTRO, 2007; SCOTT *et al.*, 2005).

Em suma, visando novas abordagens terapêuticas eficazes, com baixa toxicidade e com via de administração oral, e o efeito imunomodulador da piplartina, o principal objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade e o potencial teratogênico da piplartina no uso experimental em fêmeas grávidas de camundongos *Mus musculus*. Este trabalho agrega pesquisas para o desenvolvimento e aplicações a partir da piplartina e fornece dados científicos e tecnológicos que visam subsidiar o desenvolvimento de novos produtos em prol da saúde e qualidade de vida.

Referências Bibliográficas

- ARAÚJO-VILGES K.M, *et al.* Effect of piplartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice. **Pharm Biol.** 2017;55(1):1601-7.
- BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 900-908.
- BEZERRA D.P, *et al.* In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Braz J Med Biol Res.** 2006 Jun;39(6):801-7. doi: 10.1590/s0100-879x2006000600014. Epub 2006 Jun 2. PMID: 16751987.
- BEZERRA D.P. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicol In Vitro.** 2007 Feb;21(1):1-8. doi: 10.1016/j.tiv.2006.07.007. Epub 2006 Jul 28. PMID: 16971088.
- BEZERRA, D.P, *et al.* Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic mod. el systems. **Mutat Res.** 2009 Jun-Jul;677(1-2):8-13. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.04.007. Epub 2009 Apr 18. PMID: 19379832.
- BEZERRA, D.P. *et al.* Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 453-463, 2013.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**; 3ª ed., Fortaleza, 1960, p. 401
- CASTRO, M. D. J. P. De. Potencial inseticida de extratos de *Piper tuberculatum* JACQ. (Piperaceae) sobre a fase larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH). Universidade Federal do Piauí, 2007
- COSTA-LOTUFO, *et al.* (2005). Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of ethnopharmacology.** 99. 21-30. 10.1016/j.jep.2005.01.041.
- DE SOUZA OLIVEIRA, F. A. *et al.* Antiplasmodial and antileishmanial activities of compounds from *Piper tuberculatum* jacq fruits. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2018.
- DEBONSI NAVICKIENE, H. M. *et al.* Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Quimica Nova**, 2006.
- DOS SANTOS SALES, V. *et al.* In vitro modulation of the antibiotic activity of essential oil from fruits of *Piper tuberculatum* jacq. Revista Cubana de **Plantas Medicinales**, 2017.
- GUIMARÃES, E. F.; DA SILVA GIORDANO, L. C. **Piperaceae do Nordeste brasileiro I: Estado do Ceará.** Rodriguesia, 2004.
- KOEHN F.E., CARTER G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.** 2005 Mar;4(3):206-20. doi: 10.1038/nrd1657. PMID: 15729362.
- LEE, S.W., MANDINOVA, A., 2009. Patent application title: Methods for the treatment of cancer using piperlongumine and piperlongumine **Analogs.** WO 20090312373

MENGARDA A.C., *et al.* Antiparasitic activity of pipartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. **Acta Trop.** 2020;205:105350.

MOREIRA F.L., *et al.* Leishmanicidal effects of Piperlongumine (Pipartine) and its Putative Metabolites. **Planta Med.** 2018;84(15):1141-8.

NAVICKIENE, H.M.D., *et al.* (2007), Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Pest. Manag. Sci.**, 63: 399-403. <https://doi.org/10.1002/ps.1340>

ROH, J.L., *et al.* Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer. **Oncotarget.** 2014 Oct 15;5(19):9227-38. doi: 10.18632/oncotarget.2402. PMID: 25193861; PMCID: PMC4253430.

SANTOS, V. L. P. dos *et al.* Review of Piper species growing in the Brazilian State of Paraná with emphasize on the vegetative anatomy and biological activities. **The Botanical Review**, v. 87, p. 23–54, 2021.

SCHULER-FACCINI, L. *et al.* Avaliação de teratógenos potenciais na população brasileira. **Ciênc. Saúde Coletiva**, São Paulo , v. 7, n. 1, p. 65-71, 2002. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141381232002000100006&lng=en&nrm=iso. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232002000100006>.

SCOTT, I. M. *et al.* Analysis of piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: A method for isolating and identifying unsaturated amides from Piper spp extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2005.

SCOTT, I. M. *et al.* Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: Synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, 2002.

SILVA, R. J. F. *et al.* Caracterização farmacognóstica de Piper arboreum var. arboreum e *P. tuberculatum* (Piperaceae). **Acta Amazonica**, 2016.

SIMÕES, L. F. Efeito do extrato de piper turbeculatum sobre *Schistosoma mansoni* da linhagem BH. 2009. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

CAPÍTULO I

REVISÃO SISTEMÁTICA DAS POTENCIALIDADES DA PIPLARTINA FRENTE A APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

Resumo

Contexto: A piplartina é caracterizada por ser uma amida natural biologicamente ativa, isolada da planta *Piper turbeculatum* Jack, (família Piperaceae). Essa substância possui vastas propriedades farmacológicas que, aliado à saúde humana e bioeconomia, pode resultar em futuras aplicações biomédicas, nanotecnológicas e farmacêuticas. E, embora existam vários estudos relacionados com extratos de plantas dessa família, ainda existem várias lacunas a serem preenchidas a respeito das diversas propriedades desta espécie.

Objetivo: Analisar através de uma revisão sistemática, os principais artigos relevantes da literatura que contenham o uso e as potencialidades da piplartina frente a aplicações biológicas. **Materiais e Métodos:** Foram realizadas pesquisas nos bancos de dados Scielo e Pubmed para a obtenção de artigos atuais e relevantes (2015- 2022) na aplicação da piplartina em âmbito experimental. Através dos descritores selecionados, os artigos foram procurados nos idiomas em Português e Inglês. **Resultado e discussão:** Foram encontrados 14 artigos relevantes baseados nos descritores definidos. Como resultados desta pesquisa, destaca-se que a piplartina possui diferentes abordagens e usos biológicos no âmbito terapêutico e experimental. Através dos artigos encontrados, podemos salientar que a piplartina possui potencial anticâncer, leishmanicida, esquistossomicida, anti-inflamatório, antigúngico, entre outros. **Conclusão:** A piplartina é um composto promissor em diferentes áreas de estudos relatadas, e sua composição química facilita que suas propriedades sejam tão distintas. E, embora sejam muitos os estudos que avaliaram as diferentes propriedades da piplartina, podemos ver este composto como uma substância em potencial para novos ensaios biológicos e experimentais.

Palavras-chave: piplartina ou piperlongumina, toxicidade materna, potencial teratogênico, biologia do desenvolvimento

1. Introdução

A ordem Piperales abrange cinco famílias, sendo elas: Hydnoraceae, Lactoridaceae, Aristolochiaceae, Saururaceae e Piperaceae. A família Piperaceae possui duas subfamílias: Piperioideae e Peperomioideae (RUSCHEL, 2004). As plantas da família Piperaceae são ervas eretas ou escandentes, arbustos ou pequenas árvores, terrestres ou epífitas, estando distribuídas nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo (PARMAR *et al.*, 1997; GUIMARÃES; DA SILVA GIORDANO, 2004). E são encontradas principalmente nas regiões dos trópicos da América Latina e da Ásia (YUNCKER, 1958). Essa família apresenta cerca de 3700 espécies pertencentes a 5 gêneros, sendo que as mais conhecidas são do gênero *Piper* e *Peperomia*. No gênero *Piper* existem cerca de 2000 espécies, esses gêneros apresentam alto valor medicinal, econômico e comercial, por serem pimentas usadas, mundialmente, como temperos picantes (PARMAR *et al.*, 1997; JARAMILLO; MANOS; ZIMMER, 2004; SIMÕES, 2009).

As plantas da família Piperaceae são muito conhecidas na medicina popular contra febre, dores, inflamação em geral, reumatismo, asma, bronquite, doenças intestinais, respiratórias e renais, bem como efeito ansiolítico, anti-inflamatório, antiplaquetário e antitumoral (BEZERRA *et al.*, 2005; 2006; 2008; FELIPE *et al.*, 2007; FONTENELE *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2002). Algumas espécies deste gênero têm sido bem investigadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico, pois são fontes de óleos essenciais bioativos e de grande interesse para as indústrias farmacêuticas. Um dos compostos mais estudados, trata-se da pipartina, que devido à sua baixa toxicidade, e com importante valor farmacológico descoberto, acaba se tornando uma alternativa promissora contra diversas doenças.

Os metabólitos secundários são substâncias liberadas por plantas com a finalidade de defesa contra predadores, patógenos e microrganismos, atuando inclusive na atração de polinizadores, e proteção da planta de radiação ultravioleta, além de diversas outras finalidades (NOGUEIRA, 2019). As amidas liberadas pelas plantas são responsáveis pelas defesas químicas, estando associadas geralmente a atividades biológicas como repelentes ou inseticidas para diferentes espécies de insetos (POHLIT *et al.*, 2004; NAVICKIENE *et al.*, 2007; RAMOS; VANIN; KATO, 2008; RAMOS; KATO, 2009, 2013; SIMÕES, 2009; RAMOS *et al.*, 2020).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo determinar o uso e as aplicações recentes da piplartina frente ao cenário de doenças e questões de saúde, de forma a compreender seu mecanismo, e ter um panorama geral do seu efeito citotóxico, para uma possível aplicação para a promoção de saúde.

2. Materiais e Métodos

O estudo constitui em uma revisão bibliográfica de caráter analítico com a finalidade de analisar os principais usos da piplartina e suas aplicações frente a atividades biológicas. A coleta de dados foi realizada durante a pesquisa de estudo, e utilizou-se para a pesquisa as bases de dados Scientific Electronic Library Online (SCIELO) e National Library of Medicine (PUBMED). E, como critério de inclusão, publicados entre os anos de 2015 e 2022. É importante salientar que os artigos escolhidos tinham como principal objetivo o uso e as aplicações da piplartina no âmbito experimental, visando a análise de seu efeito protetor, fitoterápico e citotóxico.

Neste estudo, primeiramente, foram incluídos artigos científicos que fossem adequados a temática estipulada, com descritores como: Piplartina ou piperlongumina, toxicidade materna, potencial teratogênico, biologia do desenvolvimento, suas combinações e variantes em inglês. Para a busca dos artigos, os descritores foram combinados entre si, utilizando a conjunção gramatical “and” e “or” Para as pesquisas nas bases de dados PUBMED e SCIELO, não foi limitado o idioma, contudo o idioma que mais continham artigos disponíveis foi o Inglês.

Após a seleção dos artigos previamente definidos foram realizadas leituras exploratórias, e na sequência uma leitura seletiva para a escolha do material que mais se adequasse ao objetivo do estudo. Finalizando com a leitura analítica e interpretação e análise dos textos.

3. Resultados e Discussão

Dos artigos encontrados na busca inicial, foram selecionados 14 artigos para a leitura e fichamento. Todos os artigos selecionados foram encontrados de acordo com a combinação dos descritores definidos. Dentre os artigos selecionados, todas as publicações foram encontradas em inglês, totalizando 14 artigos. Em relação ao período de publicação dos artigos analisados, os anos de 2015 à 2022 foram selecionados, sendo

que os anos de 2020 e 2022 concentraram o maior número de artigos publicados, totalizando 4 artigos em cada ano. O ano de 2015 contou apenas com 1 publicação e o restante datava de 2019 e 2021.

Como resultados desta pesquisa, destaca-se que a pipartina possui diferentes abordagens e usos biológicos no âmbito terapêutico e experimental. Através dos artigos encontrados, podemos salientar que a pipartina possui potencial anticâncer, leishmanicida, esquistossomicida, anti-inflamatório, entre outros.

Tabela 1: Revisão bibliográfica da pipartina.

