

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ANDRÉ LUIZ DE SOUZA BARROS

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL PELO
TRATAMENTO COM ÁCIDO VALPRÓICO, ATORVASTATINA E
PIOGLITAZONA ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO**

Recife
2010

ANDRÉ LUIZ DE SOUZA BARROS

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL PELO
TRATAMENTO COM ÁCIDO VALPRÓICO, ATORVASTATINA E
PIOGLITAZONA ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Desenvolvimento Pré-clínico de Produtos Bioativos.

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva

CO-ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

Recife

2010

Barros, André Luiz de Souza

Avaliação da inibição do crescimento tumoral pelo tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona isoladamente e em associação / André Luiz de Souza Barros. – Recife: O Autor, 2010.

94 folhas : il., tab. graf.

Orientadoras: Teresinha Gonçalves da Silva e Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho.

Mestrado – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2010. Inclui bibliografia.

1. Ácidos graxos – Uso terapêutico 2. Câncer - Tratamento 3. Farmacologia experimental I. Título.

572.57 CDD(22.ed.)

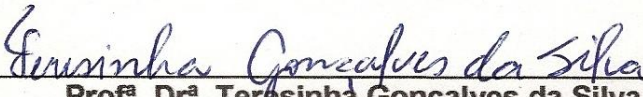
**UFPE
CCB – 2011- 062**

ANDRÉ LUIZ DE SOUZA BARROS

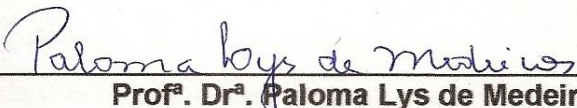
**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL PELO
TRATAMENTO COM ÁCIDO VALPRÓICO, ATORVASTATINA E
PIOGLITAZONA ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO**

APROVADA EM 03 / 09 / 2010

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Teresinha Gonçalves da Silva
Orientadora – UFPE



Profª. Drª. Paloma Lys de Medeiros
Examinador interno – UFPE

Profª. Drª. Marianna Vieira Sobral Castello Branco
Examinador externo – UFPB

Recife

2010

*Aos meus pais, José Barros (in
memorian) e Eliane Maria de Souza Barros,
Pelo imenso amor e companheirismo que
sempre me deram.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e vontade para perseverar em todos os segundos da minha vida.

A Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva por ter me acolhido, orientado e incentivado, contribuindo para minha formação pessoal e profissional. Além de tudo pela grandiosa amizade.

A prof^a. Dr^a. Maria Teresa Jansem por todo o incentivo e inestimável amizade.

Ao me pai, José Barros (*in memorian*), por todo o apoio, valores e ensinamentos durante toda a minha vida.

A minha mãe, Eliane Maria de Souza Barros, por estar sempre ao meu lado me amparando e dando incentivo.

A minha noiva, Marcela Durão, por todo o carinho, dedicação, companheirismo e amor. E também pela compreensão durante os momentos em que estive ausente.

A toda minha família pelo apoio contínuo.

A Dr^a. Christina Peixoto, pela grandiosa ajuda na preparação das lâminas de microscopia óptica e processamento do material para microscopia eletrônica.

A Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros, pelo auxílio nas interpretações dos resultados hispatológicos e pela contribuição sempre que necessário.

A aluna de Pós-Graduação, Jaciana dos Santos Aguiar, pela grande ajuda na parte experimental desse trabalho, sempre com alegria e paciência.

As alunas Katariny, Larissa, Tatiane e Ingrid por toda ajuda na parte *in vivo*.

As alunas de Pós-Graduação Diana Malta e Aline com quem eu sempre pude contar.

A todos os alunos do LBPF pela ajuda direta e indireta.

Aos amigos Nestor, Leandro, David e Wendell por todo companheirismo.

As Técnicas e amigas Maria e Suzete por todo apoio sempre.

A coordenação da pós-graduação em Inovação Terapêutica, por todo auxílio sempre que necessário.

A todos os funcionários da pós-graduação em Inovação Terapêutica, por todo suporte.

Ao apoio financeiro da CAPES e da PROPESQ.

MUITO OBRIGADO!

André Luiz de Souza Barros

“Os que sonham de dia são conscientes de muitas coisas que escapam aos que sonham apenas à noite.”

Edgar Allan Poe

RESUMO

O câncer constitui um grande problema de saúde pública e é, atualmente, a segunda principal causa de morte por doença no mundo. Os agentes farmacológicos utilizados no tratamento do câncer incluem uma grande variedade de compostos que atuam de várias formas, nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celular. Dentre as novas classes de fármacos em estudo para tratamento do câncer estão os inibidores das histonas deacetilase (iHDAC), inibidores da 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) e os agonistas do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR γ). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antitumoral e os efeitos toxicológicos, em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, do ácido valpróico (inibidor de histonas deacetilases), da atorvastatina (inibidor da HMG-CoA redutase), e da pioglitazona (agonista do PPAR γ) isoladamente e em combinação. A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método do MTT, nas linhagens de NCI-H292, Hep-2, K562 e carcinoma de Ehrlich (C.E). Os resultados apresentados no ensaio do MTT mostraram que o ácido valpróico, usado isoladamente, é citotóxico na linhagem de C.E com CI_{50} de $10,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A atorvastatina usada isoladamente mostrou CI_{50} de $5,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em NCI-H292, e a associação de atorvastatina com pioglitazona mostrou-se altamente citotóxica em células das linhagens de NCI-H292, Hep-2 e C.E com CI_{50} de 3,75, 23,02 e $11,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo* todos os fármacos e suas combinações apresentaram inibição de crescimento do carcinoma de Ehrlich. O Ácido valpróico usado isoladamente e a combinação de atorvastatina com pioglitazona apresentaram inibições de 60,2 e 64,9% respectivamente. Os parâmetros toxicológicos avaliados mostraram que os fármacos induzem poucos efeitos tóxicos. Todos esses dados sugerem que o ácido valpróico, a atorvastatina e a pioglitazona, bem como suas combinações, apresentam potencial antineoplásico em diferentes graus e, posteriormente, podem representar um grande recurso terapêutico.

Palavras-chave: Ácido valpróico. Atorvastatina. Pioglitazona. Câncer. Atividade antitumoral. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is a major public health problem and is currently the second leading cause of death by disease in the world. Pharmacological agents used in cancer treatment include a wide variety of compounds that act in various ways, in the mechanisms of survival, proliferation and cell migration. Among the new classes of drugs being studied to treat cancer are the histone deacetylases inhibitors (iHDAC), inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase inhibitors) and peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) agonists. The aim of this study was to evaluate the potential antitumor and toxic effects in experimental models in vitro and in vivo, of the valproic acid (iHDAC), atorvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) and pioglitazone (PPAR γ agonists) alone and in combination. The cytotoxicity evaluation was performed by MTT method, in cell lines of NCI-H292, Hep-2, K562 and Ehrlich carcinoma (EC). The results shown in the MTT assay showed that valproic acid, used alone, is cytotoxic in the line of CE with IC₅₀ of 10.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Atorvastatin, used alone, showed IC₅₀ of 5.54 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in NCI-H292, and the combination of atorvastatin and pioglitazone was highly cytotoxic in cells lines of NCI-H292, Hep-2 and EC with IC₅₀ of 3.75, 23.02 and 11.39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively. In the evaluation of antitumor activity in vivo all drugs and their combinations showed inhibition of growth of Ehrlich carcinoma. The valproic acid used alone and the combination of atorvastatin and pioglitazone showed inhibitions of 60.2 and 64.9% respectively. Toxicological parameters evaluated showed that the drugs induce few toxics effects. All these data suggest that valproic acid, atorvastatin and pioglitazone, as well as combinations thereof have anticancer potential in different degrees and, subsequently, may represent a major therapeutic resource.

Key-words: Valproic acid. Atorvastatin. Pioglitazone. Cancer. Antitumor activity. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo especulativo sobre os diferentes mecanismos de ação dos inibidores de histonas deacetilase (adaptado de: BOTRUGNO; SANTORO; MINUCCI, 2009).....	29
Figura 2- Bases moleculares da morte celular induzida por inibidores de histonas deacetilase.....	30
Figura 3- Mecanismos induzidos por inibidores das histonas deacetilase (Adptado de: CAREW; GILES; NAWROCKI, 2008).....	32
Figura 4- Estrutura química do ácido valpróico.....	32
Figura 5- Estrutura química das estatinas naturais.....	35
Figura 6- Estrutura química das estatinas sintéticas.....	36
Figura 7- Efeito dos inibidores da HMG-CoA redutase na via do mevalonato.....	38
Figura 8- Principais Tiazolidinedionas.....	40
Figura 9- Tiazolidinedionas induzindo a ativação do PPAR γ em células cancerígenas (adaptado de: BLANQUICETT; ROMAN; MICHAEL, 2008).....	43
Figura 10- Mecanismos de apoptose induzidos por tiazolidinedionas.....	44
Figura 11- Camundongos albinos suíços obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE (Foto: André Barros).....	48
Figura 12- Esquema representativo do método MTT.....	50
Figura 13- Efeito do tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona em doses isoladas e associadas em camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich.....	57

Figura 14- Fotomicrografias mostrando a avaliação histopatológica do Carcinoma de Ehrlich de animais tratados com NaCl 0,9% (painel A), 300 mg kg⁻¹ de VPA (painel B) 5 mg kg⁻¹ de atorvastatina + 7,5 mg kg⁻¹ de pioglitazona (painel C) e 5 mg kg⁻¹ de doxorrubicina (painel D) analisados por microscopia óptica (x 400).....60

Figura 15- Efeito do tratamento com VPA, ATOR+PIO e doxorrubicina no fígado de camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich. Fotomicrografias mostrando a avaliação histopatológica do Fígado de animais tratados com NaCl 0,9% (painel A), 300 mg kg⁻¹ de VPA (painel B) 5 mg kg⁻¹ de atorvastatina + 7,5 mg kg⁻¹ de pioglitazona (painel C) e 5 mg kg⁻¹ de doxorrubicina (painel D) analisados por microscopia óptica (x 400).....61

Figura 16- Efeito do tratamento com VPA, ATOR+PIO e doxorrubicina nos rins de camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich. Fotomicrografias mostrando a avaliação histopatológica dos rins de animais tratados com NaCl 0,9% (painel A), 300 mg kg⁻¹ de VPA (painel B) 5 mg kg⁻¹ de atorvastatina + 7,5 mg kg⁻¹ de pioglitazona (painel C) e 5 mg kg⁻¹ de doxorrubicina (painel D) analisados por microscopia óptica (x 400).....62

Figura 17- Efeito do tratamento com VPA, ATOR+PIO e doxorrubicina nos baços de camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich. Fotomicrografias mostrando a avaliação histopatológica dos baços de animais tratados com NaCl 0,9% (painel A), 300 mg kg⁻¹ de VPA (painel B) 5 mg kg⁻¹ de atorvastatina + 7,5 mg kg⁻¹ de pioglitazona (painel C) e 5 mg kg⁻¹ de doxorrubicina (painel D) analisados por microscopia óptica (x 400).....63

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Doses dos fármacos e combinações utilizados em cada grupo testado em mg. kg ⁻¹	51
Tabela 2. Efeito dos fármacos isolados e em combinação em células da linhagem NCI-H292. Os dados são apresentados como valores CI ₅₀ e intervalos de confiança.....	55
Tabela 3. Efeito dos fármacos isolados e em combinação em células da linhagem Hep-2. Os dados são apresentados como valores CI ₅₀ e intervalo de confiança.....	56
Tabela 4. Efeito dos fármacos isolados e em combinação em células de carcinoma de Ehrlich. Os dados são apresentados como valores CI ₅₀ e intervalo de confiança.....	56
Tabela 5: Efeito do tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona em doses isoladas e associadas sobre a massa corpórea e peso dos órgãos de camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich.....	58
Tabela 6. Efeito do tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona em doses isoladas e associadas sobre os parâmetros hematológicos de camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AG – Ácidos graxos

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência adquirida (acquired immune deficiency syndrome)

ATOR – atorvastatina

Bax – Antagonista do Bcl-2 (indutora de apoptose ou pro-apoptótica)

Bcl-2 – célula B de Linfoma-2 = proteína inibidora de apoptose (morte celular programada)

C.E – carcinoma de Ehrlich

cAMP – Monofosfato de adenosina cíclico

CDK – Cinase dependente de ciclinas

CDKI – Inibidor de CDK

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA-UFPE – Comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco

Cl₅₀ – Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular

C-myc – Proteína similar ao oncogene viral de Mielocitomatose (V-myc) = Proto-oncogene que atua como fator de transcrição de outros genes.

CO₂ – Dióxido de Carbono

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX-2 – Ciclooxygenase-2

D54 – glioma

DAC – doença arterial coronariana

DMEM – Meio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

E2F – Fator ativador da transcrição em eucariontes maiores 2

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EFA – Ácidos graxos essenciais, ou seja, que devem ser obtidos da dieta

EGF – Fator de crescimento epidermal

EGFR – Receptor do EGF

FATP – Proteína transportadora de AG

FDA – “Food and Drug Administration”

FPP – Farnesilpirofosfato

GPP – Geranilpirofosfato

GABA – Ácido gama-aminobutírico

HAT – histonas acetiltransferases

HDAC – histonas deacetilase

HeLa – carcinoma cervical humano

HEP-2 – carcinoma epidermóide de laringe

HIF – Fator induzido por hipóxia

HMG-CoA – 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

HT-1080 – Fibrosarcoma humano

HTB5 – Carcinoma de células transicionais de bexiga humana

HTB9 – Carcinoma de bexiga humana

ICLAS – Conselho de Laboratório de Animais Experimentais

iHDAC – inibidores das histonas deacetilase

IKK – Cinase do I κ B

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Ink – Família de proteínas cinase inibidoras de complexos Ciclina D/CDK4 ou 6

I κ B – Inibidor do NF- κ B

K562 – Eritroleucemia

KB – carcinoma laringeal

kDa – kilodalton (unidade de medida do peso molecular de proteínas)

Ku70/80 – Subunidades regulatórias ligantes de DNA com 70 e 80kDa respectivamente que fazem parte da holoenzima DNA-PK

MAPK – Cinases de proteínas ativadas por mitógenos

MAPKK ou MEK – Cinase que ativa as MAPK

MAPKKK, MAP3K, MKKK ou MEKK – Cinase que ativa a cinase das MAPK

MCF-7 – adenocarcinoma de mama

MEC – Matriz extracelular

MMPs – Metaloproteases da matriz

MTT – ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)])

NCI-H292 – Carcinoma mucoepidermóide de pulmão

NF- κ B – Fator nuclear de transcrição- κ aB

OMS – Organização Mundial de Saúde

P14 ou p19 – Proteína de 14kDa ou 19kDa inibidoras de MDM2

P16 – Proteína de 16kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Ink

P21 – Proteína de 21kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Cip/Kip

P27 – Proteína de 27kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Cip/Kip

P50 ou NF- κ B1 – Proteína de 50kDa que se liga ao p65 formando o heterodímero do NF- κ B

P53 – proteína de 53kDa ou proteína tumoral 53, conhecida como supressora tumoral

P65 – Proteína de 65kDa que se liga ao p50 formando o heterodímero do NF- κ B

PBS – Solução tampão fosfato

PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas

PDGFR – Receptor do PDGF

PIO – pioglitazona

PPAR – Receptor ativado pela proliferação de peroxissomos (receptor nuclear que funciona como fator de transcrição)

PPAR γ – receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo

PTEN – Enzima fosfatase e homóloga à Tensina, conhecida como supressora tumoral.

Raf – Proteína efetora da via do Ras

Ras – Proteína do vírus de sarcoma de rato = Família de pequenas proteínas que se ligam ao GTP (Superfamília Ras de GTPases)

Rb ou pRb – Proteína retinoblastoma

Rho – Subfamília de proteínas GTPases da família Ras, que incluem, entre outras, Rac1 e RhoA.

RNA – Ácido ribonucléico

RNA_m – Ácido ribonucléico mensageiro

ROS – Espécies reactivas de oxigênio

RPM – Rotações por minuto

STATs – Transdutores de sinais e ativadores de transcrição

SW480 – câncer do colo do útero

TNF – Factor de necrose tumoral

TNFR – Receptor do TNF

TZDs – Tiazolidinedionas

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

VPA – ácido valpróico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Geral	25
2.2. Específicos	25
3. REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1. Inibidores das histonas deacetilase	27
3.2. Estatinas	33
3.3. Tiazolidinedionas (TZDs)	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1. Material.....	47
4.1.1. <i>Fármacos</i>	47
4.1.2. <i>Células</i>	47
4.1.3. <i>Animais experimentais</i>	47
4.2. Métodos.....	48
4.2.1. <i>Procedimentos éticos</i>	48
4.2.2. <i>Determinação do efeito dos fármacos isolados e em combinação em cultura de células tumorais humanas</i>	49
4.2.3. <i>Determinação do efeito dos fármacos isolados e em combinação em cultura de células de carcinoma de Ehrlich</i>	49

4.2.4. Determinação do efeito dos fármacos isolados e em combinação no crescimento do carcinoma de Ehrlich <i>in vivo</i>	51
4.2.5. Efeito dos fármacos isolados e em combinação na massa corpórea e peso dos órgãos.....	52
4.2.6. Análises morfológicas e histopatológicas	52
4.2.7. Determinação do efeito dos fármacos isolados e em combinação nos parâmetros hematológicos.....	52
4.2.7. Análise estatística	53
5. RESULTADOS.....	54
5.1. Efeito dos fármacos isolados e em combinação em cultura de células tumorais humanas	55
5.2. Efeito dos fármacos isolados e em combinação em cultura de células de carcinoma de Ehrlich	56
5.3. Efeito dos fármacos isolados e em combinação no crescimento do carcinoma de Ehrlich <i>in vivo</i>	57
5.4. Efeito dos fármacos isolados e em combinação na massa corpórea e peso dos órgãos.....	58
5.5. Análise morfológica e histopatológica.....	58
5.6. Efeito dos fármacos isolados e em combinação nos parâmetros hematológicos	59
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	74

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico para um grupo de mais de 100 doenças que podem afetar alguma parte do corpo. Uma característica definida do câncer é o surgimento de células anormais que crescem além de seus limites usuais e que podem invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos, um processo conhecido como metástase, que é a sua principal causa de morte. O câncer é uma doença genética que pode ocorrer em todos os tipos de tecido do organismo sendo consequência de uma mudança patológica na informação contida no DNA. Origina-se a partir de mutações que alteram a expressão de genes codificadores de proteínas comprometidas com o controle da proliferação e da diferenciação celular ou, ainda, envolvidas nos mecanismos de reparo do DNA. Em consequência dessas alterações – atualmente reconhecidas como marcas comuns de todos os tipos de câncer – as células adquirem vantagens proliferativas sobre as suas congêneres normais, formando tumores, invadindo tecidos circunvizinhos e podendo propagar-se à distância (KLUG; CUMMINGS, 2002; KATZUNG, 2003).

As Principais características das células cancerígenas são à auto-suficiência de sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores do crescimento, bloqueio da apoptose, potencial replicativo ilimitado, indução à angiogênese, poder de invasão e capacidade de migração (HANAHAN; WEINGER, 2000). Além disso, as células que sofrem transformações neoplásicas, geralmente, apresentam mecanismos de escape contra as respostas inatas e adaptativas do sistema imune (SMYTH et al., 2006; APTSIAURI et al., 2007).

O processo de carcinogênese, em geral, é lento, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Esse processo passa por momentos distintos que correspondem aos estágios de iniciação, promoção e progressão do tumor. Esses estágios representam respectivamente um dano ao DNA da célula provocado por um agente (oncoiniciador), a transformação da célula iniciada em uma célula maligna e por último a multiplicação descontrolada, caracterizando a instalação do câncer, que evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença

(SPENCE & JONHSTON, 2001; KUMMAR et al., 2004; JUNG et al., 2006; SPANDIDOS, 2007).

As neoplasias malignas são classificadas de acordo com o tipo de célula normal que a originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Isso é o que pode se chamar de classificação primária. Os processos invasivos e metastáticos, bem como a série de anormalidades metabólicas decorrentes do câncer, provocam doença e morte eventual do paciente, a não ser que a neoplasia possa ser erradicada com o tratamento (KATZUNG, 2003; KUMMAR et al., 2004; INCA, 2009).

Avaliações epidemiológicas demonstram que o câncer constitui um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, sendo a segunda principal causa de morte por doença no mundo. O número de pessoas que morrem de câncer a cada ano em todo o mundo supera as mortes por AIDS, tuberculose e malária juntos (MATHERS; LONCAR, 2006; BOYLE; LEVIN, 2008). Os cânceres de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama são os de maior ocorrência e mortalidade no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2009). Segundo o Instituto Nacional do Câncer – INCA (2009), no Brasil, as estimativas para o ano de 2010 e válidas também para o ano de 2011, apontam que ocorrerão 489.270 novos casos de câncer.

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia, recentemente novas modalidades terapêuticas se tornaram usuais, como a terapia de fotorradiação e a imunoterapia. O objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, porém, na maioria dos casos, é necessária a associação de mais de um tipo de tratamento (KATZUNG, 2003; KUSUZAKI et al., 2007; HERR; MORALES, 2008).

Os agentes farmacológicos utilizados no tratamento do câncer incluem uma grande variedade de compostos que atuam de várias formas, interferindo nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celulares. Apesar do desenvolvimento dirigido no sentido de torná-los capazes de ação seletiva sobre os tecidos neoplásicos, os agentes atualmente disponíveis manifestam toxicidade significativa sobre os tecidos normais como maior complicação do seu uso, devendo-se

considerar criteriosamente o risco *versus* benefício quando se usam esses agentes (BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

Alguns estudos recentes relatam o desenvolvimento de várias classes de fármacos com mecanismos de ação definidos, que incluem agentes indutores da diferenciação (DRUMEA et al., 2008), agentes antimetastáticos (PÉREZ; DANISHEFSKY, 2007), agentes antiangiogênicos (KHOSRAVI-SHAHI; FERNÁNDEZ-PINEDA, 2008). Muitas pesquisas também têm sido focadas para os modificadores da resposta biológica, que alteram as reações metabólicas e imunológicas entre o tumor e o hospedeiro (FRAZER et al., 2007).

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

Dentre as novas classes de fármacos em estudo para tratamento do câncer estão os inibidores das histonas deacetilase (iHDAC), inibidores da 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) e agonistas do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR γ).

Neste trabalho foram avaliados o potencial antitumoral e os efeitos toxicológicos, em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, do ácido valpróico (inibidor de histonas deacetilases), da atorvastatina (inibidor da HMG-CoA redutase), e da pioglitazona (agonista do PPAR γ) isoladamente e em combinação.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS:

2.1. Geral

Avaliar o potencial antitumoral e os efeitos toxicológicos do ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona isoladamente e em associação.

2.2. Específicos

- Determinar o efeito citotóxico dos fármacos isolados e em combinação em linhagens de células tumorais humanas e murina.
- Determinar o efeito dos fármacos isolados e associados no crescimento do carcinoma de Ehrlich *in vivo*.
- Avaliar os efeitos induzidos pelo tratamento com os fármacos isolados e em combinação na massa corpórea e peso dos órgãos.
- Avaliar o efeito dos fármacos isolados e em combinação nos parâmetros hematológicos *in vivo*.
- Avaliar a toxicidade *em* órgãos vitais induzida pelo tratamento com os fármacos isolados e associados através da análise anatomopatológica e histopatológica.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Inibidores das histonas deacetilase

Inicialmente, as proteínas histonas foram consideradas componentes meramente estruturais, que reúnem uma grande quantidade de DNA genômico em uma estrutura que pode ser facilmente acomodada pelo núcleo das células. Entretanto, atualmente, são reconhecidas pelo seu envolvimento na manutenção do equilíbrio dinâmico da cromatina. Existem cinco tipos de histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4), H3-H4 e H2A-H2B formam dois dímeros que compõem o octâmero central do nucleossomo. H1 é também conhecida como histona ligante, pois são necessárias para formação dos complexos histona-DNA, além disso, juntamente com outras proteínas não histonas estão envolvidas na estruturação e organização da cromatina (MARGERON et al., 2005).

As caudas N-terminal das histonas estão sujeitas a uma rica variedade de modificações por ligações covalentes pós-traducionais (PETERSON; LANIEL, 2005; MERSFELDER; PARTHUN, 2006). A descoberta dessas modificações aconteceu no início da década de 60, quando pesquisadores notaram a correlação entre a acetilação das histonas aumentada e o aumento da transcrição (ALLFREY; FAULKNER; MIRSKY, 1964). Essas modificações afetam a função dos cromossomos através de dois mecanismos distintos. Primeiro: aproximadamente, todas as modificações alteram a carga eletrostática das histonas e isso, a princípio, pode mudar propriedades estruturais das histonas e ligantes do DNA (LIZUKA; SMITH, 2003; COSTELLOE, et al., 2006) Segundo: tais modificações podem criar, estabilizar, romper ou ocluir domínios de interação na cromatina para proteínas regulatórias, como fatores de transcrição, proteínas envolvidas na condensação da cromatina e reparo do DNA (ROSA; CALDAS, 2005; HAKE; XIAO; ALLIS, 2004). Assim, constituem a principal categoria de controle transcricional epigenético (GALM; HERMAN; BAYLIN, 2006).

Algumas modificações nas caudas das histonas estão associadas a genes ativos (acetilação), enquanto outras estão associadas tanto a genes ativos como a

genes silenciosos (metilação) (LIZUKA; SMITH, 2003; MELLOR, 2006). A posição das modificações também está associada às funções, por exemplo, a metilação nas lisinas 4, 36 e 79 da histona H3 (H3) está associada a genes ativos, enquanto nas lisinas 9 e 27 está associada a genes silenciosos (MELLOR, 2006).

A acetilação, modificação mais extensivamente estudada, é controlada por duas famílias de enzimas: as histonas acetiltransferases (HAT) e as histonas deacetilases (HDAC). O desequilíbrio da acetilação e desacetilação das histonas em regiões promotoras contribui para a desregulação da expressão gênica e tem sido associado à carcinogênese e à progressão do câncer (KOUZARIDES, 1999; LEHRMANN et al., 2002). Tanto histonas acetiltransferases (HAT) quanto histonas deacetilases (HDAC) possuem importante papel na regulação da expressão gênica através da modificação da cromatina. Histonas acetiltransferases transferem grupos acetil para resíduos de lisina aminoterminal nas histonas, que resulta na expansão local da cromatina e no aumento da acessibilidade de proteínas regulatórias do DNA. Entretanto, HDAC catalisam a remoção de grupos acetil, levando à condensação da cromatina e repressão transcricional (ROTH et al., 2001; THIAGALINGAM et al., 2003).

As histonas deacetilases têm sido divididas em quatro classes diferentes, e estão sendo minuciosamente estudadas devido a dois motivos principais: primeiro, elas têm sido relacionadas com a patogênese do câncer, assim como de várias outras doenças; segundo, pequenas moléculas inibidoras das HDAC (iHDAC) possuem a capacidade de interferir com a atividade destas enzimas e podem, portanto, atingir efeitos biológicos significantes em modelos pré-clínicos de câncer (MINUCCI; PELICCI, 2006).

Inibidores das histonas deacetilases (iHDAC) têm emergido como uma nova classe de agentes anticâncer. Estes iHDAC têm demonstrado atividades contra diversos tipos de câncer e notáveis efeitos na proliferação de células tumorais, na morte celular programada e na diferenciação e angiogênese tumoral *in vitro* e *in vivo* (JOHNSTONE; LICHT, 2003). Alguns inibidores dessa enzima demonstraram potencial terapêutico, em fases iniciais de testes clínicos para malignidades hematológicas como linfoma cutâneo de células T, síndromes mielodisplásicas e linfoma difuso de células (MARKS; JIANG, 2005; JABBOUR; GILES, 2005). A

diferenciação e a morte celular são os principais efeitos induzidos pelos iHDAC, em células tumorais, esses efeitos são variáveis de acordo com o tipo de histona deacetilase e a dose do inibidor administrada (Figura 1) (BOTRUGNO; SANTORO; MINUCCI, 2009).

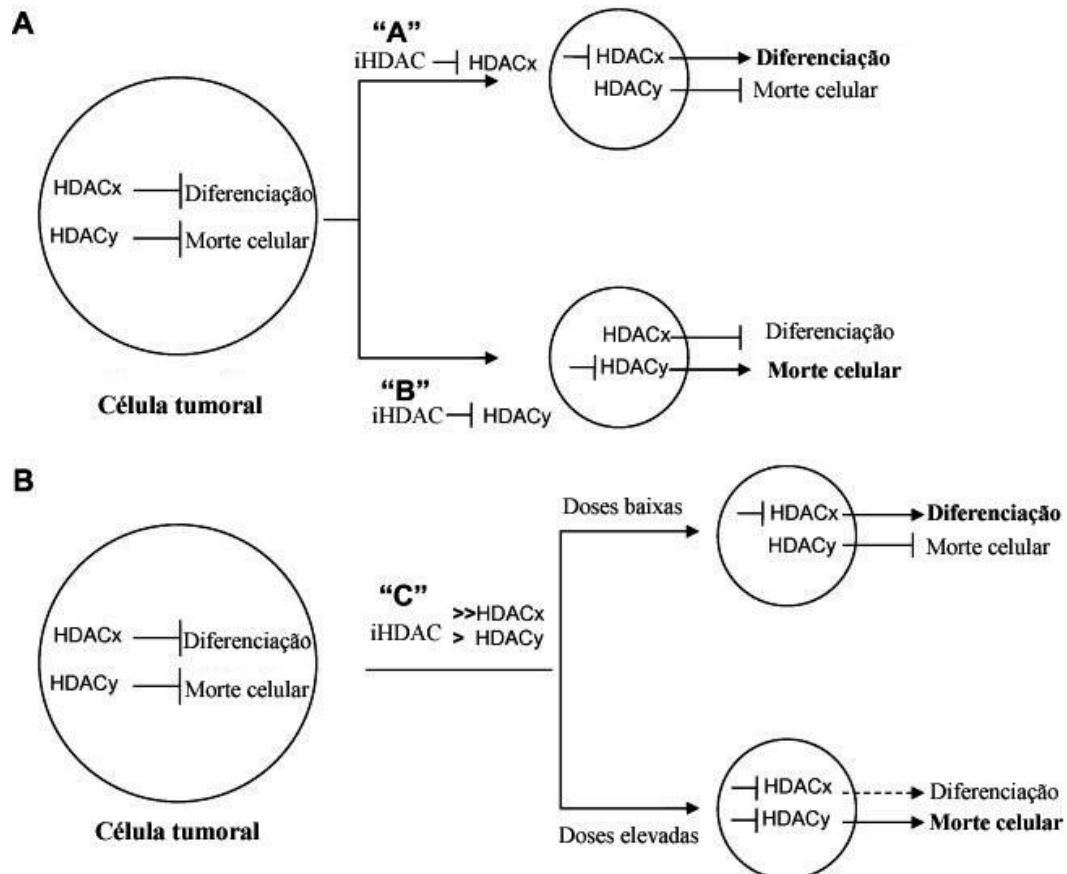


FIGURA 1. Modelo especulativo sobre os diferentes mecanismos de ação dos inibidores de histonas deacetilase (adaptado de: BOTRUGNO; SANTORO; MINUCCI, 2009)

Os principais efeitos anticâncer dos inibidores das histonas deacetilase estão correlacionados com mecanismos dependentes e independentes de transcrição ligados a proteínas histonas e não-histonas. O efeito predominantemente demonstrado em células tumorais pelos iHDAC é a apoptose, recentemente foi descrito que a morte celular provocada por essa classe de agentes também pode ocorrer por autofagia (BOLDEN; PEART; JOHNSTONE, 2006) (Figura 2).