Estudo	Autores	Referências
(E)-Piplartine Isolated from <i>Piper pseudoarboreum</i> , a Lead Compound against Leishmaniasis	Juan C. Ticona, Pablo Bilbao-Ramos, Ninoska Flores, M Auxiliadora Dea- Ayuela, Francisco Bolás- Fernández, Ignacio A. Jiménez, Isabel L. Bazzocchi.	<i>Foods</i> 9 (9), 1250, 2020. doi.org/10.3390/foods9091250
Effect of nanoemulsion modification with chitosan and sodium alginate on the topical delivery and efficacy of the cytotoxic agent pipartine in 2D and 3D skin cancer models	Daniela V. Giacone, Vanessa F.M.C. Dartora, Jenyffer K.R. de Matos, Julia S. Passos, Daniel A. G. Miranda, Erica A. de Oliveira, Edilberto R. Silveira, Leticia V. Costa-Lotufo, Silva S. Maria-Engler, Luciana B. Lopes.	<i>International Journal of Biological Macromolecules</i> 165, 1055-1065, 2020.
Piplartine (piperlongumine), oxidative stress, and use in cancer	Daniel Pereira Bezerra	<i>Academic Press Cancer(Second Edition)</i> 417-425, 2021. doi.org/10.1016/B978-0-12-819547-5.00037-7
Antiparasitic activity of pipartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis.	Mengarda A.C., Mendonça P.S, Morais C.S, Cogo R.M, Mazloun S.F, Salvadori M.C, Teixeira F.S, Morais T.R, Antar G.M, Lago J.H.G, Moraes J.	<i>Acta Tropica</i> 2020 maio;205:105350.

		<i>doi:10.1016/j.actatropica.2020.105350. Epub 2020 18 de janeiro.</i>
Ruthenium complexes with piplartine cause apoptosis through MAPK signaling by a p53-dependent pathway in human colon carcinoma cells and inhibit tumor development in a xenograft model	Ingrid, R.S. Baliza , Suellen, L.R. Silva, Luciano de Santos, João H. Araújo Neto, Rosane B. Dias, Caroline B.S. Vendas, Clarissa A. Gurgel Rocha, Milena B.P. Soares, Alzir A. Batista, Daniel P. Bezerra.	<i>Model. Front Oncol. 3 de julho de 2019; 9:582. doi: 10.3389/fonc.2019.00582. coleção eletrônica 2019.</i>
Development of a method for quantitative determination of the cytotoxic agent piplartine (piperlongumine) in multiple skin layers	Vanessa F.M. Carvalho, Daniela V. Giacone, Letícia. Costa-Lotufó, Edilberto Rocha Silveira, Luciana B. Lopes.	<i>2019 fev;33(2):e4386. doi: 10.1002/bmc.4386. Epub 2018 23 de outubro.</i>
Protective Effect of Piplartine against LPS-Induced Sepsis through Attenuating the MAPKs/NF- κ B Signaling Pathway and NLRP3 Inflammasome Activation	Chi-Han Huang <i>et al.</i>	<i>Pharmaceuticals (Basel) . 2021 junho; 14(6): 588. Publicado on-line em 18 de junho de 2021. doi: 10.3390/ph14060588</i>
Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: Perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent	Surya Kant Tripathi; Bijesh Kumar Biswal	<i>Pharmacological Research Volume 156, junho de 2020 , 104772</i>
Radiosensitization of human pancreatic cancer by piperlongumine analogues	Hao Ma, Yuelin Wu, Wannian Zhang, Huojun Zhang, Zhenyuan Miao, Chunlin Zhuang	<i>Chinese Chemical Letters Volume 32, Issue 3, março de 2021 , Páginas 1197-1201</i>

<p>Piperlongumine loaded PLGA nanoparticles inhibit cancer stem-like cells through modulation of STAT3 in mammosphere model of triple negative breast cancer</p>	<p>Priya Singh, Sanjeeb Kumar Sahoo</p>	<p><i>International Journal of Pharmaceutics</i> Volume 616, 25 de março de 2022 , 121526</p>
<p>Piperlongumine induces ROS mediated apoptosis by transcriptional regulation of SMAD4/P21/P53 genes and synergizes with doxorubicin in osteosarcoma cells</p>	<p>Laxminarayan Rawat; Vijayashree Nayak</p>	<p><i>Chemico-Biological Interactions</i> Volume 354, 25 de fevereiro de 2022 , 109832</p>
<p>Piperlongumine attenuates vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension by regulating autophagy</p>	<p>Wu Ye, Tingyu Tang, Zhijun Li, Xuefang Li, Qingdong Huang</p>	<p><i>Journal of Cardiology</i> Volume 79, Issue 1, janeiro de 2022</p>
<p>Decrypting the interaction pattern of Piperlongumine with calf thymus DNA and dodecamer d(CGCGAATTCGCG)₂ B-DNA: Biophysical and molecular docking analysis</p>	<p>Vaishali Yadava Anuja Krishnanb Mirza Sarwar Baigb Muhammed Majeedc Mahadeva Nayakc Divya Vohoraa</p>	<p><i>Biophysical Chemistry</i> Volume 285, junho de 2022 , 106808</p>
<p>Piperlongumine is a novel nuclear export inhibitor with potent anticancer activity</p>	<p>Mingshan Niu, Xiaoyu Xu, Yangling Shen, Yao Yao, Jianlin Qiao, Feng Zhu, Lingyu Zeng, Xuejiao Liuc Kailin Xu.</p>	<p><i>Chemico-Biological Interactions</i> Volume 237, 25 de julho de 2015 , Páginas 66-72</p>

3.1 Efeito anticâncer da piplartina e indução de apoptose

Os estudos das atividades da piplartina começaram na década de 1990 e esta droga ainda desperta o interesse de pesquisadores para elucidar seu mecanismo de ação (WANG *et al.*, 2014). Estudo com células leucêmicas mostram que a exposição à molécula da piplartina causou a inibição da síntese do DNA e a indução da morte celular. Em outro estudo, a piplartina causou o bloqueio do ciclo celular na fase G2, seguida de fragmentação do DNA celular, induzindo a apoptose (WU YE, 2022; HAO MA, 2021; BEZERRA *et al.*, 2008). Neste mesmo trabalho, os autores se posicionaram favoravelmente à hipótese de que os efeitos citotóxicos e mutagênicos da piplartina possam ser explicados por sua atuação sobre o DNA, principalmente durante o período de crescimento celular. Em relação a tumores de pele, sua aplicabilidade se dá através de nanoemulsão modificada com quitosana, esta, contendo piplartina sugere ser uma nova estratégia para o tratamento local do câncer de pele (GIACONE, 2020). A potencialidade antineoplásica da piplartina vêm sido evidenciada, sendo considerada um importante protótipo para o desenvolvimento de drogas anticâncer (BEZERRA, 2021, CHENG, 2020). Através do estresse oxidativo e várias vias de sinalização celular, pode-se constatar que a piplartina é promissora na morte de células cancerígenas, incluindo as vias p53, NF- κ B, MAPK, STAT3 e PI3K/Akt/mTOR (BEZERRA, 2021). Somado a isso, o fato de a piplartina ser um alcaloide lipofílico, esta é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (LIU *et al.*, 2014), e, portanto, pode ser promissora no tratamento de gliomas. Liu e colaboradores (2014) analisaram o efeito deste alcaloide nas linhagens de glioma LN229, U87 MG, 8MG BA. Seus resultados mostram que a piplartina tem efeitos citotóxicos nas três linhagens (LIU, 2014).

Além disso, a piplartina tem potencial na indução da morte celular por autofagia em linhagens de câncer de próstata, mama, de colo de útero, carcinoma renal e osteossarcoma (WANG *et al.* 2014), além de inibir o crescimento de tumor de mama e sarcoma 180 em camundongos transplantados. Os mecanismos de interação do DNA com moléculas farmacológicas são fundamentais para o entendimento de suas ações terapêuticas nos sistemas fisiológicos. A piperlongumina é amplamente estudada por seu potencial anticancerígeno (YADAV, 2022). Raj e colaboradores (2011) demonstram, com seu estudo, que o tratamento com piplartina induz morte celular/apoptose

seletivamente em várias linhagens de câncer, como osteossarcoma, câncer de mama e de cólon, mas não em células normais, modulando a expressão de membros de vias de sinalização de sobrevivência e apoptose, como as proteínas p53 e Bcl-2. Somado a isso, ensaios realizados em tratamento de pele foram realizados, resultando em testes com várias formulações e períodos de tempo (CARVALHO, 2019). Niu (2015), descreve outro novo mecanismo pelo qual a piperlongumina medeia seus efeitos antitumorais, a inibição da exportação nuclear pela deste composto pode ser responsável por suas propriedades terapêuticas em doenças cancerígenas (NIU, 2015).

3.2 Efeito leishmanicida da pipartina

Os tratamentos disponíveis para a leishmaniose são limitados e causam efeitos colaterais tóxicos aos acometidos. Neste contexto, a pipartina está entre umas das opções terapêuticas promissoras, já que sua atividade leishmanicida em um modelo *in vivo* é evidente (TIOCOME, 2020). A utilização da pipartina contra a infecção por *Leishmania amazonensis* foi evidenciada por uma redução significativa do tamanho de lesões cutâneas e diminuição da carga parasitária do baço, resultado muito semelhante ao glucantime, medicamento padrão utilizado para tratamento (TIOCOME, 2020; BEZERRA *et al*, 2013). Este estudo reforça o potencial terapêutico da (E)-pipartina como um promissor composto líder contra doenças infecciosas negligenciadas causadas por parasitas (TIOCOME, 2020).

3.3 Efeito esquistossomicida da pipartina

De acordo com o Ministério da Saúde, a esquistossomose é uma infecção parasitária que acomete cerca de 1,5 milhões de pessoas que vivem em áreas endêmicas. Apesar de já haver o tratamento com praziquantel disponível, existe uma necessidade urgente de novos agentes anti-helmínticos. Estudos realizados com a pipartina, causaram uma redução significativa na carga de vermes em camundongos. Além disso, a produção de ovos de *Schistosoma. mansoni*, também foi significativamente inibida pela pipartina (MENGARDA, 2020; CAMPELO, 2018). A pipartina já é descrita na literatura por apresentar atividades leishmanicida, esquistossomicida, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e imunomodulatória, induzindo a produção de espécies reativas de

oxigênio e nitrogênio (BEZERRA *et al*, 2006; BEZERRA *et al*, 2013; ARAÚJO-VILGES *et al*, 2017; MOREIRA *et al*, 2018; MENGARDA *et al*, 2020; BEZERRA, 2007).

3.4 Complexos de rutênio com piplartina

O rutênio é um metal nobre, com propriedades anticorrosivas que podem adquirir diversos estados de oxidação, sendo caracterizados por suas propriedades luminescentes e conhecidos como polipiridínicos. Estudos recentes, mostram que síntese de complexos de rutênio com piplartina apresentaram citotoxicidade mais potente do que a própria piplartina em diferentes células cancerosas, transcritos de RNA regulados de várias apoptose genes relacionados e apoptose mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas em células HCT116 de carcinoma de cólon humano (BALIZA, 2019). Além disso, constatou-se o complexo aumentou significativamente a indução de morte celular *in vitro*, bem como sua ação *in vivo*, em modelos de xenoinxerto. (BALIZA, 2019).

3.5 Efeito anti-inflamatório da piplartina

A atividade anti-inflamatórias da piplartina foi analisada *in vivo* usando linhagem celular de macrófagos murino J774, os estudos demonstraram que a piplartina suprime a expressão de iNOS e COX-2, reduz a produção de PGE2, TNF- α e IL-6, diminui a fosforilação de MAPKs e NF- κ B e atenua a atividade de NF- κ B por macrófagos ativado por LPS. A piplartina também inibe a produção de IL-1 β e suprime a ativação do inflamassoma NLRP3 por macrófagos ativado por LPS/ATP e LPS/nigericina. Além disso, a piplartina reduz a produção de óxido nítrico (NO) e TNF- α , IL-6 e IL-1 β , diminui o dano tecidual induzido por LPS, atenua a infiltração de células inflamatórias e aumenta a taxa de sobrevivência. Coletivamente, esses resultados demonstram que a piplartina exibe atividades anti-inflamatórias na inflamação e sepse induzidas por LPS e sugerem que a piplartina pode ter benefícios para o tratamento da sepse (HUANG, 2021).

4. Conclusão

Embora sejam muitos os estudos que avaliaram o potencial citotóxico da molécula em células em cultura e modelos animais, ainda são escassas as informações a respeito de sua aplicabilidade toxicidade no desenvolvimento embrionário por exemplo. Tendo em consideração a estrutura química deste composto, capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, pode ser promissora no tratamento de gliomas, ainda será necessária a exploração das potencialidades que este composto pode ter em relação a outras doenças e ensaios biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO-VILGES K.M, *et al.* Effect of piplartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice. **Pharm Biol.** 2017;55(1):1601-7.

BALIZA I.R.S.,. Ruthenium Complexes With Piplartine Cause Apoptosis Through MAPK Signaling by a p53-Dependent Pathway in Human Colon Carcinoma Cells and Inhibit Tumor Development in a Xenograft Model. **Front Oncol.** 2019 Jul 3;9:582. doi: 10.3389/fonc.2019.00582. PMID: 31334116; PMCID: PMC6616125.

BEZERRA D. P.; *et al.* Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicol In vitro**, v.21, n.1, p.1-8, 2007.

BEZERRA D.P, *et al.* In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Braz J Med Biol Res.** 2006 Jun;39(6):801-7. doi: 10.1590/s0100-879x2006000600014. Epub 2006 Jun 2. PMID: 16751987.

BEZERRA D.P,Chapter 37 - Piplartine (piperlongumine), oxidative stress, and use in cancer,Editor(s): Victor R. Preedy, Vinood B. Patel,Cancer (Second Edition),**Academic Press**, 2021 ,Pages 417-425,ISBN 9780128195475,https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819547-5.00037-7.

BEZERRA D.P. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicol In Vitro.** 2007 Feb;21(1):1-8. doi: 10.1016/j.tiv.2006.07.007. Epub 2006 Jul 28. PMID: 16971088.

BEZERRA, D. P. **Potencial anticâncer da piplartina e da piperina, amidas isoladas de plantas do gênero piper.** 2005. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005. 140 f.

BEZERRA, D.P. 2008. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J. Appl. Toxicol.** 28 (2), 156–163

BEZERRA, D.P. *et al.* Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 453-463, 2013.

BEZERRA, D.P., 2006. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 39 (6), 801–807

CAMPELO, Y. *et al.* Structure–Activity Relationship of Piplartine and Synthetic Analogues against *Schistosoma mansoni* and Cytotoxicity to Mammalian Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1802, 2018.

CARVALHO VFM. Development of a method for quantitative determination of the cytotoxic agent piplartine (piperlongumine) in multiple skin layers. **Biomed Chromatogr.** 2019 Feb;33(2):e4386. doi: 10.1002/bmc.4386. Epub 2018 Oct 23. PMID: 30238489.

CHENG, X. Piplartine attenuates the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via regulating hsa_circ_100338 expression. **Cancer Med.** 2020; 9: 4265– 4273. <https://doi.org/10.1002/cam4.3043>

FELIPE, F.C.B. 2007. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine** 14 (9), 605–612.

FONTENELE, J.B., 2009. Antiplatelet effects of piplartine, an alkalamide isolated from *Piper tuberculatum*: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **J. Pharm. Pharmacol.** 61 (4), 511–515.

GIACONE, D.V *et al.* Effect of nanoemulsion modification with chitosan and sodium alginate on the topical delivery and efficacy of the cytotoxic agent piplartine in 2D and 3D skin cancer models, **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 165, Part A, 2020, Pages 1055-1065, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.167>.

GUIMARÃES, E. F.; DA SILVA GIORDANO, L. C. **Piperaceae do Nordeste brasileiro I: Estado do Ceará.** Rodriguesia, 2004.

HAO MA, Radiosensitization of human pancreatic cancer by piperlongumine analogues[J]. **Chin. Chem. Lett.**, 2021, 32(3): 1197-1201

HUANG, C.H. *et al.* Protective Effect of Piplartine against LPS-Induced Sepsis through Attenuating the MAPKs/NF- κ B Signaling Pathway and NLRP3 Inflammasome Activation. **Pharmaceuticals** (Basel). 2021 Jun 18;14(6):588. doi: 10.3390/ph14060588. PMID: 34207356; PMCID: PMC8234963.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: Reconstructing the evolution of floral development. **International Journal of Plant Sciences**, 2004.

LIU, Q.R, *et al.* Piperlongumine Inhibits Migration of Glioblastoma Cells via Activation of ROS-Dependent p38 and JNK Signaling Pathways", **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2014, Article ID 653732, 12 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/653732>

HAO MA; WU, Y; ZHANG, W. *et a l*Radiosensitization of human pancreatic cancer by piperlongumine analogues,**Chinese Chemical Letters**,Volume 32, Issue 3,2021,Pages 1197-1201,ISSN 1001 8417,<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2020.08.049>.

MENGARDA AC, MENDONÇA PS, MORAIS CS, *et al.* Antiparasitic activity of pipartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. **Acta Tropica**. 2020 May;205:105350. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105350. PMID: 31962096.

MOREIRA F.L., *et al.* Leishmanicidal effects of Piperlongumine (Piplartine) and its Putative Metabolites. **Planta Med**. 2018;84(15):1141-8.

NAVICKIENE, H. M. D. *et al.* Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar,*Anticarsia gemmatalis*. **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 399–403, abr. 2007.

NIU M, XU X, SHEN Y, *et al.* Piperlongumine is a novel nuclear export inhibitor with potent anticancer activity. **Chem Biol Interact**. 2015 Jul 25;237:66-72. doi: 10.1016/j.cbi.2015.05.016. Epub 2015 May 28. PMID: 26026911.

NOGUEIRA, S. R. P. Contribuições morfoanatômicas, estudo fitoquímico e de potencial alelopático, antioxidante e antibacteriano do extrato alcoólico e frações de folhas de *Piper tuberculatum* jacq. (piperaceae). 2019. Universidade Federal do Amazonas - UFAM, 2019.

PARMAR, V.S. 1997. Phytochemistry of the Genus Piper. **Phytochemistry** 46 (4), 597–673

POHLIT, A. M. *et al.* Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazonica*, 2004

RAMOS, C. *et al.* Metabolization of Insecticidal Amides from Leaves of *Piper tuberculatum* by *Heraclides hectorides* and *Naupactus bipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.

RAMOS, C. S.; KATO, M. J. Hydrolysis of methyl benzoate from *Piper arboreum* by *Naupactus bipes* beetle. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 560–563, 2009.

RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Metabolism of (–)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2157–2161, ago. 2008

RAWAT L, NAYAK V. Piperlongumine induces ROS mediated apoptosis by transcriptional regulation of SMAD4/P21/P53 genes and synergizes with doxorubicin in

osteosarcoma cells. **Chem Biol Interact.** 2022 Feb 25;354:109832. doi: 10.1016/j.cbi.2022.109832. Epub 2022 Jan 24. PMID: 35085581.

RUSCHEL, D. O gênero Piper (Piperaceae) no Rio Grande do Sul. 2004. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.;

SCOTT, I. M. *et al.* Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: Synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, 2002

SIMÕES, L. F. Efeito do extrato de *Piper tuberculatum* sobre *Schistosoma mansoni* da linhagem BH. 2009. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

SINGH P, SAHOO SK. Piperlongumine loaded PLGA nanoparticles inhibit cancer stem-like cells through modulation of STAT3 in mammosphere model of triple negative breast cancer. **Int J Pharm.** 2022 Mar 25;616:121526. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121526. Epub 2022 Jan 30. PMID: 35104598.

TICONA JC,. (*E*)-Piplartine Isolated from *Piper pseudoarboreum*, a Lead Compound against *Leishmaniasis*. **Foods.** 2020 Sep 7;9(9):1250. doi: 10.3390/foods9091250. PMID: 32906719; PMCID: PMC7554920.

TRIPATHI SK, BISWAL BK. Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: Perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent. **Pharmacol Res.** 2020 Jun;156:104772. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104772. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32283222.

WANG YH, Anticancer principles from medicinal piper (hú jiāo) plants. **J Tradit Complement Med.** 2014 Jan;4(1):8-16. doi: 10.4103/2225-4110.124811. PMID: 24872928; PMCID: PMC4032846.

WU YE, *et al.* Piperlongumine attenuates vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension by regulating autophagy, **Journal of Cardiology**, Volume 79, Issue 1, 2022, Pages 134-143, ISSN 0914-5087, <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2021.08.023>.

YADAV, V; KRISHNAN, A.; BAIG, M.S; MAJEED, M; NAYAK, M.; VOHORA, D. Decrypting the interaction pattern of Piperlongumine with calf thymus DNA and dodecamer d(CGCGAATTCGCG)₂ B-DNA: Biophysical and molecular docking analysis, **Biophysical Chemistry**, Volume 285, 2022, 106808, ISSN 0301-4622, <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2022.106808>.

YUNCKER, T. G. **The Piperaceae—A family profile.** Brittonia, 1958.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL TERATOGÊNICO DA PIPLARTINA NO DESENVOLVIMENTO DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)

Resumo

Contexto: A pipartina é uma amina natural e biologicamente ativa isolada de espécies do gênero *Piper*, pertencentes à família Piperaceae. Essa substância possui vastas propriedades farmacológicas que, aliado à saúde humana e bioeconomia, pode resultar em futuras aplicações biomédicas, nanotecnológicas e farmacêuticas.

Objetivo: Avaliar a toxicidade geral e potencial teratogênico da pipartina no desenvolvimento embrionário de camundongos.

Materiais e Métodos: Os animais foram dispostos na proporção de três fêmeas para um macho e, após o coito e análise macroscópica da presença da rolha vaginal, as fêmeas das quais apresentaram foram triadas para início do experimento. O experimento ocorreu em quatro grupos nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/kg/dia e DMSO a 2% no grupo controle. Após isto, foi realizado monitoramento das fêmeas prenhes quanto a toxicidade materna através de sinais clínicos, a laparotomia e análise dos órgãos, parâmetros hematológicos e bioquímicos e a fragmentação de DNA e ciclo celular.

Resultado: Na toxicidade materna, as análises estatísticas não demonstraram alterações significativas no peso dos órgãos maternos e ganho de peso corrigido entre o grupo controle e as concentrações testadas ($p > 0,05$). A toxicidade embrio-fetal, baseada nas análises de média de implantações, reabsorções e fetos mortos é elevada no grupo na concentração de 50 mg/Kg. Entretanto, o número de implantações e reabsorções se estabilizam e o número de fetos mortos reduz no grupo de 100 mg/kg. Na avaliação visceral fetal, esquelética fetal, hematológica, bioquímica e de fragmentação de DNA não foi demonstrado alterações significativas ($p > 0,05$).

Discussão e Conclusão: Na toxicidade materna, o coração demonstrou maior ganho de peso nas concentrações testadas, mesmo não demonstrando diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Ao contrário dos demais órgãos analisados, o peso médio do útero no grupo controle foi maior que nos grupos expostos à pipartina, evidenciando uma possível relação com os sítios de implantação e reabsorção. Na toxicidade embrio-fetal, os resultados elevados na concentração de 25 mg/kg podem sugerir efeito embriotóxico.

No entanto, essas variáveis estabilizaram na maior concentração de 100 mg/kg, excluindo a interpretação de efeito dose-dependente. A análise visceral fetal evidenciou alterações na adrenal na concentração de 100 mg/Kg, entretanto, os demais órgãos não possuem alterações estatística significativa ($p > 0,05$). Na análise esquelética, foram observadas anomalias no quinto esternão, como tamanho reduzido ou ausência e irregularidades no formato. Entretanto, essas podem estar relacionadas com retardo de desenvolvimento intra-uterino, correlato à ossificação. Sugerindo que a formação óssea inicial não é expressivamente afetada pela exposição a piplartina. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos não elucidaram alterações que sugerissem impacto nos níveis séricos de marcadores ($p > 0,05$), descartando danos funcionais ao fígado e rins, além de processo inflamatório, anemia e disfunção da medula óssea. As taxas de DNA fragmentado em células de medula óssea nos grupos tratados foram similares a do controle, indicando ausência de genotoxicidade. As doses testadas de piplartina também não afetaram a proliferação das células progenitoras. Diante disto, como os resultados e interpretações supracitas, conclui-se que as exposições não foram capazes de induzir toxicidade materna, embrionária e genotóxica em camundongos fêmeas *Mus musculus*.

Palavras-chave: piplartina, toxicidade materna, potencial teratogênico, biologia do desenvolvimento, toxicologia.