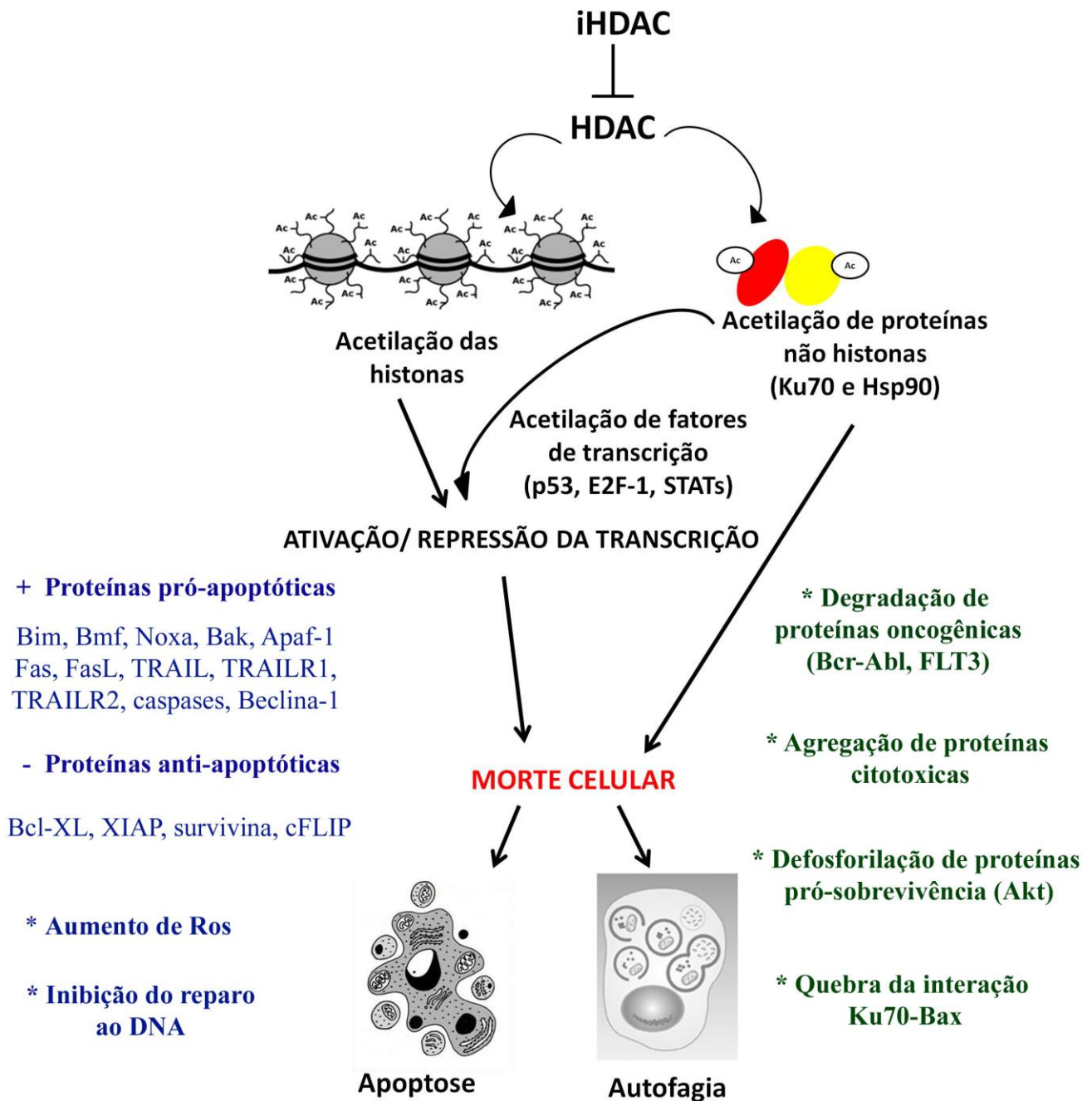


FIGURA 2. Bases moleculares da morte celular induzida por inibidores de histonas deacetilase

A hiperacetilação promove o relaxamento da cromatina e aumenta a acessibilidade dos complexos de transcrição de DNA, resultando em ativação e/ou repressão de genes. Muitos fatores de transcrição (incluindo p53, E2F-1 e transdutores de sinais e ativadores de transcrição - STATs) são diretamente acetilados durante o tratamento com iHDAC (BOLDEN; PEART; JOHNSTONE, 2006). A acetilação desses Fatores modula seletivamente a expressão de genes pró-apoptóticos e a diminuição da expressão de genes pró-sobrevivência, Além disso, iHDAC induzem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibem

os processos de reparo de DNA, para possivelmente iniciar ou reforçar a sinalização da apoptose em células tumorais (YUAN et al., 2005; YOO; JONES, 2006; LANE; CHABNER, 2009).

A acetilação das proteínas não-histonas pode promover a indução de apoptose independentemente da expressão gênica, pela modulação das interações entre proteínas e regulando indiretamente a estabilidade e função de proteínas oncogênicas. Por exemplo, a hiperacetilação provocada por iHDAC na proteína Ku70, que atua como um regulador no DNA, promove a dissociação dos complexos Ku70-Bax, permitindo que o pró-apoptótico Bax pertencente a família de proteínas Bcl-2 seja translocado para a mitocôndria, provocando apoptose pela via intrínseca. A hiperacetilação da chaperona Hsp90 promove a desnaturação de proteínas Hsp90-dependentes, muitas delas são necessárias para proliferação e sobrevivência de células tumorais, incluindo a tirosina quinase Bcr-Abl e o receptor FLT3. Os iHDAC podem também promover a formação de agregados de proteínas citotóxicas através da inibição da histona deacetilase 6 (HDAC6), cuja atividade é necessária no transporte de proteínas degradadas para os agressomos (INSINGA et al., 2005; NEWBOLD et al., 2008; PARMIGIANI et al., 2008).

Embora o principal mecanismo de ação relacionado aos iHDAC seja a apoptose, muitos autores corroboram com a hipótese de que essa classe de moléculas está envolvida em uma grande multiplicidade de efeitos (Figura 3), podendo desencadear diferentes mecanismos supressores ao desenvolvimento do câncer (DEROANNE et al., 2002; ROSATO et al., 2003; SHAO et al., 2004; SUTHEESOPHON et al., 2005).

O ácido valpróico (VPA) (FIGURA 4) é um ácido graxo com propriedades anticonvulsivantes utilizados no tratamento da epilepsia. O VPA inibe a enzima GABA-transaminase, que funciona catabolizando o ácido gama-aminobutírico (GABA). A atividade anticonvulsivante da droga está relacionada ao aumento das concentrações cerebrais de GABA e a inibição dos canais de sódio. Tem sido demonstrado também que o ácido valpróico é um inibidor das histonas deacetilase do tipo 1 (HDAC1). HDAC1 Tem relação direta com o desenvolvimento do câncer e também com os mecanismos de infecção do HIV (LEHRMAN et al., 2005; ROSENBERG, 2007).

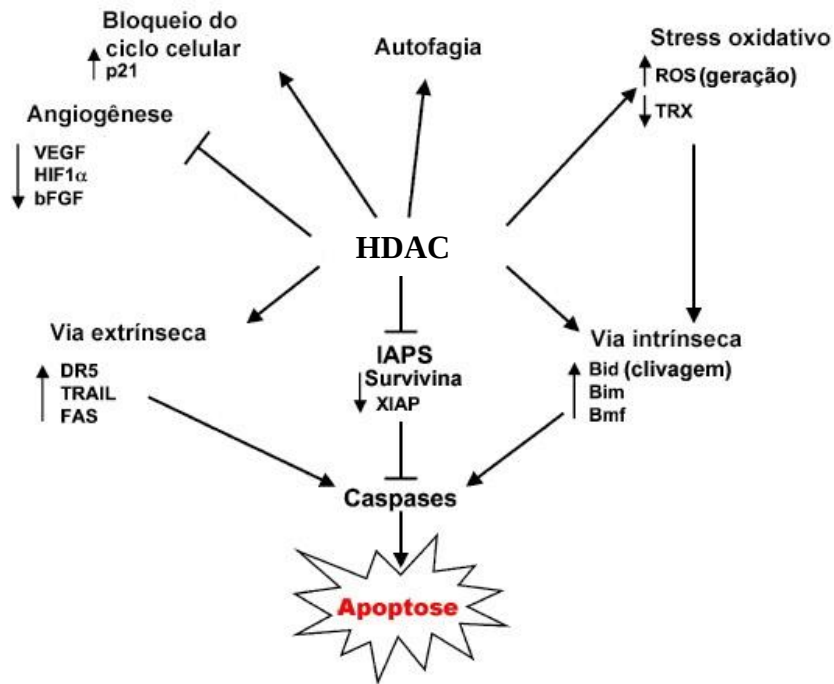


FIGURA 3. Mecanismos induzidos por inibidores das histonas deacetilase (Adptado de: CAREW; GILES; NAWROCKI, 2008)

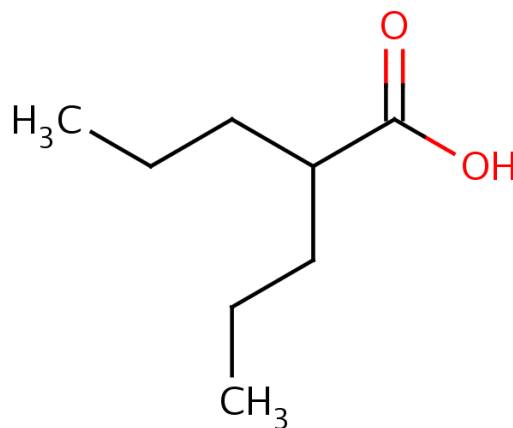


FIGURA 4. Estrutura química do ácido valpróico

Vários estudos demonstraram a eficácia do VPA em muitos modelos experimentais despertando boas perspectivas quanto a sua utilização para o tratamento do câncer. Um trabalho recente mostrou que o ácido valpróico conseguiu diminuir a proliferação celular e síntese de DNA de forma dose-dependente e induziu bloqueio na fase G1 em duas linhagens de células tumorais de bexiga humana (HTB5 e HTB9). A análise das proteínas relacionadas aos mecanismos anticancerígenos mostrou aumento da expressão de p21 e diminuição na expressão de ciclina D, apoiando o efeito regulador do ácido valpróico no ciclo celular (BYUN et

al., 2009).

Algumas pesquisas comprovaram que o VPA também pode ser eficaz em associação com outros fármacos para o tratamento de malignidades. Um estudo realizado por Chavez-Blanco et al, (2006), mostrou a ação antitumoral do ácido valpróico combinado com Hidralazina nas concentrações de 1 mM e 10 μ M respectivamente. A combinação das drogas diminuiu o crescimento celular nas linhagens de carcinoma cervical humano (HeLa), adenocarcinoma de mama (MCF-7), sarcoma humano (HT-1080), carcinoma laringeal (KB), câncer do colo do útero (SW480) e glioma (D54). O Potencial antitumoral dessa combinação de drogas deve-se respectivamente a inibição das enzimas histonas deacetilases e metiltransferase.

Nos últimos anos o ácido valpróico apontou como uma droga promissora para o tratamento do câncer. VPA mostrou potentes efeitos antitumorais in vitro e in vivo em uma grande variedade de linhagens de células tumorais. Esses resultados puderam ser observados tanto com o uso de VPA isoladamente como em combinação. Dados pré-clínicos sugerem que o ácido valpróico poderia ser uma droga eventualmente utilizada em combinações terapêuticas, quer com agentes citotóxicos clássicos ou com drogas alvo-específicas e também em associação com a radioterapia em vários tipos de tumores sólidos (DUENAS-GONZALEZ et al., 2007).

3.2 Estatinas

A síntese do colesterol no fígado tem como matéria prima de partida uma molécula de acetil coenzima A (Ac-CoA) e envolve mais de 20 reações enzimáticas. Um desses caminhos é regulado por uma enzima chamada 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG CoA redutase) que cataliza a transformação do HMG CoA em mevalonato, precursor do colesterol. Para o colesterol passar para o sangue e dele aos tecidos precisa se ligar a lipoproteínas que servem de transporte (VLDL, IDL, LDL e HDL). Sabe-se que a lipoproteína carreadora de colesterol plasmático com a qual se deve ter mais cuidado com relação a problemas de saúde

é a LDL-C, pois, quando se eleva acima dos limites normais (desejáveis <130 mg/dl, limítrofes 130-159 mg/dl e aumentados $\geq$ 160 mg/dl) pode vir associada a fatores de risco e merece, portanto, intervenção medicamentosa. Os inibidores de HMG CoA redutase além de diminuírem a síntese de colesterol, também aumentam a ativação hepática de receptores para LDL, tornando a remoção do colesterol sanguíneo mais eficiente (SHEPHERD; COBBE, 1995; VAUGHAN et al., 2000).

As estatinas são os fármacos mais usados para tratamento das hiperlipidemias em prevenção primária e secundária, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de doença arterial coronariana (DAC). Estas substâncias, capazes de mimetizar o substrato natural, podem ser divididas em naturais e sintéticas diferindo fundamentalmente em termos de potência, perfil farmacocinético, interação farmacológica e efeito indesejado relacionado à miotoxicidade (CAMPO; CARVALHO, 2007).

Mevastatina (ou compactina) foi o primeiro inibidor de HMG-CoA redutase, descoberto em 1976, originalmente isolado como produto metabólico de culturas de *Penicillium citrinum*, sendo sua afinidade pelo sítio enzimático cerca de 10.000 vezes superior ao substrato HMG-CoA. Por outro lado, lovastatina (ou mevinolina) foi isolada posteriormente de culturas de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* com estrutura semelhante à mevastatina (grupo 6'-metílico adicional), mas com potência superior. Em 1987 lovastatina foi aprovada pelo FDA para uso terapêutico, enquanto mevastatina foi abandonada devido a indução de problemas na morfologia intestinal de cachorros e toxicidade hepatocelular verificada em ratos (LIAO & LAUFS, 2005).

A introdução de novos derivados sintéticos da classe das estatinas ocorreu em 1996 e 1997, com atorvastatina (Lipitor) e cerivastatina (Baycon), respectivamente. No entanto, em agosto de 2001, a Bayer retirou cerivastatina do mercado devido à incidência de mais de 100 casos de rabdomiólise fatal, relacionados a dano severo da musculatura esquelética com alteração das células musculares, liberação de mioglobina e, frequentemente, acompanhado de problemas renais (WIERZBICKI et al., 2003). A maioria dos casos foi observada em tratamentos com doses excessivas de cerivastatina ou em doses normais associadas ao uso de genfibrosil, fármaco da classe dos fibratos empregados no tratamento das hipertrigliceridemias (BAKRI et al., 2003).