1. Introdução

Classificada como um alcaloide amida, a pipartina é uma molécula natural e biologicamente ativa isolada de espécies do gênero *Piper*, pertencentes à família Piperaceae (Figura 1) (BEZERRA *et al.* 2013). São vastas as propriedades farmacológicas desta molécula, tais como a atividade biológica contra sepsis induzida por LPS em modelo animal através da supressão da expressão de iNOS e COX-2, atenuação da infiltração celular pró inflamatória, supressão da ativação de inflamassoma e da secreção de citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) por células da linhagem J774A (HUANG *et al.* 2021). Também foi descrita a atividade antiproliferativa induzindo despolimerização dos microtúbulos em câncer de mama MCF-7 (MEEGAN *et al.* 2017), ação citotóxica em glioblastoma (NÓBREGA *et al.* 2018) e atividade antiúlcera e gastroprotetora devido controlar a secreção ácida na mucosa intestinal (BURCI *et al.* 2013).

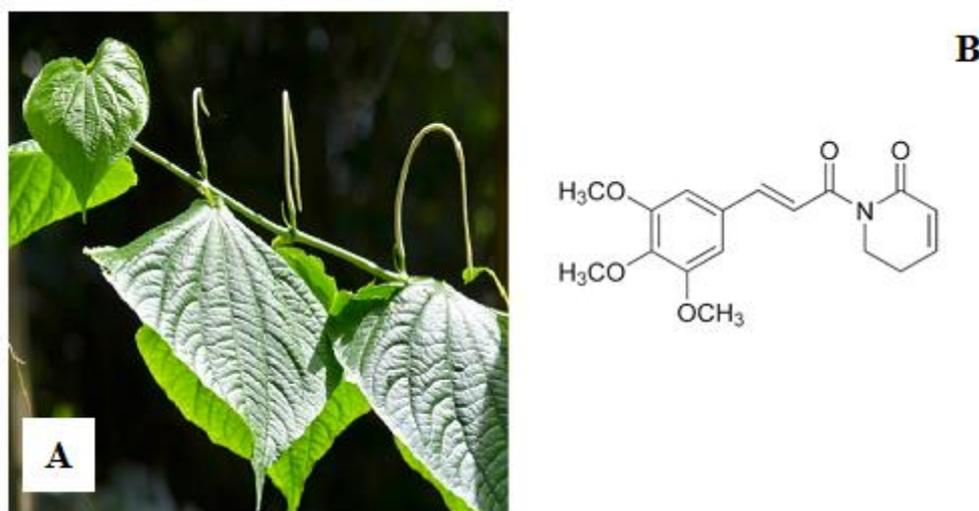


Figura 1. (A) *Piper tuberculatum* Jacq. (“Pimenta de Macaco) (B) Estrutura molecular da pipartina (1-[(*E*)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-enoyl]-2,3-dihydropyridin-6-one, IUPAC (Foto: Steven Winn Alexander)

Adicionalmente, existem evidências da atividade contra *Schistosoma mansoni* com alterações morfológicas no tegumento do parasita e sua relação dose-dependente com aplicação da pipartina (MORAES *et al.* 2011), além de atividade contra outros protozoários como *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum* (ARAÚJO *et al.* 2017). Diante disto, compreender as vastas propriedades farmacológicas da pipartina aliada a saúde humana possibilita o desenvolvimento de novos medicamentos como alternativas de saúde pública (PETROVSKA *et al.* 2012). A molécula tem o potencial de

impactar a bioeconomia com o desenvolvimento de produtos tecnológicos de base biológica e análogos sintéticos com a bioprospecção de moléculas bioativas vislumbrando futuras aplicações biomédicas, nanotecnológicas e farmacêuticas (VALLI *et al.* 2018).

Entretanto, visando avaliar sua segurança em aplicações à saúde humana, além da efetividade é importante conhecer a citotoxicidade da piplartina em células de mamíferos. Em ensaio de viabilidade de fibroblasto murino (NIH-3T3), foi observada concentração inibitória média (IC₅₀) em 5,68±2,95 µg/mL e diminuição da viabilidade celular na concentração máxima testada (800 µg/mL) em 96,94±0,12 após 24 horas de exposição à piplartina (CAMPELO *et al.* 2018). Também há evidências de genotoxicidade demonstrando indução da quebra de fita do DNA em células V79, interrupção do ciclo celular na fase G2/M, indução de apoptose com relação dose-dependente e fragmentação internucleossomal do DNA (LAD *et al.* 2017; BEZERRA *et al.* 2008).

Com isso, se fazem necessários estudos em modelo animal visando avaliar a ocorrência de efeitos adversos ligados a exposição gestacional, peri e neonatal frente à liberação de substâncias no organismo que se acumulam em tecidos biológicos e acessam a circulação materno-fetal por via transplacentária com efeitos a longo prazo (SANTORO *et al.* 2019). Tais análises devem considerar sinais como piloereção, diarreia, peso corporal, presença de hemorragia vaginal, análise hematológica e bioquímica, histopatologia, medida dos hormônios gonadotróficos e avaliação anatômica (PHIPPS *et al.* 2021). Diante disto, vislumbrando mensurar a toxicidade e quais os efeitos da exposição da piplartina em modelo animal para viabilizar estudos clínicos possibilitando que seus potenciais farmacológicos beneficiem à sociedade, o objetivo do trabalho foi avaliar a toxicidade geral e potencial teratogênico da piplartina.

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção da piplartina

Raízes secas (350 g) de *Piper tuberculatum*, cultivadas no Campus da Universidade de São Paulo, foram extraídas com acetato de etila (1,5 L por dois dias sob agitação e repetidas três vezes). As soluções foram concentradas em evaporador rotativo, resultando em 56 g de extrato bruto. O extrato bruto foi solubilizado em metanol quente, filtrado em papel de filtro e deixado em repouso por 4 dias em temperatura ambiente e

filtrado sob vácuo. O sólido inicialmente obtido (6 g) foi recristalizado novamente a partir de metanol, obtendo-se 1,5 g de piplartina. A piplartina foi analisada por HPLC e ¹H NMR (500 MHz, CDC13) e comparada com uma amostra padrão (Silva *et al.*, 2002).

2.2 Animais

Os camundongos *Mus musculus* (30±5 g, 60 dias de idade) foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB/UNICAMP. Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos *M. musculus*, com 60 (sessenta) dias de idade, num total de 60 animais uniformes quanto ao peso, sendo 12 machos e 48 fêmeas. Os animais foram submetidos à aclimação com quinze dias antecedendo o experimento em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado, alocadas em estantes climatizadas à 22°C no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília com ciclo claro-escuro de doze horas, a umidade também foi controlada.

Os padrões estabelecidos pelo Guide for the Care and use of Laboratory Animals, pelo Guideline for the Testing of Chemicals /Prenatal Developmental Toxicity Study-414 da OECD, além dos princípios éticos na experimentação animal recomendado pelo Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA da Universidade de Brasília, aprovado sob o protocolo n° 47/2019, foram seguidos no âmbito de todo o estudo.

2.3 Acasalamento dos Animais

Os camundongos foram alocados na proporção de três fêmeas para um macho. Após o coito, na manhã seguinte, as fêmeas foram observadas por análise macroscópica referente a presença da rolha vaginal. As fêmeas que, apresentaram a rolha vaginal, foram separadas, pesadas, identificadas e alocadas em quatro grupos experimentais, e a administração da piplartina foi do 6 ao 18 dia de gestação. As fêmeas tratadas por via gavagem uma vez ao dia no período da manhã, do sexto (implantação) ao décimo oitavo dia de gestação, foram alocadas em três grupos experimentais recebendo a piplartina diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% em concentrações de 25, 50 e 100mg/kg e um grupo controle foi tratado com DMSO a 2%.

2.4 Toxicidade materna

A toxicidade foi monitorada a partir da avaliação de sinais clínicos de morbimortalidade como morte, piloereção, alterações de locomoção, diarreia, hemorragia vagina e peso corporal. As observações foram realizadas uma vez ao dia após a administração da piplartina nas fêmeas prenhes durante a gestação.

2.5 Laparotomia

No décimo oitavo dia de gestação, dia anterior ao nascimento natural, as fêmeas foram anestesiadas com isoflurano, eutanasiadas por exposição ao CO₂ e, em seguida realizada a laparotomia. Os órgãos como fígado, rins, baço, coração, intestino, pulmão e placenta foram retirados e pesados. O útero foi exposto e pesado após a retirada dos fetos. Ademais disto, o peso médio fetal, o número de fetos vivos e mortos, o número total de sítios de implantação, as reabsorções embrionárias (SALEWSKI, 1964), ganho de peso corporal corrigido (D peso) e peso materno inicial e final foram calculados e registrados. Na **Figura 2** é apresentado imagem representativa dos planos de secções para o estudo toxicológico.

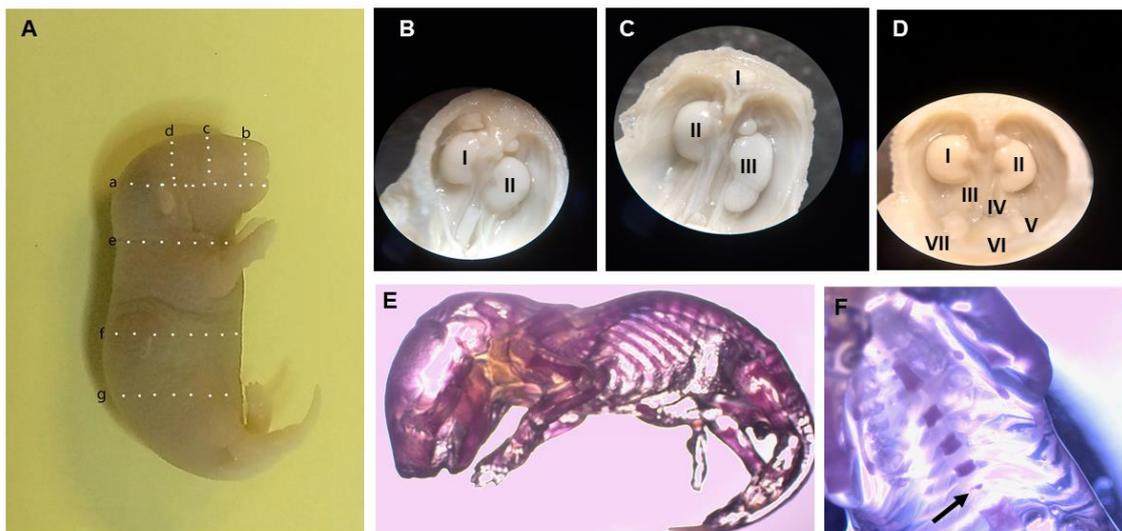


Figura 2. Imagens representativas do material biológico processado para os estudos toxicológicos. (A) Planos de secções fetais para análise visceral: a. Secção transversal na altura da cavidade oral. b. Secção frontal na região pré-glabelar; c. Secção frontal na região orbital; d. Secção frontal na região do vértex; e. Secção transversal na região cervical; f. Secção transversal na região abdominal, logo abaixo do diafragma; g. Secção transversal na região pélvica, passando pelo umbigo. (B): Rim direito com glândula adrenal aderida à porção superior e ureter esquerdo aumentado (I) e rim esquerdo com glândula adrenal não aderida à porção superior (II). (C): Medula espinhal (I); rim direito (II) e rim esquerdo (III) com suas respectivas glândulas adrenais aderidas à porção superior. O rim esquerdo apresenta-se bilobado e com formato anormal em comparação ao rim direito. Sobre o rim direito, há duas suprarenais. (D) Ausência da glândula adrenal no rim direito (I); rim esquerdo com aspecto normal e glândula adrenal aderida à porção superior (II); ureteres direito (III) e esquerdo (IV); gônadas masculinas direita (VII) e esquerda (V); bexiga (6). (E) Feto de camundongo corado com alizarina, vista lateral esquerda. (F) Esternébra reduzida.

2.6 Análise de anomalias fetais

Os fetos foram analisados com estéreo microscópios para a verificação de malformações estruturais externas e em seguida metade foi fixada em solução Bodian para análise visceral e a outra metade foi fixada em acetona, eviscerada, clareada com hidróxido de potássio e corada com alizarina para análise de anomalias esqueléticas (STAPLES; SCHNELL, 1964). A avaliação de anomalias viscerais foi realizada com auxílio de estéreo microscópios e os protocolos a serem adotados foram os propostos por Barrow e Taylor (1969) e Wilson (1965). Os fetos submetidos à análise esquelética foram analisados segundo técnica proposta por Taylor (1986) e Manson (1994).

2.7 Análises hematológica e bioquímica

Amostras de sangue total foram coletadas por punção cardíaca. Uma fração das amostras (50 µL) foi transferida para microtubo com anticoagulante EDTA para análise do hemograma completo utilizando o equipamento automatizado *Sysmex pocH-100iV DiffTM*. Os marcadores das funções hepáticas e renais foram avaliados por dosagens séricas de *alanina aminotransferase* (ALT), *aspartato aminotransferase* (AST), albumina, creatinina k, uréia e lactato desidrogenase (LDH). Para obtenção do soro, cerca de 700 µL de sangue total foi transferido para microtubo contendo gel separador e acelerador de coágulo, e centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos. As dosagens foram feitas em analisador químico automatizado ChemWell-T[®] (Labtest, Lagoa Santa, Brasil), usando kits comerciais (Labtest[®]) conforme instruções do fabricante.

2.8 Fragmentação de DNA e ciclo celular

Células da medula óssea (MO) foram coletadas a partir do fêmur e usadas para análises da integridade do DNA e perfil do ciclo celular. Inicialmente, foi realizada a limpeza dos tecidos moles ao redor do fêmur e a remoção das epífises para ter acesso às cavidades da medula. Em seguida, soro fetal bovino (SFB) foi injetado em uma das extremidades e drenado para um microtubo. A suspensão de células em SFB foi centrifugada a 2.000 rpm por 5 min a 4°C e o precipitado celular foi lavado com tampão fosfato-salino (PBS).

As células da MO foram fixadas em etanol 70% gelado e armazenadas a - 20°C por, pelo menos, 24 h. Após nova lavagem com PBS, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas com 200 µL de tampão de lise contendo iodeto de propídio (20 µg/mL) e RNase A (50 µg/mL) por 30 min à temperatura ambiente. As análises foram feitas por citometria de fluxo (BD FACSVerseTM) equipado com software *FlowJo[®]vX 0.7* em um total de 10.000 eventos por amostra.

Parâmetros relacionados ao tamanho e granulosidade dos eventos detectados (*FSC* – *forwardscatter* e *SSC* – *sidescatter*, respectivamente) foram medidos simultaneamente e os debris celulares foram excluídos. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) foi determinada.

2.9. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. O teste de normalidade de ShapiroWilk foi aplicado a todos os grupos que compõem as variáveis, considerando $p < 0,05$. A análise de variância ANOVA foi utilizada para analisar as variáveis onde os grupos não violaram a suposição de normalidade ($p > 0,05$), sendo elas o número de implantações e ganho de peso corporal corrigido (D peso).

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado as variáveis onde ao menos um dos grupos tenha violado a normalidade na distribuição ($p < 0,05$), tais como peso materno, peso do útero, peso médio dos fetos, número de fetos vivos, número de fetos mortos, número de reabsorções, peso médio das placentas, peso dos corações, peso dos fígados, peso dos baços, peso dos intestinos, peso dos rins direito e peso dos pulmões. Foi estabelecido um valor significativo para o teste anova e o teste de Kruskal-Wallis quando ($p < 0,05$).

O teste Exato de Fischer foi aplicado a nove variáveis que apresentaram alguma alteração visceral fetal, como o palato, o ventrículo, o átrio, a alça intestinal, o rim, a adrenal, o timo, o pulmão e o fígado. Pelo teste Qui-quadrado, todas elas revelaram frequência esperada de malformações abaixo de cinco, razão que justifica a aplicação do teste Exato de Fischer (FIELD, 2009).

Uma das variáveis esquelética fetal, o esternébro, foi submetido ao teste Qui-quadrado por atender ao requisito mínimo de cinco observações esperadas (FIELD, 2009). Considerou-se um nível de significância ($p < 0,05$) nos dois testes não paramétricos. Ambos os testes foram conduzidos empregando-se o software estatístico SPSS –*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 20.

3. Resultados e discussão

3.1 Toxicidade materna

Os resultados da avaliação de toxicidade materna (Tabela 1 e Figura 3) são referentes ao peso dos órgãos, peso materno e ganho de peso corporal dos grupos controle e experimentais, não evidenciaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos em nenhuma variável analisada.

Tabela 1. Alterações no peso materno, órgãos maternos e no ganho de peso corporal corrigido (D peso) nas diferentes doses entre o 6° e 18° dia de experimento

Variáveis	Grupos				p-valor
	Controle	25 mg/Kg	50 mg/Kg	100 mg/Kg	
Órgãos					
Peso do útero	1,8±0,6 (n=8)	1,2±0,6 (n=6)	1,2±0,8 (n=7)	1,1±1,1 (n=3)	p>0,05
Peso do coração	0,1±0,9 (n=8)	0,2±0,1 (n=8)	0,1±0,0 (n=8)	0,1±0,1 (n=7)	p>0,05
Peso do fígado	1,4±0,7 (n=8)	1,5±1,0 (n=8)	1,1±0,7 (n=8)	1,2±1,0 (n=7)	p>0,05
Peso do baço	0,1±0,1 (n=8)	0,2±0,1 (n=7)	0,1±0,0 (n=8)	0,1±0,0 (n=7)	p>0,05
Peso do intestino	0,1±0,1 (n=8)	0,2±0,2 (n=7)	0,2±0,2 (n=8)	0,1±0,1 (n=6)	p>0,05
Peso do rim direito	0,2±0,0 (n=7)	0,2±0,0 (n=7)	0,2±0,1 (n=8)	0,2±0,0 (n=7)	p>0,05
Peso do pulmão	0,2±0,3 (n=9)	0,2±0,0 (n=7)	0,3±0,2 (n=8)	0,1±0,1 (n=7)	p>0,05
Peso materno (g)					
Inicial	31,0±5,8 (n=11)	31,7±4,4 (n=10)	30,3±2,2 (n=9)	32,0±2,2 (n=7)	p>0,05
Final	45,6±8,8 (n=11)	44,4±8,3 (n=9)	46,6±5,2 (n=9)	46,8±8,9 (n=7)	p>0,05
Ganho de peso materno (g)					
Gestação 6° dia – Dia 0	31,1±5,9	31,0±4,1	30,4±2,1	31,8±2,2	p>0,05
Gestação 9° dia – Dia 6	31,9±6,6	32,7±3,6	31,7±1,7	32,5±3,3	p>0,05
Gestação 12° dia – Dia 9	34,8±6,4	35,4±5,7	34,9±2,5	35,3±2,5	p>0,05
Gestação 15° dia – Dia 12	39,1±6,9	41,3±7,1	39,1±4,0	41,0±3,5	p>0,05
Gestação 18° dia – Dia 15	45,6±9,9	45,4±10,3	46,3±5,4	48,5±6,2	p>0,05
D peso	11,9±6,85	17,7±8,01	13,7±5,28	12,2±7,78	p>0,05

*Os dados são apresentados com base na média ± desvio padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$, sendo representado por letras diferentes. Os resultados como: peso materno, peso do útero gravídico, peso do coração, peso do fígado, peso do baço, peso do intestino, peso do rim direito e peso do pulmão foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O resultado de D peso foi analisado pelo teste paramétrico. Anova. D Peso = [(peso final – peso inicial) – peso do útero].

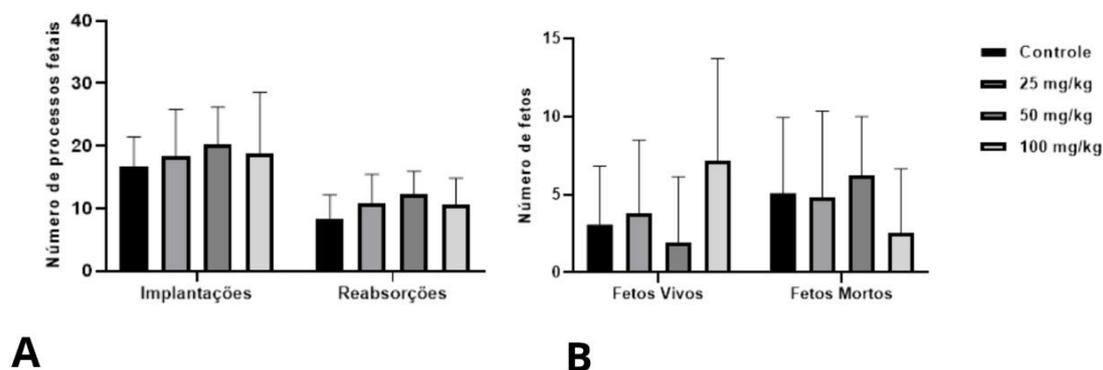


Figura 3. Número de implantações, reabsorções (A) e fetos vivos e mortos (B) expostos aos grupos experimentais de 25, 50 e 100 mg/kg e controle DMSO 2%.

Dos órgãos analisados, apenas o coração apresentou maior ganho de peso no grupo experimental de 100 mg/kg. Em órgãos como o fígado, baço e intestino, o peso médio foi maior no grupo submetido a concentração de 25 mg/kg. O ganho de peso observado para o rim direito e pulmão é mais visível no grupo exposto a 50 mg/kg. De forma distinta as demais condições experimentais, o peso médio do útero no grupo controle é maior que nos grupos expostos à piplartina, evidenciando uma possível relação com os sítios de implantação e reabsorção (Figura 4).

O ganho de peso materno corrigido do grupo de 25 mg/Kg apresentou média superior aos demais grupos. As variações observadas nesses parâmetros podem não estar relacionada com a toxicidade materna da piplartina nas dosagens avaliadas. O aumento ou diminuição do peso dos órgãos maternos não foi suficiente para constatar a toxicidade da piplartina, o que possivelmente sugere não possuir relação específica com a exposição.

Diante disto, a exposição de camundongos fêmeas *M. musculus* às concentrações experimentais de 25, 50 e 100 mg/Kg não afetou significativamente, no contexto geral, a análise da toxicidade materna.

3.2 Toxicidade embrio-fetal

Na avaliação da toxicidade embrio-fetal, os resultados descritos como média \pm desvio padrão na **Tabela 2 e Figura 4** expressam as análises estatísticas referente ao número de implantações, números de reabsorções, peso médio das placentas, número de fetos vivos, número de fetos mortos e peso médio dos fetos entre o controle e os grupos experimentais, não evidenciando diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos em nenhuma variável analisada.

Tabela 2. Média e desvio padrão da avaliação embrio-fetal por grupo e medidas do teste estatístico*.

Variáveis	Grupos				P valor
	Controle	25 mg/Kg	50mg/Kg	100 mg/Kg	
Nº de implantações	16,7 \pm 4,7 (n=10)	18,3 \pm 7,5 (n=10)	20,2 \pm 5,9 (n=9)	18,8 \pm 9,7 (n=7)	p>0,05
Nº de reabsorções	8,4 \pm 3,7 (n=10)	10,7 \pm 4,6 (n=9)	12,3 \pm 3,5 (n=9)	10,6 \pm 4,1 (n=6)	p>0,05
Peso médio das placentas	0,8 \pm 0,3 (n=8)	0,8 \pm 0,5 (n=8)	1,1 \pm 1,0 (n=7)	0,6 \pm 0,4 (n=3)	p>0,05
Nº de fetos vivos	3,0 \pm 3,7 (n=11)	3,8 \pm 4,6 (n=10)	1,8 \pm 4,2 (n=9)	7,1 \pm 6,5 (n=7)	p>0,05
Nº de fetos mortos	5,0 \pm 4,8 (n=11)	4,8 \pm 5,5 (n=10)	6,2 \pm 3,7 (n=9)	2,5 \pm 4,0 (n=7)	p>0,05
Peso médio dos fetos	1,6 \pm 0,8 (n=10)	1,3 \pm 0,2 (n=9)	1,3 \pm 0,1 (n=7)	1,5 \pm 0,2 (n=4)	p>0,05

*Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p\leq 0,05$. Os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para Nº de reabsorções, Nº de fetos vivos, Nº de fetos mortos, peso médio das placentas e peso médio dos fetos. O teste paramétrico. Anova foi aplicado para Nº de implantações.