A atorvastatina é uma das estatinas mais usadas atualmente no tratamento das hiperlipidemias. Esse fármaco atua reduzindo a quantidade de colesterol produzida, e por sua vez, a quantidade total de colesterol LDL. A atorvastatina é rapidamente absorvida após administração oral e sua biodisponibilidade absoluta é de aproximadamente 14%. A atividade inibitória sobre a HMG-CoA redutase é de aproximadamente 30% (MAGGON, 2005).

No momento, seis estatinas são empregadas clinicamente (Figuras 5 e 6): lovastatina (Mevacor)[®], pravastatina (Pravachol)[®], sinvastatina (Zocor)[®], derivado semi-sintético, e fluvastatina (Lescol)[®], primeiro agente totalmente sintético, derivado de mevalonolactona produzido na forma racêmica (WERMUTH, 1996). A nova geração de estatinas sintéticas, enantiomericamente puras, é representada por atorvastatina (Lipitor)[®] e rosuvastatina (Crestor)[®].

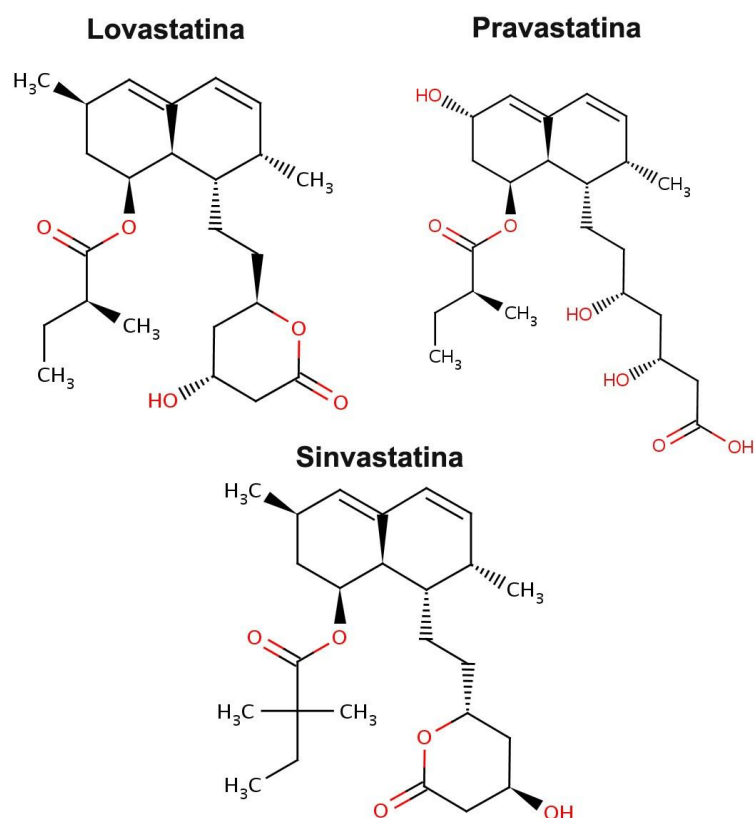


FIGURA 5. Estrutura química das estatinas naturais

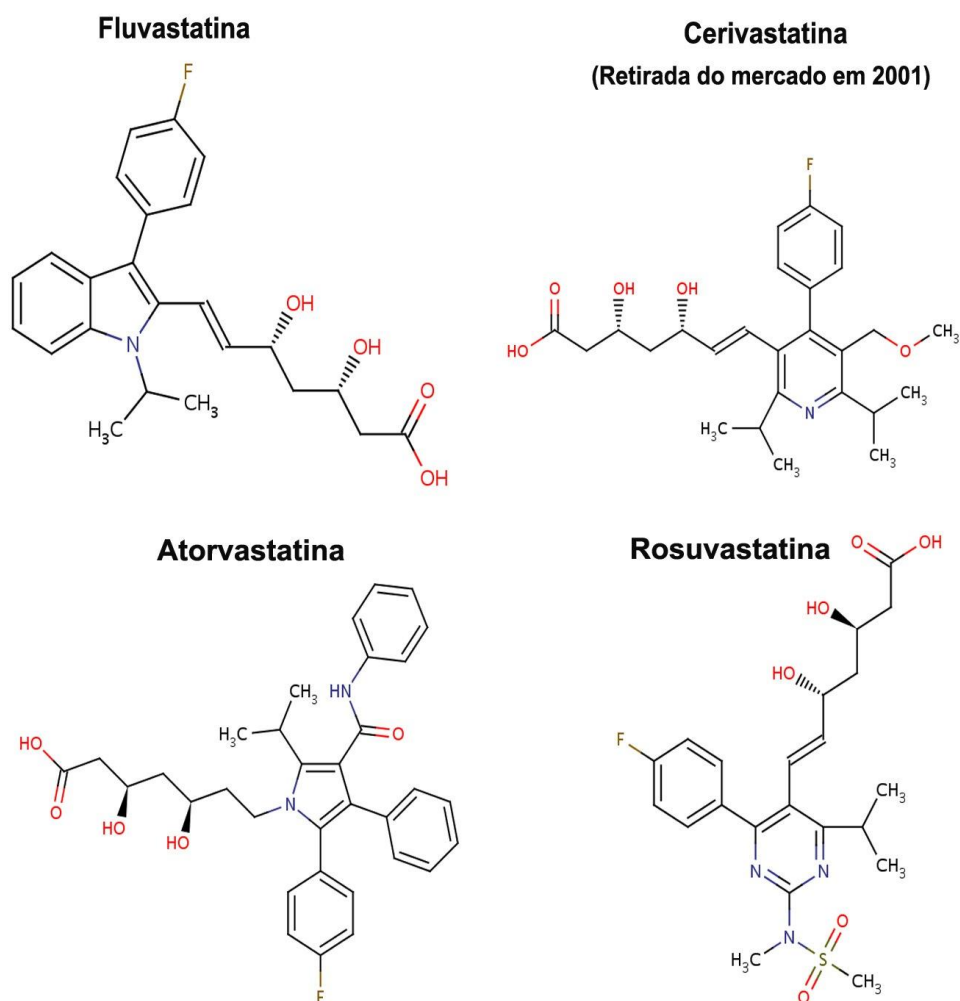


FIGURA 6. Estrutura química das estatinas sintéticas

As estatinas possuem um mecanismo de ação semelhante, embora possuam diferenças no seu potencial de redução do colesterol plasmático, sua solubilidade e metabolismo (DANSETTE, 2000). Mais recentemente diversos dados da mostraram que as estatinas não só promovem diminuição de LDL-colesterol e aumento de HDL-colesterol, como também conduzem à diminuição dos níveis de triglicerídeos (WIERZBICKI et al., 2003; BAKRI et al., 2003). De forma geral, as estatinas causam redução dos níveis de triglicerídeos, mas este efeito parece ser observado apenas em pacientes hipertrigliceridêmicos. Os valores praticamente constantes obtidos da relação triglicerídeos/LDL-colesterol, nestes estudos, mostram que quanto maior a atividade da estatina em diminuir o LDL-colesterol, maior é o efeito na diminuição dos níveis de triglicerídeos (JAKÓBISIAK; GOLAB, 2003; STAAL et al., 2003).

Lovastatina, pravastatina e, mais recentemente, sinvastatina apresentaram atividade antiaterogênica, relacionada à melhora da disfunção endotelial e vasomotora, diminuição da formação de trombos plaquetários e modulação na atividade fibrinolítica em pacientes hipercolesterolêmicos. Estes efeitos contribuem para redução de quadros de isquemia do miocárdio e incidência de infarto, com conseqüente diminuição do índice de mortalidade total causado por doenças cardiovasculares (SHEPHERD, 2001). São relatados também alguns efeitos pleiotrópicos, como à proteção endotelial, à redução da peroxidação lipídica, controle da reação inflamatória e da hemostasia (BELLOSTA et al., 1998; DANGAS et al., 1999).

Investigações recentes têm mostrado diversos efeitos importantes das estatinas, como ação antineoplásica (JAKÓBISIAK; GOLAB, 2003), inibição da reabsorção óssea (STAAL et al., 2003), aumento da disponibilidade de óxido nítrico endotelial, relaxamento da musculatura vascular, atenuação da hipertrofia do miócito cardíaco induzida pelo endotélio, inibição da proliferação de células endoteliais induzidas por fatores angiogênicos, diminuição dos níveis de IL-6, citocina pró-inflamatória liberada pelo tecido adiposo (LIAO & LAUFS, 2005; PANNACCIULLI & TATARANNI, 2007).

As estatinas têm sido relacionadas às propriedades de inibição de proliferação e indução de apoptose em uma grande variedade de células tumorais, sendo desencadeados efeitos antitumorais em vários tipos celulares incluindo melanoma, carcinoma mamário, adenocarcinoma pancreático, fibrosarcoma, glioma, neuroblastoma e linfoma, resultando em retardamento de crescimento tumoral e inibição de processos metastáticos. Em estudos pré-clínicos, as estatinas têm demonstrado a capacidade de potencializar os efeitos antitumorais de algumas citocinas e quimioterápicos (JAKÓBISIAK; GOLAB, 2003).

Lovastatina é a estatina mais estudada no que se refere a potenciais efeitos antitumorais, tendo sido capaz de exercer atividade antiproliferativa contra uma variedade de tumores, incluindo câncer de mama, próstata, estômago, pulmão, pâncreas, bexiga, adenocarcinoma de cólon, neuroblastoma, melanoma e células de leucemia mielóide aguda (NEWMAN et al., 1997). Efeitos citostáticos contra células tumorais também têm sido observados com o uso de pravastatina, sinvastatina,

fluvastatina e cerivastatina. Lovastatina e outras estatinas também inibiram o crescimento de várias células normais e linhagens de células não transformadas, incluindo células de músculo liso, mioblastos de músculo estriado, células endoteliais, fibroblastos, células do epitélio alveolar e linfócitos B (MURAKAMI et al., 2001). Fluvastatina e cerivastatina suprimiram a invasão de algumas células tumorais humanas e foram capazes de inibir metástase de células de melanoma, carcinoma mamário e adenocarcinoma de cólon, em ratos (DENOYELLE et al., 2001; SASSANO; PLATANIAS, 2008).

O efeito antiproliferativo em células tumorais induzido pelos inibidores da HMG-CoA redutase, parece estar relacionada à inibição da síntese de dolicol, geranilpirofosfato (GPP) e farnesilpirofosfato (FPP), os quais são subprodutos da via de síntese do mevalonato (Figura 7).

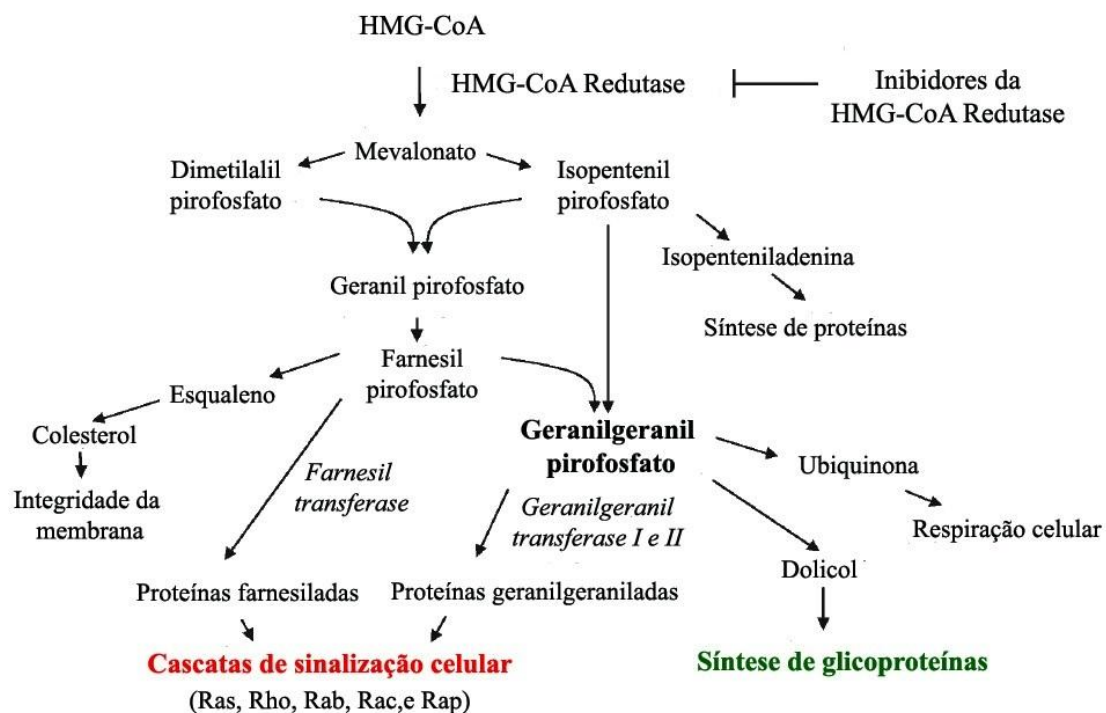


FIGURA 7. Efeito dos inibidores da HMG-CoA redutase na via do mevalonato

Dolicol exerce efeito estimulatório na síntese de DNA e está ligado a várias proteínas relacionadas a tumores. GPP e FPP são necessários à isoprenilação de várias GTPases que atuam regulando a transdução de sinal de vários receptores de membrana e levam à expressão de genes relacionados à proliferação, à

diferenciação ou à apoptose (DEMIERRE et al, 2005). Alguns estudos usando diferentes linhagens de células cancerígenas demonstraram a efetividade das estatinas por suspensão da divisão celular durante a fase G1, G2 e mitose (GHOSH et al., 1999; WANG & MACAULEY, 1999; PARK et al., 2001; SCHMIDT et al., 2001). De acordo com Graaf et al,(2004) os mecanismos de ação das estatinas pode variar de acordo com a linhagem celular, essa classe de fármacos também foi capaz de potencializar a atividade antitumoral de determinados quimioterápicos em uma grande variedade de modelos tumorais experimentais.

3.3. Tiazolidinedionas (TZDs)

As Tiazolidinedionas (TZDs), também conhecidas por glitazonas, caracterizam-se predominantemente pela ação na diminuição da resistência periférica à insulina. As TZDs foram aprovadas para uso clínico em 1997, quando a Troglitazona (Figura 8), o protótipo da classe, entrou para o mercado. Em 1999, foram aprovadas para uso também a Pioglitazona e a Rosiglitazona (Figura 8). Essa classe de fármacos atua estimulando seletivamente os receptores dos proliferadores peroxissomais gama (PPAR γ). Ela age em tecidos-alvo para a insulina, tais como tecido adiposo, músculo esquelético e fígado. A ativação do receptor PPAR γ regula a transcrição de genes envolvidos no controle da produção, transporte e utilização de glicose (PADDOCK et al., 2007).

Os receptores dos proliferadores peroxissomais (PPARs) foram identificados inicialmente em roedores na década de 90, e desde então suas propriedades fisiológicas vêm sendo pesquisadas (KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005). A designação do nome PPAR se deve ao fato da ativação do PPAR α , primeiro receptor descoberto, mas não de PPAR β/δ e γ , promover a proliferação de peroxissomos em hepatócitos de roedores (MURPHY; HOLDER, 2000). Os peroxissomos são organelas responsáveis por reações de oxidação ligadas ao metabolismo energético e sua propagação tem resultado em hepatomegalia e carcinogênese em roedores, porém esses efeitos não foram observados em humanos (EVANS; BARISH; WANG, 2004).