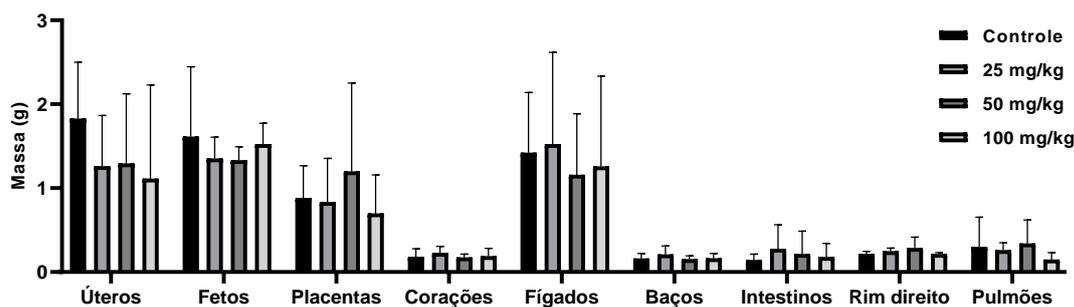


Figura 4. Massa em grama dos órgãos maternos em relação aos grupos experimentais de 25, 50 e 100 mg/kg e controle DMSO 2%.

A exposição materna a agentes químicos durante a gestação pode ocasionar falhas na implantação e na viabilidade embrionária e fetal por mecanismos variados tais como alterações morfológicas no embrião, modificação nos níveis hormonais maternos, alteração na morfologia uterina ou distúrbios no transporte tubário (CUMMINGS, 1990).

Em nosso estudo, as perdas pré-implantacionais não puderam ser calculadas uma vez que, em camundongos, os corpos lúteos involuem muito rapidamente (TAYLOR, 1986). Entretanto, observamos que a média de implantações, reabsorções e de fetos mortos foi mais elevada na dose experimental de 50mg/kg, enquanto na dose de 100 mg/kg as implantações e reabsorções fetais praticamente se estabilizaram ao mesmo tempo que o número médio de fetos mortos foi menor. Já o peso médio das placentas, dos fetos em geral e o número de fetos vivos foi maior no grupo exposto a 100 mg/kg. Na **Figura 3** é possível comparar os aspectos supracitados da toxicidade embrio-fetal.

Embora as taxas diferiram nos distintos grupos, não constatamos variação significativa, de modo que concluímos que a exposição de camundongos fêmeas *M. musculus* às concentrações experimentais de 25, 50 e 100 mg/Kg não alterou os parâmetros avaliados.

3.3 Análise visceral fetal

Na análise de anomalias fetais, os resultados descritos como média \pm desvio padrão na **Tabela 3** expressa o quantitativo de anomalias viscerais fetais entre os grupos experimentais, não evidenciando diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos em nenhuma variável analisada.

Tabela 3. Anomalias viscerais observadas nos grupos experimentais.

Anomalias viscerais		Doses			
		Controle	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Palato	Sim	1	3	0	0
	Não	55	56	45	61
Coração ventrículo	Sim	1	3	0	1
	Não	55	56	44	60
Coração átrio	Sim	0	5	0	2
	Não	56	54	44	59
Alça intestinal	Sim	0	1	0	0
	Não	57	58	44	61
Rim	Sim	0	2	0	1
	Não	57	57	44	60
Adrenal	Sim	0	0	0	2
	Não	57	59	44	59
Timo	Sim	0	0	2	0
	Não	56	59	42	61
Pulmão	Sim	0	0	1	0
	Não	56	59	43	61
Fígado	Sim	0	0	1	0
	Não	56	59	44	61

Em todas as vísceras analisadas, as chances de ocorrerem malformações fetais são maiores na exposição às concentrações de 25 e 100 mg/kg. No ventrículo e átrio, a frequência esperada de alterações na concentração de 100 mg/kg é ligeiramente superior à de 25 mg/kg, no entanto, quando são manifestadas, o fenômeno é observado na menor concentração nas duas variáveis.

Já a frequência esperada nas variáveis do palato, da alça intestinal, do rim e da adrenal é igual nessas duas doses, contudo, com exceção da adrenal há uma manutenção do padrão de alteração das vísceras, ocorrendo em maior número na concentração de 25

mg/kg. Então, somente na adrenal é que as alterações ocorrem por mais vezes na exposição a 100 mg/kg/dia.

Diante disto, a exposição de camundongos fêmeas *M. musculus* às concentrações experimentais de 25, 50 e 100 mg/Kg não afetou significativamente análise visceral.

3.4 Análise esquelética fetal

Na análise esquelética fetal, os resultados descritos como média \pm desvio padrão na **Tabela 4** expressa o quantitativo de anomalia no esternóbros entre os grupos experimentais, não evidenciando diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos em nenhuma variável analisada.

Tabela 4. Anomalias esqueléticas observadas nos grupos experimentais.

Anomalias esqueléticas		Doses			
		Controle	25 mg/kg/dia	50 mg/kg/dia	100 mg/kg/dia
Esternébros	Sim	0	9	6	4
	Não	32	18	12	13

Em camundongos, os resultados sugerem que a formação óssea inicial não foi afetada de forma expressiva pela exposição à piplartina. Assim, os distúrbios na formação da parede torácica não foram suficientes para caracterizar uma possível restrição no desenvolvimento dos fetos provocada pelas doses da substância estudada

As formações defeituosas constatadas na análise esquelética fetal podem ser um sinal de retardo de desenvolvimento intra-uterino, no caso, os correlatos à ossificação. Proporcionalmente, a ossificação incompleta das esternébras é particularmente visível no grupo experimental de 25 mg/Kg, decrescendo na medida em que a dose aumenta.

No grupo de 25 mg/Kg, a principal alteração foi o quinto esternóbros reduzido. No entanto, notou-se também a ausência desses elementos primitivos na primeira e quinta posição de formação. Além disso, foi percebido irregularidades no formato, inclusive com aparência de borboleta. No grupo de 50 mg/kg, novamente predomina o quinto esternóbros reduzido, seguido pela falta de formação de determinados segmentos ou o acréscimo de

um elemento. Nos fetos expostos indiretamente a dose de 100 mg/kg, a ausência de um dos esternóbro predominou, mas há também a redução e irregularidade na formação.

Durante a fase aguda na qual se administrou as doses da piplartina via gavagem, não se observou nenhum animal com letargia, piloereção, vocalização ou tremores. Tivemos uma perda de cinco animais devido a complicação na gavagem, nenhuma morte relacionada as dosagens.

Diante disto, a exposição de camundongos fêmeas *M. musculus* às concentrações experimentais de 25, 50 e 100 mg/Kg não afetou significativamente análise esquelética.

3.5 Análises hematológica e bioquímica

Na avaliação hematológica, os resultados descritos como média \pm desvio padrão na **Tabela 5** expressam as análises estatísticas dos parâmetros das três séries do sangue entre o controle e os grupos experimentais, não evidenciando alterações estatísticas significativas dos grupos experimentais no eritrograma, leucograma e plaquetograma em relação ao controle ($p > 0,05$).

Tabela 5. Análise hematológica observada nos grupos experimentais.

	Controle	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	P-valor
Eritrograma					
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,75 \pm 1,16	9,40 \pm 1,19	8,79 \pm 0,49	9,28 \pm 1,60	0,5649
HGB (g/dL)	13,16 \pm 1,71	13,86 \pm 1,79	13,29 \pm 0,90	13,80 \pm 2,30	0,3340
HCT (%)	34,32 \pm 4,39	36,14 \pm 4,49	34,73 \pm 2,28	36,47 \pm 6,25	0,4460
MCV (fL)	39,27 \pm 1,49	38,48 \pm 1,69	39,50 \pm 1,39	39,31 \pm 1,03	0,3526
MCH (pg)	15,07 \pm 0,71	14,78 \pm 0,95	15,13 \pm 0,73	14,91 \pm 0,52	0,7469
MCHC (g/dL)	38,36 \pm 1,07	38,34 \pm 1,31	38,28 \pm 1,58	37,92 \pm 1,16	0,8644
RDW-CV (%)	18,24 \pm 1,06	19,79 \pm 2,14	18,22 \pm 1,85	18,14 \pm 1,09	0,1523
Leucograma					
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,13 \pm 1,78	3,32 \pm 1,68	4,50 \pm 4,95	3,01 \pm 1,00	0,9791
W-SCR (%)	61,79 \pm 14,29	64,05 \pm 9,69	68,24 \pm 2,42	66,89 \pm 8,88	0,4596
W-MCR (%)	36,59 \pm 14,34	34,60 \pm 8,79	29,84 \pm 1,45	32,32 \pm 9,01	0,3237
W-LCR (fL)	1,62 \pm 1,37	1,35 \pm 1,71	2,11 \pm 1,82	0,79 \pm 0,73	0,2281
Plaquetograma					
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1162,27 \pm 443,11	1373,23 \pm 542,46	1179,44 \pm 491,07	1208,44 \pm 454,24	0,7446

*RBC: Glóbulos vermelhos; HGB: Hemoglobina; HCT: Hematócrito; MCV: Volume Corpuscular Médio; MCH: Hemoglobina Corpuscular Média; MCHC: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW-CV: Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos apresentada como o coeficiente de variação; WBC: Total de glóbulos brancos; W-SCR: Taxa de células pequenas (linfócitos); W-MCR: Taxa de células médias (monócitos, basófilos e eosinófilos); W-LCR: Taxa de células grandes (neutrófilos); PLT: Contagem de plaquetas. g/dL - gramas por decilitro; fL - femtolitros; pg - picogramas. Os dados são apresentados com base na média \pm desvio padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. Estatística: Teste ANOVA one-way e Tukey post hoc (para MCV e MCHC) e teste Kruskal-Wallis e Dunn post hoc (para os demais parâmetros).

Na avaliação bioquímica, os resultados descritos como média \pm desvio padrão na **Tabela 6** expressam as análises estatísticas dos parâmetros bioquímicos entre o controle e os grupos experimentais, não evidenciando alterações estatísticas significativas dos grupos experimentais nos níveis séricos de marcadores bioquímicos em relação ao controle ($p > 0,05$).

Tabela 6. Análise bioquímica observada nos grupos experimentais.

	Controle	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	p-valor
ALT (U/L)	50,82±26,17	34,00±10,39	41,50±23,55	33,43±13,26	0,2699
AST (U/L)	91,00±41,15	61,56±18,63	74,14±22,42	73,29±28,82	0,3415
Albumina (g/dL)	1,14±0,44	1,44±0,43	1,60±0,43	1,38±0,46	0,1513
Creatinina K (mg/dL)	0,44±0,13	0,42±0,08	0,37±0,06	0,39±0,08	0,3976
Ureia (mg/dL)	48,27±10,64	54,64±20,08	54,67±5,77	43,86±9,55	0,0864
LDH (mg/dL)	893,38±521,70	698,70±260,61	933,38±413,48	724,33±214,89	0,4954

*ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; LDH: lactato desidrogenase. U/L = unidades por litro; mg/dl = miligramas por decilitro; g/dl = gramas por decilitro. Os dados são apresentados com base na média ± desvio padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. Estatística: Teste ANOVA one-way e Tukey post hoc (para albumina, creatinina K e LDH) e teste Kruskal-Wallis e Dunn post hoc (para ALT, AST e ureia).

A análise do sangue pode elucidar diversas patologias ou alterações fisiológicas ocasionadas por um ativo biológico. Órgãos excretores como os rins, e órgão de desintoxicação como o fígado, são susceptíveis e podem indicar alterações importantes através de marcadores bioquímicos. Diante disto, os resultados dos eritrócitos, da hemoglobina e dos índices hematimétricos e dos exames bioquímicos não demonstraram alterações hematológicas e metabólicas que sugerissem toxicidade materna.

Em comparação a estudos similares (FOFARIA *et al.* 2016; BEZERRA 2008) na avaliação de toxicidade em camundongos pela exposição à piplartina, é possível assegurar devido a correlação com os resultados da literatura, a segurança da exposição da molécula nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Demonstrando que o tratamento não alterou atividade enzimática das transaminases, descartando possíveis danos ao fígado e rins, além de processo inflamatório, anemia e disfunções da medula óssea.

3.6 Estudos de fragmentação do DNA e ciclo celular

Na avaliação de fragmentação do DNA em células da medula óssea, os resultados descritos na **Figura 5A** expressam taxas de fragmentação inferior a 22% nos grupos experimentais, similar a fragmentação de, aproximadamente 19% do controle. Na **Figura 5B**, a distribuição de subpopulação de células da MO no ciclo celular evidencia diferença estatística significativa na fase S do grupo experimental tratado na concentração de 50 mg/Kg de piplartina em relação ao controle (4,4% e 6,8% do total de células, respectivamente).