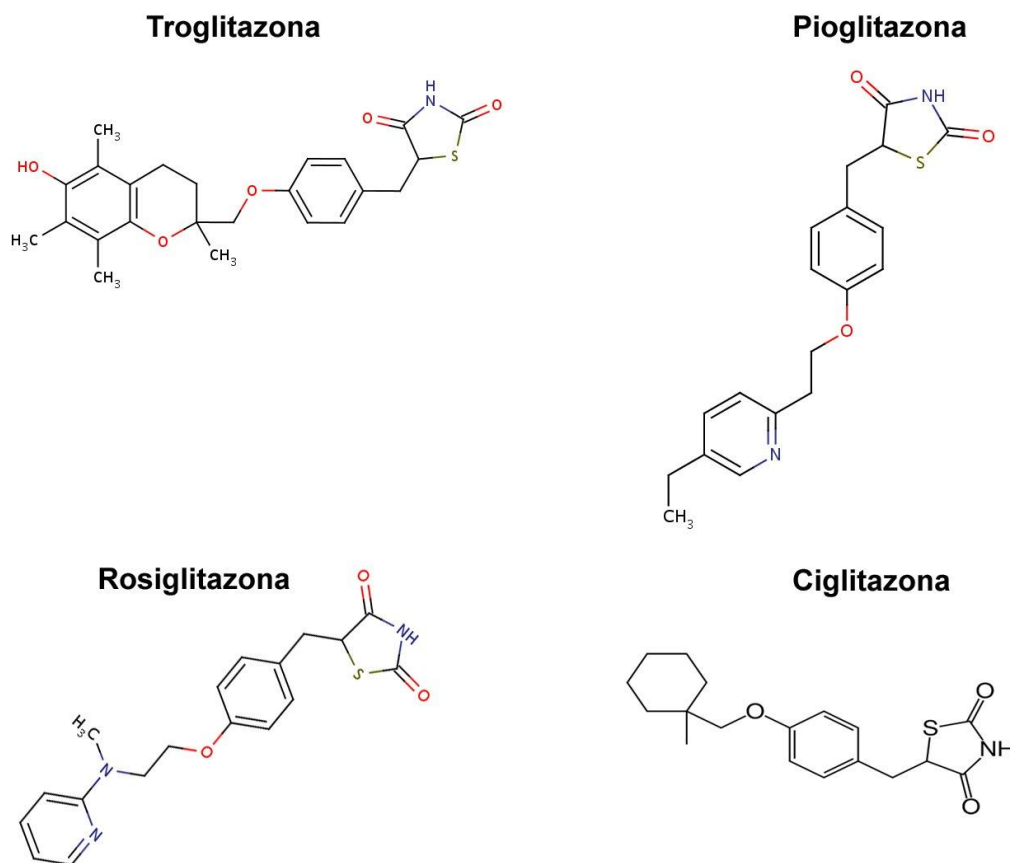


FIGURA 8. Principais Tiazolidinedionas

Na família dos PPARs, três subtipos com significativa homologia de sequência de aminoácidos e codificados por genes diferentes já foram caracterizados, sendo estes o PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) e PPAR γ (NR1C3). Os três subtipos de receptores estão presentes na maioria dos tecidos, embora apresentem padrões de expressão tecidual isotipo específica, sendo assim, expressos de forma desigual entre os diferentes órgãos (CUZZOCREA, 2006).

Os resultados de diversos estudos mostraram que os PPARs são considerados como sensores metabólicos, e de acordo com os sinais lipídicos, atuam na expressão gênica de modo a promover ações adaptativas relacionadas à homeostase lipídica e energética, atuando especialmente na oxidação de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos e sensibilidade à insulina (FEIGE et al., 2006; YU; REDDY, 2007). Além das ações metabólicas, têm sido demonstrados importantes efeitos em diversos processos fisiológicos, tais como no desenvolvimento e diferenciação celular e em processos inflamatórios (STRAUS; GLASS, 2007; YU; REDDY, 2007).

A variedade de ações que os PPARs exercem é reflexo da inúmera diversidade de ligantes que podem ser acomodados dentro de suas bolsas de ligação. Os ligantes naturais de PPARs incluem ácidos graxos saturados e insaturados, que podem servir ainda de substratos enzimáticos para geração de seus derivados com atividade agonista sobre esses receptores, tais como prostaglandinas e leucotrienos. A produção dos ligantes naturais pode ser influenciada tanto por condições fisiológicas (alimentação, privação de alimentos e exercício) quanto por condições patofisiológicas (inflamação crônica, diabetes, aterosclerose, câncer) (BERGER; MOLLER, 2002; FEIGE et al., 2006; MICHALIK et al., 2006).

O PPAR γ é o PPAR mais estudado. Foram identificadas duas isoformas do PPAR γ , PPAR γ 1 e PPAR γ 2, que são geradas pelo mesmo gene, porém por promotores distintos e mecanismos de splicing alternativo. Elas diferem entre si apenas em seus domínios A/B na região amino-terminal, na qual o PPAR γ 2 contém 30 aminoácidos adicionais (TONTONAZ, et al., 1994; YU et al., 2007). O PPAR γ foi originalmente descrito como tendo uma função primária na diferenciação de adipócitos, sendo ainda hoje considerado como um elemento essencial nesse processo. Posteriormente, com o avanço nos estudos a respeito de suas funções biológicas, foram atribuídas outras ações importantes ao PPAR γ , tais como em processos inflamatórios, na sensibilização à insulina, no metabolismo lipídico, aterosclerose, controle de ciclo celular, apoptose e proliferação celular (COHEN, 2006).

O PPAR γ está expresso em vários tecidos de mamíferos adultos em níveis muito baixos. O PPAR γ 1 está expresso em níveis elevados no tecido adiposo, intestino grosso e células hematopoiéticas, enquanto sua expressão é baixa nos rins, fígado, musculatura lisa e esquelética, intestino delgado e pâncreas. O PPAR γ influencia a estocagem de ácidos graxos (AG) no tecido adiposo e contribui para a diferenciação de adipócitos (ROSEN, 1999). A maior parte dos genes-alvo do PPAR γ em adipócitos está diretamente implicada na lipogênese, incluindo a lipoproteína lipase (LPL), proteína que se liga a AG em adipócitos, a acil-CoA sintase e a proteína transportadora de AG (FATP) (ROSEN, 1999; KAHN; FLIER, 2000).

O PPAR γ expresso em monócitos e macrófagos vem sendo considerado como o regulador de algumas funções destas células. Em macrófagos, por exemplo, o PPAR γ regula negativamente a transcrição de interleucina 1 β (IL-1 β), IL6, fator de necrose tumoral α (TNF α), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) (BRAISSANT et al., 1995; TONTONNOZ et al. 1998; ROSEN; SPIEGELMAN, 2001; STIENSTRA et al., 2007).

O primeiro ligante natural de PPAR γ descoberto foi a 15-deoxi-prostagladinaJ2 (15d-PGJ2), que se liga de maneira irreversível ao receptor. Em seguida, outras substâncias lipofílicas endógenas também exibiram ação agonista sobre este receptor, tais como eicosanóides e ácidos graxos poli-insaturados, embora eles apresentem baixa afinidade. Recentemente, o ácido graxo derivado do ácido nitrolinoléico (LNO2), o qual é produzido a partir de reações inflamatórias oxidativas dependentes de óxido nítrico, foi identificado como um novo agonista, sendo considerado até o momento um dos mais potentes ligantes naturais de PPAR γ . O PPAR γ possui uma bolsa de ligação capaz de acomodar ligantes lipofílicos compostos por grupos químicos diversos, tais como as TZDs, que se ligam tanto ao PPAR γ quanto ao PPAR α (DUBOQUOY et al., 2006).

Com relação ao câncer tanto os PPARs como os ácidos graxos estão implicados na regulação do ciclo celular, diferenciação e apoptose (ROSEN; SPIEGELMAN, 2001). A observação de que PPAR γ é expresso em carcinomas de cólon, de próstata, e de mama, nos quais dietas ricas em gorduras são fatores de risco, sugere que eles desempenhem papel importante na regulação do crescimento desses tipos tumorais (SEGAWA et al. 2002). Várias pesquisas demonstraram o efeito dos agonistas do PPAR γ na indução da diferenciação de células de lipossarcoma, sugerindo mais uma vez o envolvimento deste receptor na regulação do crescimento dos carcinomas. Além disso, as propriedades na indução de apoptose e de diferenciação celular do PPAR γ propiciam efeitos benéficos importantes nos tratamentos de diferentes tumores, incluindo carcinomas de mama, cólon, próstata, pâncreas, câncer das vias biliares, hipófise e gástricos, tanto nos tratamentos in vivo como in vitro (KOEFFLER, 2003; HEANEY, 2004).

Após a ativação por ligantes sintéticos como as TZDs, ou ligantes endógenos, o PPAR γ forma um heterodímero com o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR) e se liga a regiões específicas no DNA de genes alvo (Figura 9). Esse complexo pode induzir células tumorais a entrarem em apoptose pelo aumento dos níveis das proteínas pró-apoptóticas, p53, BAD e fosfatase homóloga à tensina (PTEN) e a diminuição nos níveis de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-x e survivina (Figura 10) (Yang, et al, 2005; Li, et al, 2006).

O efeito antiproliferativo e de rediferenciação da troglitazona, um potente agonista do PPAR γ , foi estudado em seis linhagens de células tireoideanas cancerosas e promoveu inibição significativa do crescimento celular por parada do ciclo celular e apoptose (PARK et al. 2005). A droga RS-5444, que ativa a transcrição do PPAR γ de forma mais potente que as tiazolidinedionas, inibiu a proliferação de células indiferenciadas de tireóide, bem como a formação de colônias. Além disto, o RS544 e o Taxol demonstram atividade sinérgica anti-proliferativa em cultura de células (GREBE, 2005).

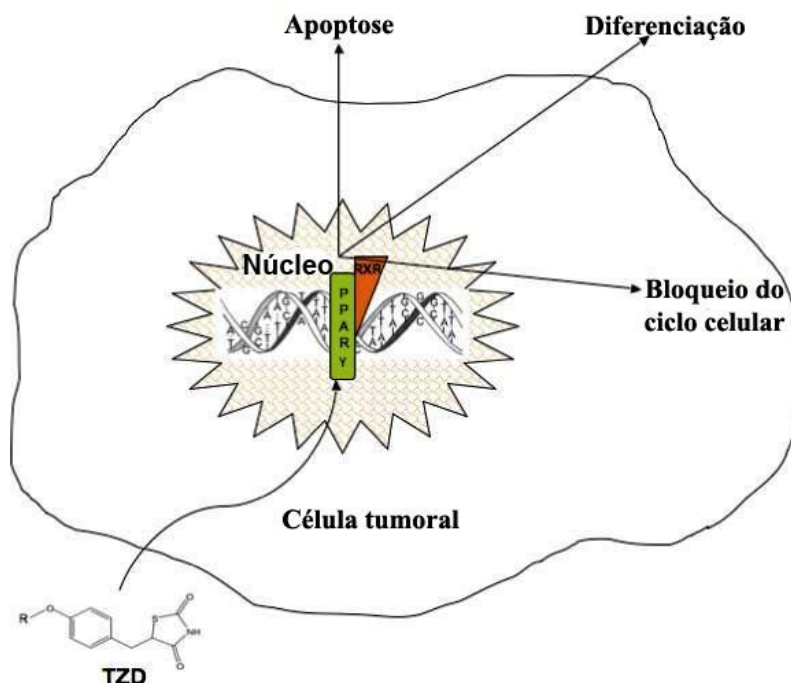


FIGURA 9. Tiazolidinedionas induzindo a ativação do PPAR γ em células cancerígenas (adaptado de: BLANQUICETT; ROMAN; MICHAEL, 2008)

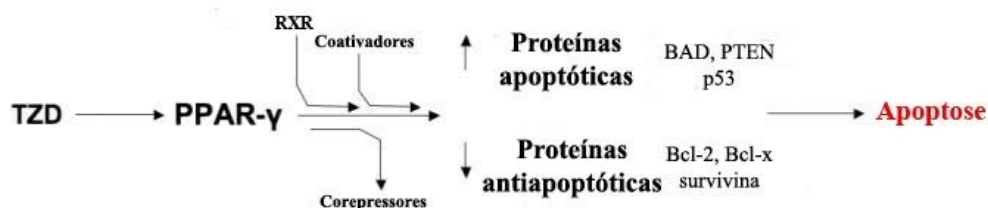


FIGURA 10. Mecanismos de apoptose induzidos por tiazolidinedionas

Muitas pesquisas apontam a apoptose como o principal mecanismo de ação em células tumorais relacionado às tiazolidinedionas. Um estudo utilizando a troglitazona mostrou que essa TZD foi capaz de inibir também a proliferação em linhagens de células derivadas de câncer de fígado humano (HepG2), via ativação de caspase 3, redução da expressão do gene BCL2 e aumento da expressão dos genes BAX e BAK (LI et al., 2003). Além disso, a indução de apoptose após ativação do PPAR γ foi observada em células tumorais de câncer de bexiga (GUAN, et al., 1999) de leucemia pró mielocítica (HIRASE, et al., 1999) de carcinoma de pulmão (SATO et al., 2002) e até mesmo em macrófagos (CHINETTI, et al., 1998).

Um efeito próapoptótico da Troglitazona foi demonstrado em células de músculo liso vascular, pela ativação de p53 e Gadd (OKURA, et al., 1999). Demonstrou-se, ainda, para este mesmo tipo celular, que tanto a Rosiglitazona (BERTHOLD, et al., 2001) quanto a Pioglitazona (RUIZ, et al., 2007) induziram a apoptose, sendo que para esta última, este efeito foi observado somente em condições supra-fisiológicas de glicose, muito provavelmente mediada pelo fator de crescimento transformante tipo 1 β (TGF-1 β). A maior parte dos estudos em cultura celular que demonstrou um efeito pró-apoptótico das TZDs utilizou doses elevadas destas drogas.

De acordo com Zhang et al, (2006) a proliferação das células de câncer de pulmão A549 foi significativamente inibida pela ciglitazona tanto in vivo quanto in vitro. Bocca et al, (2007), demonstrou que a ativação do PPAR γ tem um efeito anti-proliferativa em células de câncer de mama MCF7, além disso também foram observadas apoptose em células de câncer de próstata e melanoma (Nunez et al, 2006).

Embora um grande número de pesquisas descrevem os mecanismos de ação induzidos pelo tratamento com TZDs, a base molecular para a sua ação antitumoral permanece incompletamente elucidada. Sabe-se, a partir dos estudos já existentes, que a apoptose e a diferenciação celular são os principais mecanismos relacionados à ativação do PPAR γ em células cancerígenas (BLANQUICETT; ROMAN; MICHAEL, 2008).

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Fármacos

Atorvastatina foi obtida de LKT laboratories, Inc. O ácido valpróico e a doxorrubicina foram obtidos de Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA. A pioglitazona foi obtida de Takeda Pharmaceuticals , Inc.

4.1.2. Células

As linhagens de células humanas utilizadas foram: K562 (eritroleucemia), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão) e HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe) obtidas da seção de culturas celulares do Instituto Adolfo Lutz (SP) e mantidas de acordo com o protocolo estabelecido pelo laboratório de cultura de células do Departamento de Antibióticos da UFPE. As células de carcinoma de Ehrlich (adenocarcinoma mamário de camundongos) foram obtidas do Laboratório de Bioensaios para pesquisa de Fármacos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

As linhagens utilizadas foram mantidas em DMEM – Minimum Essencial Médium Eagle modificado Dulbecco's (Sigma Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.1.3. Animais Experimentais

Foram utilizados, no total, 72 camundongos albinos suíços (*Mus musculus*, machos, 25-30g), obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os animais foram abrigados em gaiolas com livre acesso à comida e água, mantidos sob ciclo claro-escuro de 12 h:

12 h e temperatura de 23°. Os animais foram tratados de acordo com as normas Internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS), seguindo também os princípios éticos do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).



FIGURA 11. Camundongos albinos suíços obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE (Foto: André Barros)

4.2. Métodos

4.2.1. Procedimentos éticos

Os procedimentos experimentais realizados nesta pesquisa foram avaliados de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Este mesmo protocolo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), número do processo 23076.002926/2009-06.

Esta etapa visou estabelecer a concordância entre o projeto e as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605- art. 32 e decreto 3.179- art. 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

4.2.2. Determinação do efeito dos fármacos isolados e em combinação em cultura de células tumorais humanas

A determinação das concentrações inibitórias médias (CI_{50}) das amostras foi realizada através do método colorimétrico do MTT (Figura 12) (Mosmann, 1983). As células tumorais (K562, NCI-H292 e HEP-2) foram semeadas (2×10^5 células x poço⁻¹) em placas de 96 poços (BD/Labware®). Em seguida as substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas em série no meio DMEM para obtenção das concentrações ($0,048 - 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e adicionadas em placas de 96 poços ($100 \mu\text{L}$. Poço⁻¹), doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após 72h de contato das células com os fármacos, isolados e em combinação, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados, em cada poço das placas de NCI-H292 e HEP-2, $25 \mu\text{L}$ de MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] (Sigma-Aldrich®) na concentração de 5 mg.mL^{-1} e para as placas de K562 foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de MTT na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. As placas foram deixadas por 3 horas em estufa 37°C e ao final desse período, o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT foram aspirados e em seguida, $150 \mu\text{L}$ de DMSO foi adicionado a cada poço para a dissolução dos cristais de Formazan. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Modelo 3550 BIO-RAD, Inc.) no comprimento de onda de 595 nm e o efeito das drogas foi quantificado pela comparação com a absorbância do grupo controle

4.2.3. Determinação do efeito dos fármacos isolados e em combinação em cultura de células de carcinoma de Ehrlich

Para o cultivo de células de carcinoma de Ehrlich, 1 ml do tumor ascítico foi aspirado de um animal portador e adicionado a 5 ml de Solução Salina Tamponada (PBS, pH= 7,2), em seguida essa solução foi centrifugada a 1000 rpm durante 10

minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado novamente em 5 ml de DMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM). Desta última solução foi retirada uma alíquota de 10 μ L que foram adicionados a 10 μ L de azul de tripan para verificação da viabilidade celular e quantificação da concentração de células.

A CI_{50} dos fármacos isolados e em combinação foi determinada através do método colorimétrico do MTT (Mosmann, 1983). As células tumorais da linhagem carcinoma de Ehrlich, previamente cultivadas, foram semeadas (2×10^5 células x poço⁻¹) em placas de 96 poços. Em seguida as substâncias dissolvidas em DMSO foram diluídas em série no meio DMEM para obtenção das concentrações finais e adicionadas em placas de 96 poços (100 μ L. Poço⁻¹), doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após 24 h de contato das células com os fármacos, isolados e em combinação, foi adicionado em cada poço, 10 μ L de MTT na concentração de 5 mg.mL⁻¹ e as placas foram deixadas por 4 horas em estufa 37 °C. Ao final desse período, o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT foi aspirado e em seguida, 100 μ L de DMSO foram adicionados a cada poço para a dissolução dos cristais de Formazan. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Modelo 3550 BIO-RAD, Inc.) no comprimento de onda de 595 nm e o efeito das drogas foi quantificado pela comparação com a absorbância do grupo controle.

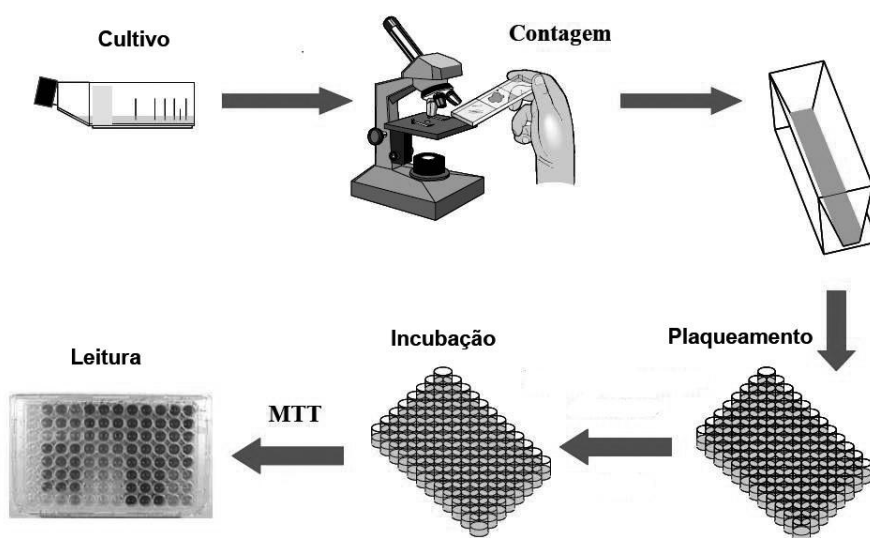


Figura 12. Esquema representativo do método MTT

4.2.4. Determinação do efeito dos fármacos isolados e em combinação no crescimento do carcinoma de Ehrlich *in vivo*

Para avaliação da atividade antitumoral, foram utilizados camundongos albinos suíços (machos, 25-30g), com faixa etária de 45 dias, separados em nove grupos de oito animais por gaiola. Foram utilizadas células tumorais malignas (Carcinoma de Ehrlich) de animais portadores do tumor ascítico com sete dias de implantação. Os animais doadores foram anestesiados para aspiração do líquido peritoneal contendo células tumorais. As células foram contadas em câmara de Neubauer e em seguida introduzidas nos animais receptores, por via subcutânea na região axilar direita, na concentração de 5×10^5 células.mL⁻¹ (Geran *et al.*, 1972). O tratamento foi feito pela via intraperitoneal e teve início 24 horas após o implante do tumor, continuando durante período de sete dias consecutivos. As doses dos fármacos na forma isolada e em combinação bem como o controle positivo podem ser observadas na Tabela 1. Para o controle negativo foi usado NaCl 0,9%. No nono dia, os camundongos foram eutanasiados e os tumores foram dissecados, pesados e fixados em formaldeído 10%. A taxa de inibição (%) foi calculada pela seguinte fórmula: taxa de inibição (%) = $[(A - B) / A] \times 100$, onde A é a média dos pesos dos tumores do controle negativo, e B é a média dos pesos dos tumores do grupo tratado (Bezerra *et al.*, 2007).

Tabela1. Doses dos fármacos e combinações utilizados em cada grupo testado em mg. kg⁻¹

4.2.5. Efeito dos fármacos isolados e em combinação na massa corpórea e peso dos órgãos

Os animais foram observados diariamente durante todo o estudo com a finalidade de verificar reações adversas e sinais de anormalidades. A massa corpórea foi medida no início e no final do tratamento. Os órgãos internos foram avaliados quanto à posição, forma, tamanhos e cor para que fosse descrito quaisquer sinais de lesões graves. Os rins, fígados e baços foram coletados, pesados e fixados em formaldeído 10%.

4.2.6. Análises morfológicas e histopatológicas

Foram analisados os tumores, fígados, baços e os rins do grupo controle e dos grupos que obtiveram resultados superiores a 50% de inibição tumoral no ensaio *in vivo*. Os tecidos foram fixados em solução de formalina a 10% e após 24 horas de imersão, foram submetidos à desidratação em soluções de concentração crescente de etanol, dois banhos de tolueno e incluídos em parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram desparafinados em tolueno e re-hidratados em soluções de concentração decrescente de etanol. Terminado o processamento, as preparações de cada tecido foram coradas pela técnica de Hematoxilina - Eosina (H.E) e montadas com Entellan. As análises histopatológicas das lâminas foram realizadas por microscopia de luz, para o reconhecimento de alterações atribuíveis aos fármacos.

4.2.7. Determinação do efeito dos fármacos isolados e em combinação nos parâmetros hematológicos

A análise hematológica foi realizada utilizando um contador automático de células (ABX-MICROS-60 CELL COUNTER HORIBA, Inc.). Os parâmetros hematológicos avaliados foram: contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, contagem de plaquetas e contagem total e diferencial de leucócitos.

4.2.8. Análise estatística

Nos ensaios de citotoxicidade em cultura de células foram calculadas as CI_{50} a partir das curvas dose-resposta por regressão não linear. Os dados são apresentados como valores CI_{50} e intervalo de confiança de 95% de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata.

Os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados empregando-se a análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do teste de Student Newman-Keuls onde os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão da média, sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Efeito dos fármacos isolados e em combinação em cultura de células tumorais humanas.

Os efeitos citotóxicos em células das linhagens de NCI-H292 e Hep-2 provocados pelo tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona, isoladamente e em combinação, podem ser observados nas Tabelas 2 e 3. O uso de ATOR, PIO, VPA+ATOR e ATOR+PIO foram capazes de provocar efeitos citotóxicos significativos com valores de CI_{50} respectivamente iguais a: 5,54, 21,35, 15,26 e 3,75 $\mu\text{g. ml}^{-1}$. Nas culturas de Hep-2 apenas ATOR+PIO provocou efeito citotóxico considerável com CI_{50} igual a 23,02 $\mu\text{g. ml}^{-1}$. Em células da linhagem K562 apenas a doxorrubicina (controle positivo) apresentou efetividade, os efeitos desse fármaco também foi observado nas linhagens de NCI-H292 e Hep-2.

TABELA 2. Efeito dos fármacos isolados e em combinação em células da linhagem NCI-H292

Fármacos	IC_{50} ($\mu\text{g. ml}^{-1}$)	Intervalos de confiança ($\mu\text{g. ml}^{-1}$)
DMSO 4%	---	---
Ácido valpróico (VPA)	>50	---
Atorvastatina (ATOR)	5,54	5,27 – 5,83
Pioglitazona (PIO)	21,35	20,33 – 22,40
VPA + ATOR	15,26	14,58 – 16,15
VPA + PIO	44,60	41,57 – 47,29
ATOR + PIO	3,75	3,57 – 3,92
VPA + ATOR + PIO	>50	---
Doxorrubicina	4,89	3,98 – 5,69

Os dados são apresentados como valores CI_{50} e intervalos de confiança de 95% de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata.

TABELA 3. Efeito dos fármacos isolados e em combinação em células da linhagem Hep-2

Fármacos	IC₅₀ (µg. ml⁻¹)	Intervalos de confiança (µg. ml⁻¹)
DMSO 4%	---	---
Ácido valpróico (VPA)	>50	---
Atorvastatina (ATOR)	>50	---
Pioglitazona (PIO)	>50	---
VPA + ATOR	>50	---
VPA + PIO	>50	---
ATOR + PIO	23,02	22,12 – 24,26
VPA + ATOR + PIO	>50	---
Doxorrubicina	5,29	4,12 – 6,31

Os dados são apresentados como valores IC₅₀ e intervalo de confiança de 95% de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata.

5.2. Efeito dos fármacos isolados e em combinação em cultura de células de carcinoma de Ehrlich

Os efeitos citotóxicos do ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona, isoladamente e em combinação, podem ser observados na Tabela 4. VPA, ATOR, PIO, VPA+ATOR e ATOR+PIO mostraram atividades citotóxicas significativas com valores de CI₅₀ iguais a: 10,8, 24,79, 29,52, 23,6 e 11,39 µg. ml⁻¹, respectivamente. A doxorrubicina apresentou valor de CI₅₀ igual a 4,77 µg. ml⁻¹, considerado estatisticamente diferente do controle negativo e dos outros grupos.

TABELA 4. Efeito dos fármacos isolados e em combinação em células de carcinoma de Ehrlich

Fármacos	IC₅₀ (µg. ml⁻¹)	Intervalos de confiança (µg. ml⁻¹)
DMSO 4%	---	---
Ácido valpróico (VPA)	10,8	10,10 – 11,49
Atorvastatina (ATOR)	24,79	22,11 – 27,05
Pioglitazona (PIO)	29,52	27,30 – 31,22
VPA + ATOR	23,6	22,08 – 25,12
VPA + PIO	>50	---
ATOR + PIO	11,39	10,31 – 12,47
VPA + ATOR + PIO	>50	---
Doxorrubicina	4,77	2,33 – 7,41

Os dados são apresentados como valores IC₅₀ e intervalo de confiança de 95% de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata.

5.3. Efeito dos fármacos isolados e em combinação no crescimento do carcinoma de Ehrlich *in vivo*

Os efeitos do VPA, ATOR e PIO, isoladamente e em combinação, sobre o carcinoma de Ehrlich podem ser observados na Figura 13. Todos os grupos tratados demonstraram inibição tumoral em relação ao grupo controle com $p < 0,05$. No final do experimento a média dos tumores do grupo controle foi de $2,43 \pm 0,17\text{g}$. Os grupos tratados com VPA, ATOR+PIO e doxorrubicina apresentaram percentuais de inibição tumoral acima de 50%. Nos animais tratados com o VPA isoladamente o peso do carcinoma de Ehrlich foi reduzido para $0,96 \pm 0,13\text{g}$ e no grupo tratado com ATOR+PIO a massa tumoral foi reduzida para $0,9 \pm 0,06\text{g}$. Essas reduções corresponderam aos percentuais de inibição tumoral de 60,2 e 64,9% respectivamente. No grupo tratado com a doxorrubicina a média dos pesos dos tumores foi reduzida em 70,5%.

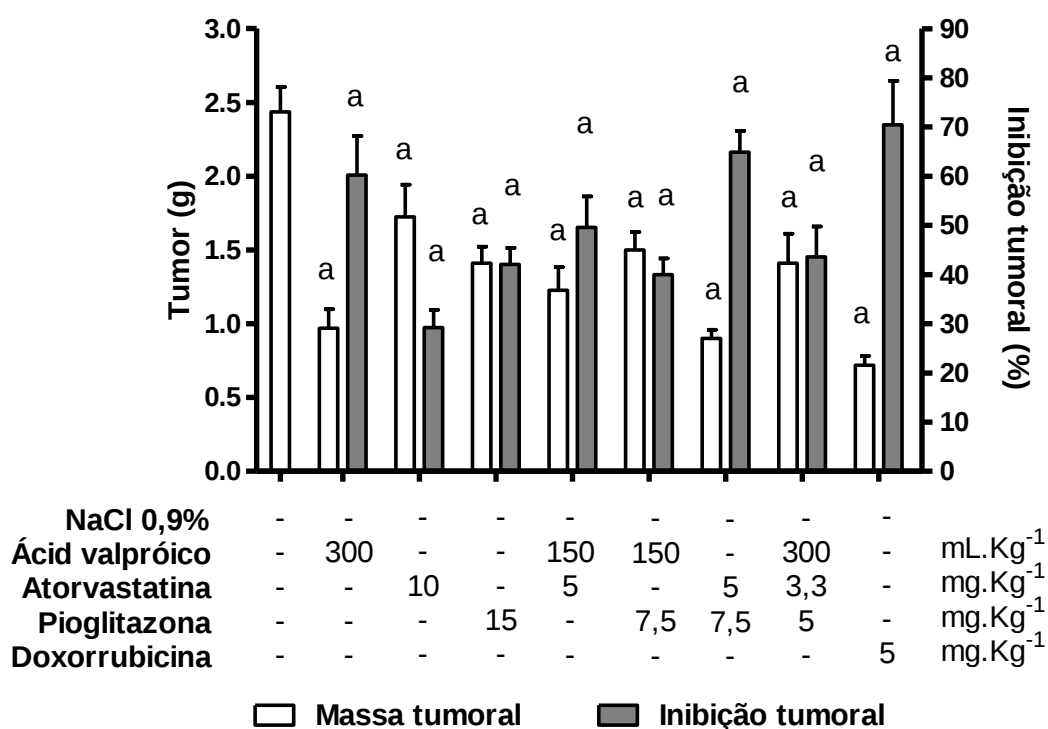


FIGURA 13. Efeito do tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona em doses isoladas e associadas em camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich. Os valores são apresentados como médias $\pm$ desvio padrão de oito animais. a, valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) comparado ao controle por ANOVA seguidos pelo pós-teste de Student Newman-Keuls

5.4. Efeito dos fármacos isolados e em combinação na massa corpórea e peso dos órgãos

Nos animais tratados com o ácido valpróico e com a associação de atorvastatina e pioglitazona houve acréscimo no peso corporal, esse ganho de massa foi significativamente diferente em relação ao controle e aos demais grupos ($P < 0.05$) (Tabela 5). No grupo tratado com a doxorrubicina ocorreu significativa diminuição da massa corpórea em relação ao peso inicial, esse resultado também foi estatisticamente diferente em relação aos outros grupos ($P < 0.05$). Os pesos dos fígados, baços e rins não apresentaram diferenças significativas nos grupos testados entre si e em relação ao controle ($P > 0.05$) (Tabela 5).