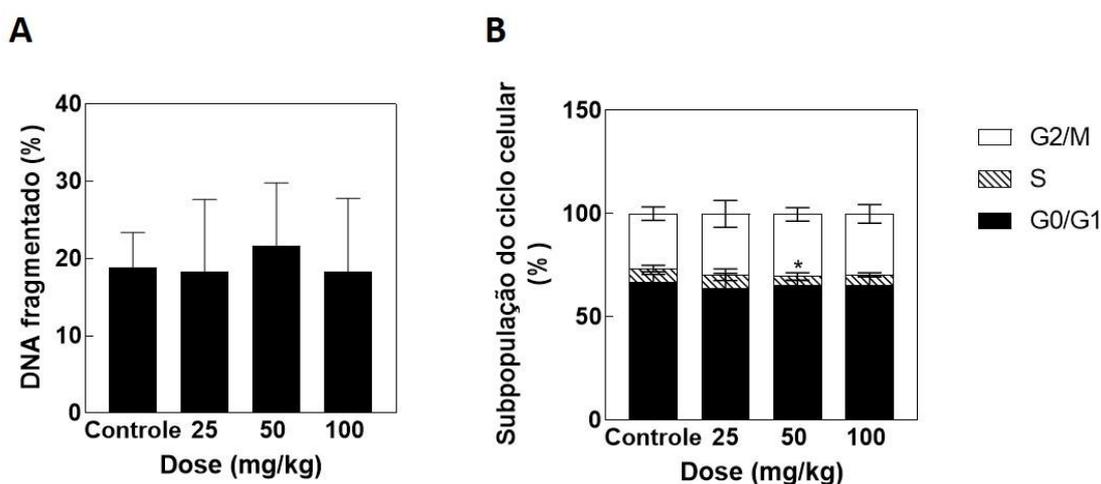


Figura 5. Efeito da piplartina em células de medula óssea. (A) Porcentagem de DNA fragmentando e (B) porcentagem da população de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo células. Estatística: Kruskal-Wallis e Dunn post hoc. *Diferença significativa se comparado ao controle (p valor 0,0095).

Em conjunto com o hemograma, a avaliação de danos ao DNA e alterações na proliferação de células da MO foram usados como indicadores de toxicidade hematopoiética. Sabe-se que a extensão do dano ao DNA impacta na progressão celular. Em resposta aos danos, vias de checkpoint que regulam mecanismos de reparo de DNA são ativadas e a progressão do ciclo celular é interrompida até que o dano seja reparado. Se os danos forem irreparáveis, as células mantêm-se permanentemente paradas no ciclo ou sofrem apoptose (BRANZEI e FIOANI, 2008). Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de DNA fragmentado ao comparar os grupos tratados e controle.

No grupo tratado com 50 mg/kg, a subpopulação de células em fase S foi ligeiramente menos ($4,4 \pm 1,82\%$) do que no grupo controle ($6,8 \pm 1,56\%$) ($p < 0,05$). Apesar disto, o perfil de células nas fases G0/G1 e G2/M permaneceram similares entre os grupos, sugerindo que a piplartina não promove genotoxicidade, nem efeito citostático ou multiplicação desregulada de células progenitoras sanguíneas. Em concordância com esses resultados, a piplartina administrada intraperitonealmente a 50 mg/kg não induziu a formação de micronúcleos em MO de camundongos (BEZERRA *et al.*, 2009).

4. Conclusão

Conclui-se que, os resultados oriundos das avaliações de toxicidade geral e embrionária, corroboram com a segurança da exposição da piplartina às concentrações e modelo animal avaliado. Foi possível observar uma relação entre eficácia e toxicidade consideravelmente promissora devido nossos resultados não demonstrarem efeitos tóxicos significativos e/ou correlacionados à exposição dos grupos experimentais

Entretanto, faz-se necessário mais estudos acerca da exposição da piplartina com intuito de elucidar maior conhecimento científico *in vivo* baseado em evidência sobre a farmacocinética, a farmacodinâmica, a biodisponibilidade, a biodistribuição e outros possíveis efeitos colaterais da molécula em outros modelos animais antes de afirmar sua efetiva segurança para estudos clínicos em humanos. Diante disto, o estudo demonstra potencial inovador referente a molécula, proporcionando resultados promissores para estudos posteriores e corroborando com aplicações biomédicas, nanotecnológicas e farmacêuticas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brasil; 2018/07999-7, VIDA-FROG e 2015/50316-7) e à Universidade de Brasília (UnB) pelo apoio financeiro e logístico

Referências bibliográficas

ARAÚJO, K.M. *et al.* Effect of piplartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice. **Pharm Biol.** 2017 Dec;55(1):1601-1607. doi: 10.1080/13880209.2017.1313870. PMID: 28415906; PMCID: PMC6130495.

BARROW, M. V.; TAYLOR, W. Jape. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 291–305, 1969.

BEZERRA D.P. *et al.* . In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J Appl Toxicol.** 2008 Mar;28(2):156-63. doi: 10.1002/jat.1261. PMID: 17541943.

BEZERRA, D.P, Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. **Mutat Res.** 2009 Jun-Jul;677(1-2):8-13. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.04.007. Epub 2009 Apr 18. PMID: 19379832.

BEZERRA, D.P. *et al.* Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutat Res.** 2008 Apr 30;652(2):164-74. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.02.001. Epub 2008 Feb 12. PMID: 18372210.

BEZERRA, D.P. *et al.* Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 453-463, 2013.

BRANZEI, D., FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 297–308 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrm2351>

BURCI, L.M. *et al.* Antiulcer and gastric antisecretory effects of dichloromethane fraction and piplartine obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats. **J Ethnopharmacol.** 2013 Jun 21;148(1):165-74. doi: 10.1016/j.jep.2013.04.006. Epub 2013 Apr 12. PMID: 23588092.

CAMPELO, Y. *et al.* Structure-Activity Relationship of Piplartine and Synthetic Analogues against *Schistosoma mansoni* and Cytotoxicity to Mammalian Cells. **Int J Mol Sci.** 2018 Jun 19;19(6):1802. doi: 10.3390/ijms19061802. PMID: 29921756; PMCID: PMC6032158.

CUMMINGS, A.M. Toxicological mechanisms of implantation failure. **Fundam Appl Toxicol**, v.15, p. 571-79, 1990.

FOFARIA, N.M., QHATTAL, H.S, LIU X, SRIVASTAVA, S.K. Nanoemulsion formulations for anti-cancer agent piplartine. Characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies. **Int J Pharm.** 2016;498(1-2):12-22. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.11.045

HUANG, C.H. *et al.* Protective Effect of Piplartine against LPS-Induced Sepsis through Attenuating the MAPKs/NF- κ B Signaling Pathway and NLRP3 Inflammasome

Activation. **Pharmaceuticals** (Basel). 2021 Jun 18;14(6):588. doi: 10.3390/ph14060588. PMID: 34207356; PMCID: PMC8234963.

LAD, N.P. *et al.* Piperlongumine derived cyclic sulfonamides (sultams): Synthesis and in vitro exploration for therapeutic potential against HeLa cancer cell lines. **Eur J Med Chem.** 2017 Jan 27;126:870-878. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.12.022. Epub 2016 Dec 10. PMID: 27987486.

LEVIN *et al.* Cancer therapy through control of cell migration, **Curr. CancerDrugTargets** 5 (2005) 505–518.

MANSON, JM; KANG, YJ. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: **Hayes' Principles and Methods of Toxicology**. 3. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 989–1035.

MEEGAN, M.J. *et al.* Piperlongumine (piplartine) and analogues: Antiproliferative microtubule-destabilising agents. **Eur J Med Chem.** 2017 Jan 5;125:453-463. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.09.048. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27689728.

MORAES, J.D. *et al.* *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of piplartine. **Exp Parasitol.** 2011 Feb;127(2):357-64. doi: 10.1016/j.exppara.2010.08.021. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20832410.

NÓBREGA. Piplartine Analogues and Cytotoxic Evaluation against Glioblastoma. **Molecules.** 2018 Jun 8;23(6):1382. doi: 10.3390/molecules23061382. PMID: 29890617; PMCID: PMC6099735.

PETROVSKA, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn Rev.** 2012 Jan;6(11):1-5. doi: 10.4103/0973-7847.95849. PMID: 22654398; PMCID: PMC3358962.

PHIPPS, K.R. *et al.* Reproductive and developmental toxicity screening study of an acetone extract of rosemary. **RegulToxicolPharmacol.** 2021 Mar;120:104840. doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104840. Epub 2020 Dec 13. PMID: 33321148.

SANTORO, A. *et al.* Neuro-toxic and Reproductive Effects of BPA. **CurrNeuropharmacol.** 2019;17(12):1109-1132. doi: 10.2174/1570159X17666190726112101. PMID: 31362658; PMCID: PMC7057208.

SILVA, R.V. *et al.* Antifungalamides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry.** 59:521-527,2002.

STAPLES, R. E.; SCHNELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-Alizarin Red S Method for fetal bone. **Stain technology**, [s. l.], v. 39, p. 61–63, 1964.

TAYLOR, P. **Practical teratology**. First ed. London: Academic Press, 1986.

VALLI, M. *et al.* The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **AnAcadBrasCienc.** 2018 Apr 16;90(1 Suppl 1):763-778. doi: 10.1590/0001-3765201820170653. PMID: 29668803.

WILSON, J. G. Methods for Administering Agents and Detecting Malformations in

Experimental Animals. In: **Teratology: Principals and Techniques**. [s.l: s.n.]. p. 262–277.

5. ANEXOS



Figura 1(A) Hacker climatizado. (B) Controla de temperatura e umidade. (C) Algodão usado como enriquecimento ambiental. (D) Fêmeas fazendo ninho com algodão