TABELA 5: Efeito do tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona em doses isoladas e associadas sobre a massa corpórea e peso dos órgãos de camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich

Fármacos	Dose (mg kg ⁻¹)	Ganho de massa corpórea (g)	Fígado (g.100 g ⁻¹ peso)	Rim (g.100 g ⁻¹ peso)	Baço (g.100 g ⁻¹ peso)
NaCl 0,9%	-	6,85 ± 1,3	5,62 ± 0,22	0,85 ± 0,01	0,94 ± 0,01
Ácido valpróico (VPA)	300	2,61 ± 0,6 ^a	6,49 ± 0,23	0,73 ± 0,05	1,06 ± 0,12
Atorvastatina (ATOR)	10	7,33 ± 1,59	5,82 ± 0,14	0,89 ± 0,02	1,16 ± 0,13
Pioglitazona (PIO)	15	6,04 ± 1,41	5,66 ± 0,27	0,87 ± 0,02	0,95 ± 0,09
VPA + ATOR	150 + 5	5,13 ± 1,35	4,52 ± 0,61	0,83 ± 0,01	0,92 ± 0,03
VPA + PIO	150 + 7,5	5,51 ± 1,67	7,06 ± 0,63	0,84 ± 0,03	1,08 ± 0,11
ATOR + PIO	5 + 7,5	2,32 ± 1,07 ^a	6,30 ± 0,32	0,74 ± 0,04	0,96 ± 0,05
VPA + ATOR + PIO	150 + 5 + 7,5	4,48 ± 1,34	6,38 ± 0,19	0,72 ± 0,03	1,07 ± 0,01
Doxorrubicina	5	-3,45 ± 0,82 ^a	4,8 ± 0,29	0,79 ± 0,05	0,97 ± 0,21

Os valores são apresentados como médias ± desvio padrão de oito animais. ^a, significativamente diferentes ($p < 0,05$) comparado ao controle e demais tratamentos por ANOVA seguidos pelo pós-teste de Student Newman-Keuls.

5.5. Análise morfológica e histopatológica

A análise histopatológica dos tumores mostrou vários graus de pleomorfismos nuclear e celular. No grupo controle negativo as células apresentaram em alta densidade com poucas áreas de necrose e com morfologia variando de poligonais a

redondas com núcleos hipercromáticos e binucleados (Figura 14 A). Nos animais tratados com o ácido valpróico isoladamente e no grupo tratado com a associação de atorvastatina e pioglitazona foram observadas invasões de tecido muscular e extensas áreas de necrose coagulativa (Figuras 14 B e 14 C). O grupo tratado com doxorrubicina mostrou invasão de tecido adiposo e apresentou células com características histopatológicas semelhantes ao grupo controle (Figura 14 D).

A análise histopatológica dos fígados dos animais do grupo controle negativo apresentou parênquima bem preservado, com células hepáticas morfológicamente regulares constituindo lóbulos hepáticos organizados, essa característica foi encontrada, também, no grupo controle positivo, onde, nenhuma alteração significativa foi observada. Os sinusóides hepáticos não apresentaram alterações e as células de Kupffer apareceram em quantidades normais (Fig. 15A). Os animais tratados com VPA e com a associação de ATOR e PIO, apresentaram degeneração hidrópica dos hepatócitos e congestão venosa (Fig. 15B e 15C).

Os rins dos grupos tratados com VPA e com doxorrubicina não apresentaram nenhuma alteração histológica relevante quando comparados com o controle negativo (Fig. 16A, 16B e 16D). Nos rins dos animais tratados com a associação de ATOR e PIO, foram observados alguns glomérulos necróticos e sinais indicativos de necrose parcial dos glomérulos (Fig. 16C).

Os baços dos animais tratados com o VPA, ATOR + PIO e doxorrubicina (Fig. 17), não mostraram alterações histológicas relevantes em relação ao controle negativo. A análise histopatológica dos baços mostrou aparência normal, com cápsula de conjuntivo denso íntegra e polpa esplênica apresentando as regiões de polpa branca (constituída de tecido linfóide) e polpa vermelha (rica em sangue) bem diferenciadas.

5.6. Efeito dos fármacos isolados e em combinação nos parâmetros hematológicos

Na análise do sangue dos camundongos tratados com os fármacos isolados e associados (Tabela 6), foram verificadas alterações estatisticamente significativas

apenas nos animais tratados com ácido valpróico e no grupo tratado com doxorrubicina. O tratamento com VPA induziu acentuada trombocitopenia em relação ao grupo controle e aos demais grupos ($P < 0.05$). Os animais tratados com doxorrubicina apresentaram reduções no número total de plaquetas e leucócitos em relação ao controle e aos outros grupos com ($P < 0.05$).

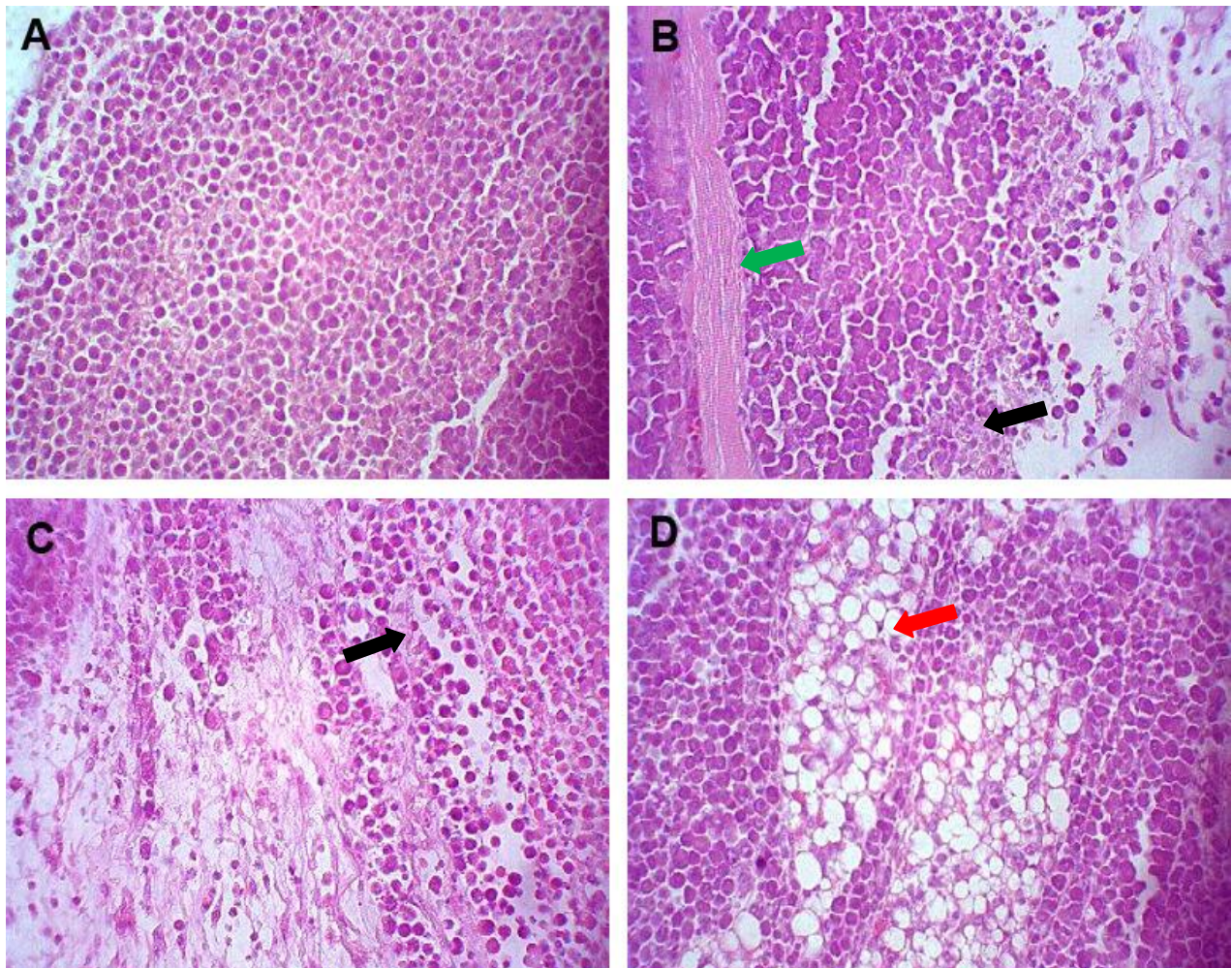


FIGURA 14. Fotomicrografias do Carcinoma de Ehrlich de animais tratados com NaCl 0,9% (painel A), 300 mg kg⁻¹ de ácido valpróico (painel B), 5 mg kg⁻¹ de atorvastatina + 7,5 mg kg⁻¹ de pioglitazona (painel C) e 5 mg kg⁻¹ de doxorrubicina (painel D) analisados por microscopia óptica (x 400). As setas pretas indicam necrose coagulativa, seta verde indica invasão de tecido muscular e seta vermelha invasão de tecido adiposo

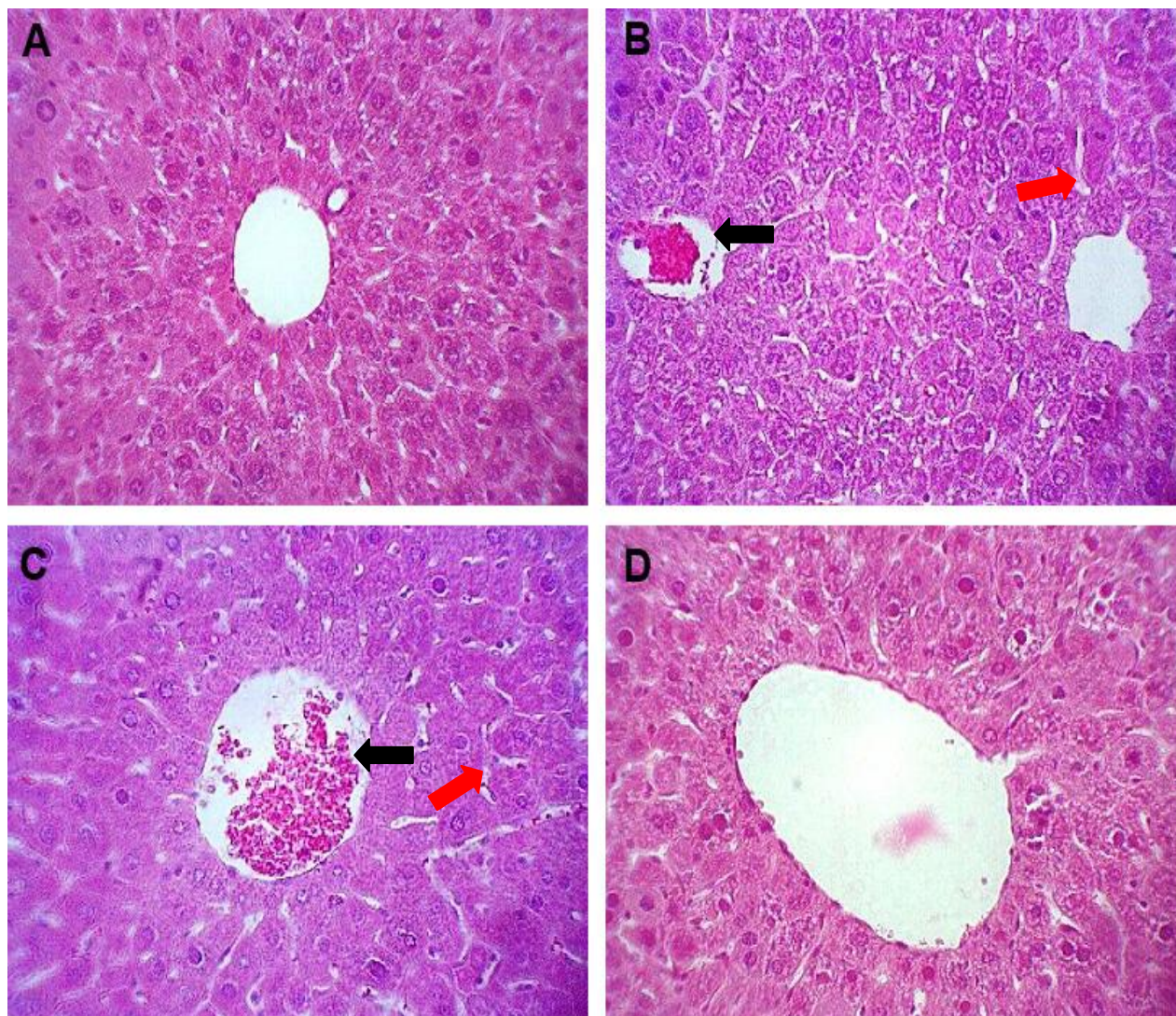


FIGURA 15. Efeito do tratamento com VPA, ATOR+PIO e doxorrubicina no fígado de camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich. Fotomicrografias mostrando a avaliação histopatológica do Fígado de animais tratados com NaCl 0,9% (painel A), 300 mg kg⁻¹ de ácido valpróico (painel B) 5 mg kg⁻¹ de atorvastatina + 7,5 mg kg⁻¹ de pioglitazona (painel C) e 5 mg kg⁻¹ de doxorrubicina (painel D) analisados por microscopia óptica (x 400). Setas vermelhas indicam degeneração hidrópica dos hepatócitos e setas pretas mostram congestão venosa.