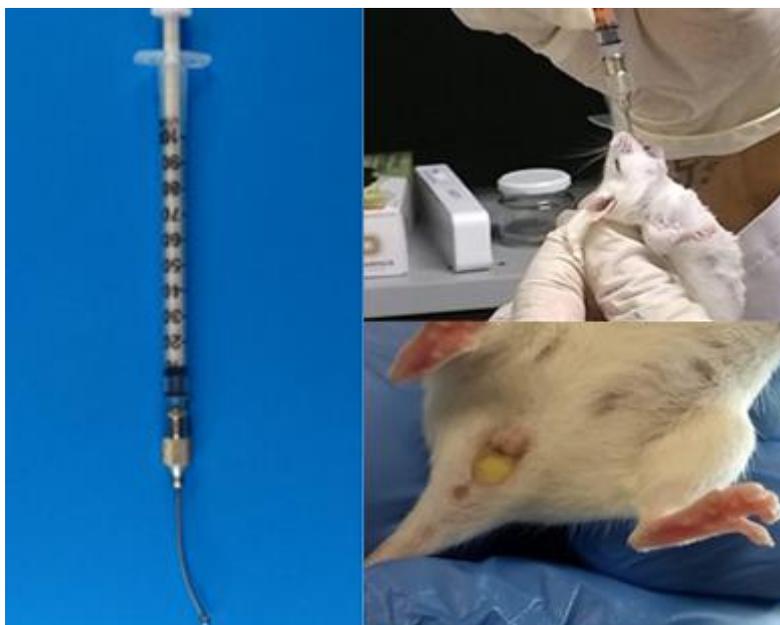
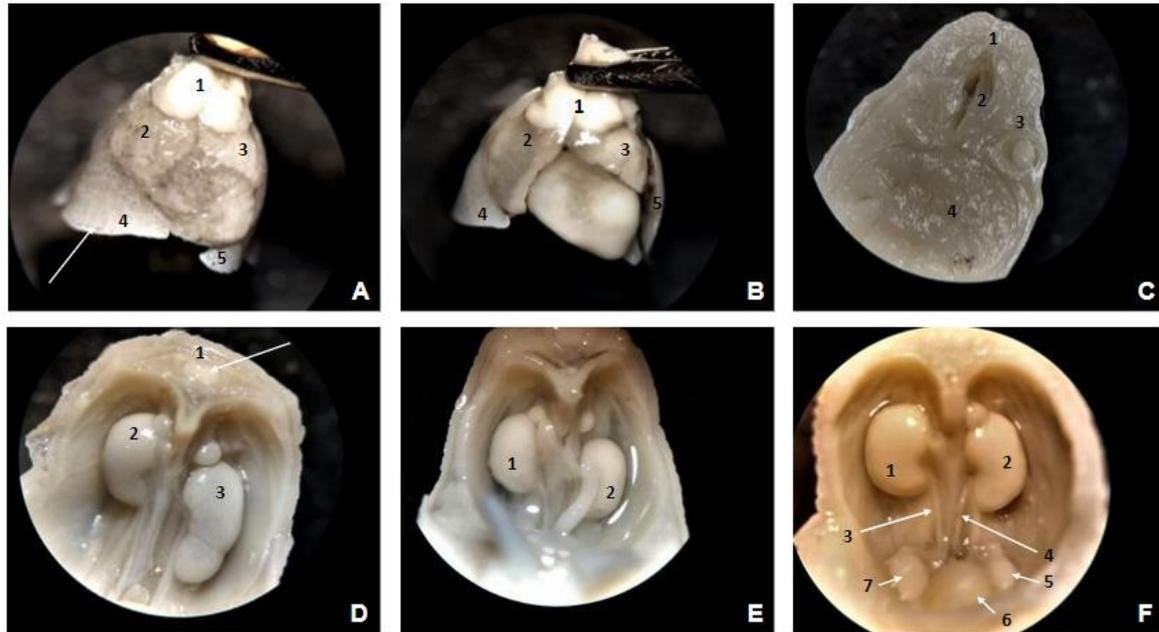
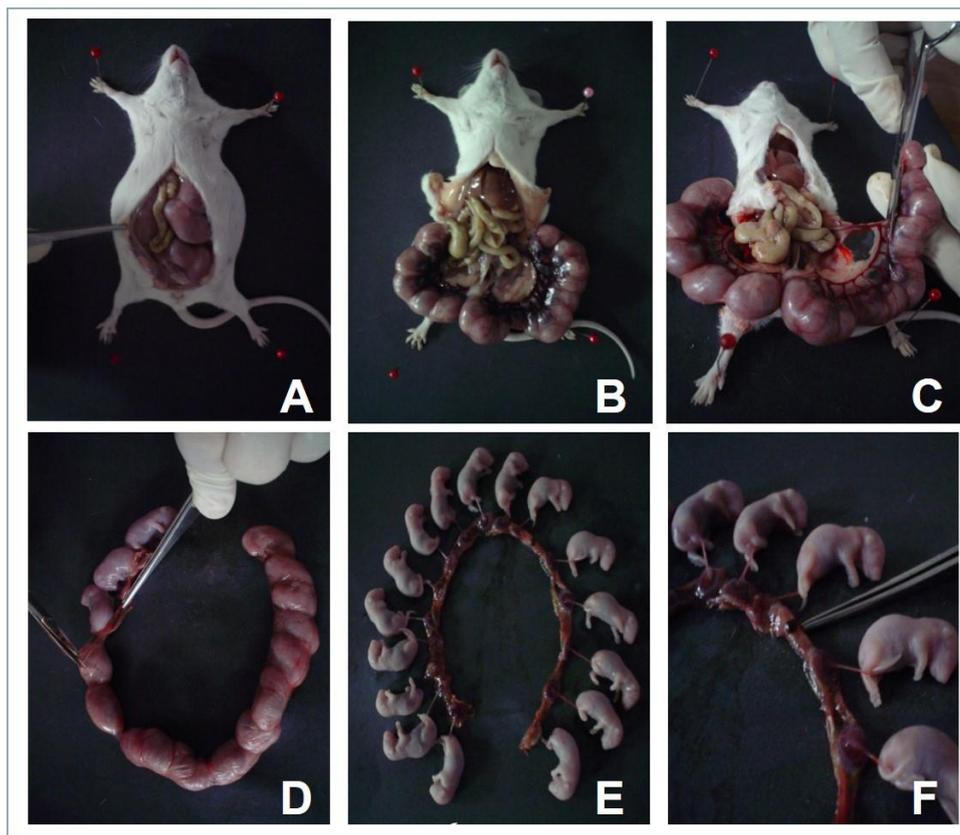


Figura 2. (A) Seringa com a agulha de gavagem. (B). Procedimento de gavagem com administração da piplartina.(C)Tampão vaginal

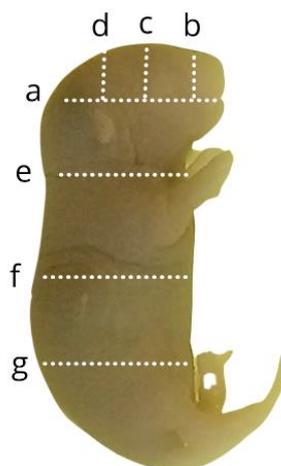


Anomalias. **(A).** Coração com formato e aspecto normais, evidenciando: timo (1); átrio direito (2); átrio esquerdo (3); porção inferior da base pulmonar direita, com seta indicando os espaços alveolares (4); porção inferior da base pulmonar esquerda (5). **(B).** Coração com possível hipertrofia atrial direita, comparado a figura A, evidenciando: timo (1); átrio direito (2); átrio esquerdo (3); porção inferior da base pulmonar direita; porção intermediária do pulmão esquerdo (5). **(C).** Fenda palatina (1); septo nasal (2); cavidade orbital, com parte do globo ocular esquerdo; cérebro (4). **(D).** Medula espinhal (1); rim direito (2) e rim esquerdo (3), com suas respectivas glândulas adrenais aderidas à porção superior. O rim esquerdo apresenta-se bilobado e com formato anormal, em comparação ao rim direito. Sobre o rim direito há duas suprarrenais. **(E).** Rim direito com glândula adrenal aderida à porção superior e ureter esquerdo aumentado (1) e rim esquerdo com glândula adrenal não aderida à porção superior (2). **(F).** Ausência da glândula adrenal no rim direito (1); rim esquerdo com aspecto normal e glândula adrenal aderida à porção superior (2); ureteres direito (3) e esquerdo (4); gônadas masculinas direita (7) e esquerda (5);
bexiga (6).

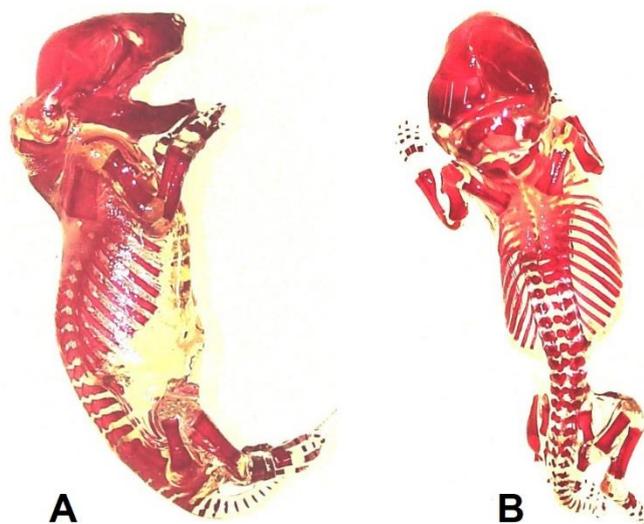
Fonte: os autores.



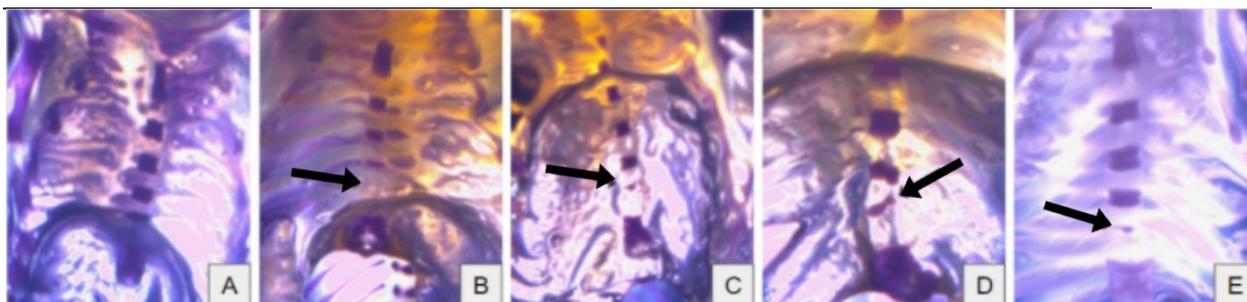
Sequência de procedimentos para coleta de fetos de roedores. A. laparotomia; B e C. histerectomia; D e E. retirada dos embriões do útero e do interior do âmnio. F: ponta da pinça apontando um sítio de abortamento.



(A) Secção transversal na altura da cavidade oral. (B). Secção frontal na região pré-gabelar. (C). Secção frontal na região orbital. (D). Secção frontal na região do vértex. (E). Ssecção transversal na região cervical. (F). Secção transversal na região abdominal, logo abaixo do diafragma. (G). Secção transversal na região pélvica, passando pelo umbigo. Fonte: os autores.



Fetos de camundongos corados com alizarina. **(A)**. Vista lateral direita. **(B)**. Vista dorsal.
Fonte: os autores



Exemplos de anomalias esqueléticas em esternébras. **(A)** Esternébras sem alterações. **(B)**. Ausência de uma das esternébras. **(C)**. Excesso de uma esternébra. **(D)**. Esternébra com formato irregular. **(E)**. Esternébra reduzida.
Fonte: os autores.

ANEXOS II

FICHA PARA ANOTAÇÃO DE DADOS APÓS A CESARIANA

GRUPO EXPERIMENTAL: _____ AGENTE EXPOSTO: _____
 DOSE: _____ CÓDIGO DA FÊMEA: _____ DIA DA EUTANÁSIA: ____/____/____
 NÚMERO DE FETOS VIVOS: _____ NÚMERO DE FETOS MORTOS: _____ MASSA DO ÚTERO: _____

MASSA DOS FETOS, em gramas:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Massa média dos fetos: _____

MEDIDA DOS FETOS, em centímetros:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Medida média dos fetos: _____

MASSA DAS PLACENTAS, em gramas:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Massa média das placentas: _____

SEXO DOS FETOS:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Quantidade de fetos masculinos: _____ Quantidade de fetos femininos: _____

RESULTADO DA TÉCNICA DE SALEWSKY

Nº de sítios de implantações: _____ Nº de reabsorções: _____

MASSA DOS ÓRGÃOS DAS FÊMEAS, em gramas:

Coração: _____ Fígado: _____ Rins: _____ Baço: _____

ANOMALIAS EXTERNAS OBSERVADAS: Descrever cada anomalia e número de fetos que a possui

FICHA PARA ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE FÊMEAS

Grupo Experimental:

Código da Fêmea:

Via de exposição:

Agente de exposição e dose:

Data do acasalamento	Data do início do tratamento	Data da laparotomia
_ / _ / _	_ / _ / _	_ / _ / _
Peso: _____	Peso: _____	Peso: _____

Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
Peso: _____				
Dose: _____				
Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15
Peso: _____				
Dose: _____				
Dia 16	Dia 17	Dia 18		
Peso: _____	Peso: _____	Peso: _____		
Dose: _____	Dose: _____	Dose: _____		

ANEXOS



Certificado

Certificamos que Giulliano Rezende Silva CPF 57315442120, finalizou o curso de Fundamentos de Estatística em 29 de novembro de 2020 com aproveitamento de 89%. Este curso possui carga horária de 60 horas e foi realizado a distância pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Laboratório de Tecnologia de Informações e Mídias Educacionais da Universidade Federal de Goiás.

Período de realização: 22 de setembro de 2020 até 29 de novembro de 2020



Benedito Guimarães Aguiar Neto
Presidente da CAPES

Autenticidade do documento: avamec.mec.gov.br/#/curso/verificar-autenticidade-documento-conclusao
Registro: 985RVRXd

Documento emitido pelo ambiente virtual de aprendizagem do Ministério da Educação - AVAMEC



CERTIFICADO DE EXTENSÃO	
	Universidade de Brasília Decanato de Extensão Secretaria de Administração Acadêmica
Certificamos que GIULLIANO REZENDE SILVA , documento de identificação CPF 573.154.421-20, participou como cursista da ação de extensão VI Curso de Verão de Toxicologia - Evento, na UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA , no período de 11 de Março de 2019 a 15 de Março de 2019, com duração de 40 horas.	
Brasília - DF, 08 de Julho de 2022	
Frequência: 100%	
Executor do Evento: DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA	Júlio César Goulart Garay Secretário Adjunto de Administração Acadêmica
	
	Olgamir Amância Ferreira Decana de Extensão
Validar certificado em sistemas.unb.br/siex/publico/valida_certificado.xhtml ; 3994CC61A84842827E3F99EF5D256D96	