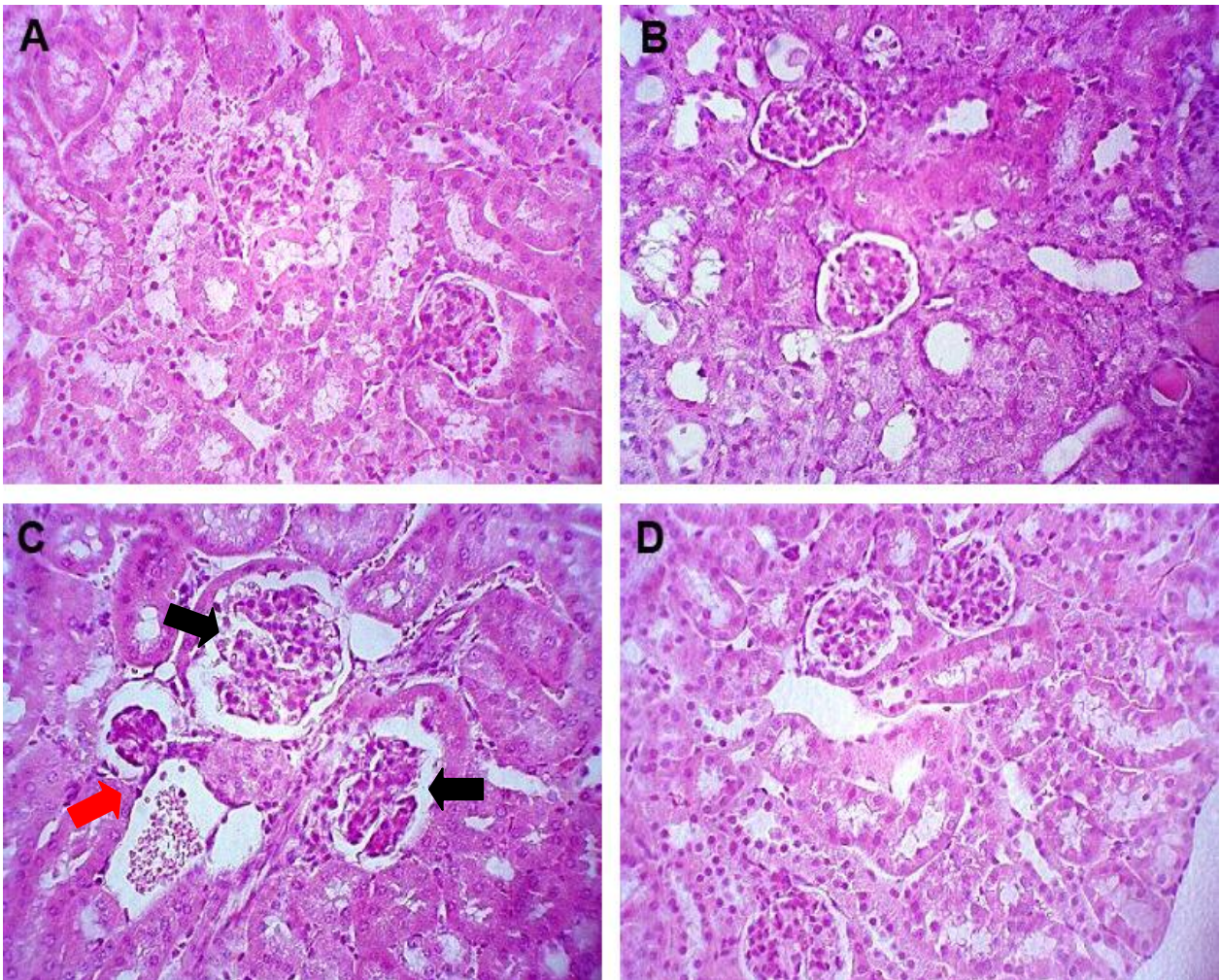


FIGURA 16. Efeito do tratamento com VPA, ATOR+PIO e doxorubicina nos rins de camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich. Fotomicrografias mostrando a avaliação histopatológica dos rins de animais tratados com NaCl 0,9% (painel A), 300 mg kg⁻¹ de ácido valpróico (painel B) 5 mg kg⁻¹ de atorvastatina + 7,5 mg kg⁻¹ de pioglitazona (painel C) e 5 mg kg⁻¹ de doxorubicina (painel D) analisados por microscopia óptica (x 400). Seta vermelha indica glomérulos necróticos e setas pretas indicam necrose parcial dos glomerulos

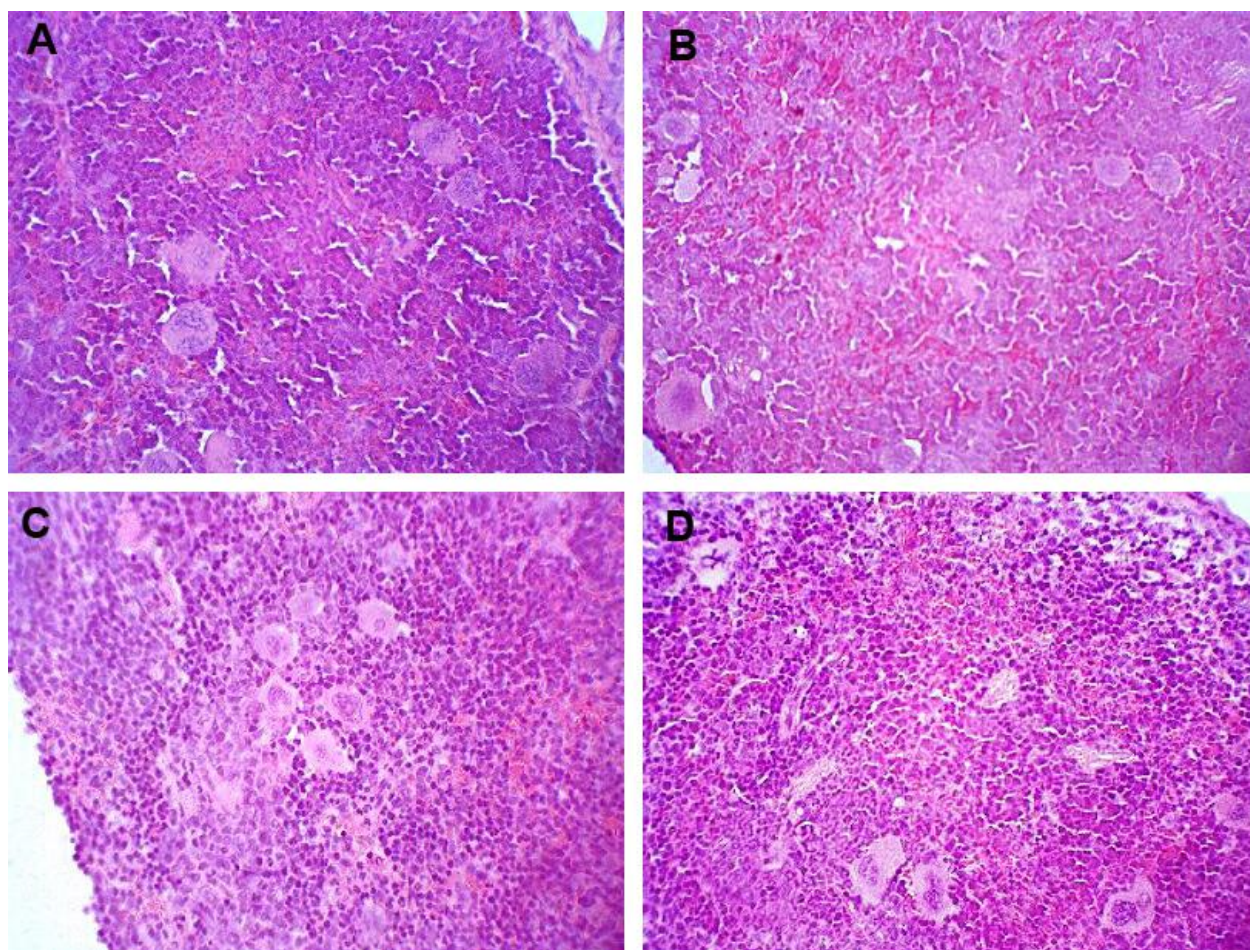


FIGURA 17. Efeito do tratamento com VPA, ATOR+PIO e doxorubicina nos baços de camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich. Fotomicrografias mostrando a avaliação histopatológica dos baços de animais tratados com NaCl 0,9% (painel A), 300 mg kg⁻¹ de ácido valpróico (painel B) 5 mg kg⁻¹ de atorvastatina + 7,5 mg kg⁻¹ de pioglitazona (painel C) e 5 mg kg⁻¹ de doxorubicina (painel D) analisados por microscopia óptica (x 400)

Tabela 6. Efeito do tratamento com ácido valpróico, atorvastatina e pioglitazona em doses isoladas e associadas sobre os parâmetros hematológicos de camundongos transplantados com o Carcinoma de Ehrlich.

Fármaco	Dose (mg kg ⁻¹)	Eritrócitos (10 ⁶ cells µl ⁻¹)	Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	Plaquetas (10 ⁵ cells µl ⁻¹)	Leucócitos (10 ³ cells µl ⁻¹)	Contagem diferencial de leucócitos (%)		
						Linfócitos	Monócitos	Granulócitos
NaCl 0,9%	-	9,36 ± 0,53	11,3 ± 0,61	8,87 ± 0,71	8,13 ± 0,71	48,3	5,9	45,8
Ácido valpróico (VPA)	300	8,98 ± 0,42	12,35 ± 0,52	3,04 ± 0,53 ^a	8,62 ± 0,64	46,2	6,3	47,5
Atorvastatina (ATOR)	10	9,17 ± 0,51	11,73 ± 0,39	8,65 ± 0,62	8,47 ± 0,67	41,1	8,2	50,7
Pioglitazona (PIO)	15	9,82 ± 0,39	11,87 ± 0,54	8,57 ± 0,56	8,59 ± 0,63	43,7	7,2	49,1
VPA + ATOR	150 + 5	9,66 ± 0,47	12,94 ± 0,48	7,65 ± 0,57	8,09 ± 0,56	40,2	9,1	50,7
VPA + PIO	150 + 7,5	8,52 ± 0,52	12,41 ± 0,46	7,57 ± 0,52	8,25 ± 0,61	43,2	7,7	49,1
ATOR + PIO	5 + 7,5	9,53 ± 0,46	11,26 ± 0,38	7,84 ± 0,43	8,96 ± 0,69	45,1	6,4	48,5
VPA + ATOR + PIO	150 + 5 + 7,5	9,87 ± 0,59	10,53 ± 0,73	7,23 ± 0,51	7,95 ± 0,51	40,2	8,2	51,6
Doxorrubicina	5	8,54 ± 0,86	11,14 ± 0,83	2,9 ± 0,47 ^a	2,19 ± 0,42 ^a	39,4	10,5	50,1

Os valores são apresentados como médias ± desvio padrão de oito animais. a, (p < 0,05) comparado ao controle e demais tratamentos por ANOVA seguidos pelo pós-teste de Student Newman-Keuls.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos os inibidores da HMG-CoA redutase, inibidores das histonas deacetilase e agonistas de PPAR γ foram apontados como drogas promissoras para o tratamento do câncer. Alguns fármacos pertencentes a estas classes, já demonstraram potentes efeitos antitumorais in vitro e in vivo em muitas linhagens de células tumorais. Esses resultados puderam ser observados durante o uso dos fármacos isoladamente e em combinação com quimioterápicos já utilizados no tratamento do câncer (SASSANO; PLATANIAS, 2008; DUENAS-GONZALEZ et al., 2007; BLANQUICETT et al., 2008). Muitos dos resultados apresentados neste trabalho com relação à citotóxicidade em células humanas e murinas são inéditos, principalmente os resultados demonstrados pela combinação de atorvastatina e pioglitazona.

Em células da linhagem de carcinoma mucoepidermóide de pulmão (NCI-H292), os tratamentos que obtiveram valores de CI₅₀ mais efetivos foram: ATOR, VPA+ATOR e ATOR+PIO. De acordo com Tallarida, (2001), para entender os resultados obtidos da combinação de fármacos é necessário primeiro, entender se houve interação entre eles, para depois analisar se os efeitos oriundos da interação ocorrem de forma sinérgica ou antagônica.

Através do método de Chou, (1996), que correlaciona as equações das curvas dose-resposta dos fármacos utilizados isoladamente, com a equação da combinação dos dois fármacos, pudemos verificar que na associação de VPA+ATOR não houve interação entre os fármacos, e o resultado mostrado foi completamente dependente do apresentado pelo uso de ATOR isoladamente. Na combinação ATOR+PIO, a análise demonstrou forte sinergismo, indicando uma potencialização mútua dos mecanismos de ação dos dois fármacos.

Muitos trabalhos propuseram os possíveis mecanismos de ação das estatinas e das TZDs em várias linhagens malignas de células pulmonares. Os efeitos das estatinas são muito proeminentes em células malignas de pulmão. Diferentes estatinas apresentam potente inibição do crescimento e efeitos pró-apoptóticos em

Carcinoma Pulmonar de Células não Pequenas (MANTHA et al, 2005), bem como Carcinoma de pequenas células de pulmão (KHANZADA et al, 2006). Com base nas extensas evidências in vitro e in vivo a sobre os efeitos das estatinas em malignidades pulmonares, um estudo avaliou a associação do câncer de pulmão e do uso de estatinas e demonstrou que as estatinas tinham uma efeito marcante na redução da incidência de doenças pulmonares e câncer, o risco de desenvolvimento de neoplasias pulmonares foi 55% menor nos pacientes que faziam uso de alguma estatina por mais de seis meses (KHURANA et al, 2007). Os efeitos das estatinas em determinados tipos de células de carcinoma do pulmão podem incidir a sua capacidade de inibir a função do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR), que é expressa em níveis elevados de certos tipos de câncer de pulmão (MANTHA et al, 2005).

A eficácia das TZDs em linhagens de câncer de pulmão já foi demonstrada por vários autores (TSUBOUCHI et al, 2000; SATOH et al, 2002; HAN; ROMAN, 2006). Por exemplo, a proliferação de células A549 câncer de pulmão foi significativamente inibida pelo ciglitazona tanto in vivo e in vitro (ZHANG et al, 2006). O uso de troglitazona induziu apoptose em duas linhagens de células humanas de câncer de pulmão, sem afetar as células normais através da ativação do PPAR γ (LI et al, 2005).

A combinação de atorvastatina e pioglitazona promoveu efeitos inibitórios no tumor de Ehrlich nos ensaios in vivo e in vitro. Os resultados apresentados pela associação dos dois fármacos, assim como os apresentados em células NCI-H292, mostraram forte sinergismo. O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário de camundongos. Os mecanismos de sinalização molecular, relacionados ao desenvolvimento dessa neoplasia podem ter forte relação com a sinalização de muitos tipos de Malignidades mamárias humanas. Tanto as estatinas quanto as TZDs tem demonstrado eficácia em inibir a proliferação de muitas linhagens de câncer de mama.

Os efeitos antitumorais das estatinas em células de carcinoma de mama têm sido associados com à supressão da via MEK/Erk e diminuições nas atividades de NF- κ B e AP-1 DNA de ligação (CAMPBELL et al, 2006). Outros estudos sugeriram que a sinvastatina é capaz de induzir apoptose em células de câncer mamário pela

via da JNK e de uma maneira independente do receptor de estrógeno ou do estado de expressão da p53 (KOYUTURK; ERSOZ; ALTIOK, 2007). Alguns estudos in vitro e in vivo demonstraram que as TZDs foram capazes de suprimir a proliferação de linhagens de carcinoma de forma dependente da ativação do PPAR γ (JARRAR; BARANOVA, 2007; BOCCA et al, 2007).

Essas duas classes de fármacos vêm demonstrando um potencial bastante diversificado contra vários tipos de câncer exibindo numerosos mecanismos de ação. As estatinas têm sido relacionadas às propriedades de inibição de proliferação e indução de apoptose. O seu efeito foi observado em modelos animais contra melanoma, carcinoma mamário, adenocarcinoma pancreático, fibrosarcoma, glioma, neuroblastoma e linfoma, resultando em retardamento de crescimento tumoral e inibição de processos metastáticos (JAKÓBISIAK; GOLAB, 2003).

Vários trabalhos evidenciam a ação pró-apoptótica das estatinas, a qual pode estar relacionada à diminuição da produção de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (DIMITROULAKOS et al, 2000), à ativação de caspases 3,7,8 e 9 (CAFFORIO et al., 2005) e a reativação da JNK, uma proteína quinase que pode agir como supressora tumoral (MERAL et al, 2007). Huang et al. (2009) demonstraram que a atorvastatina age principalmente induzindo a apoptose. Alguns estudos pré-clínicos mostram também, que as estatinas possuem a capacidade de potencializar os efeitos antitumorais de algumas citocinas e quimioterápicos (GAN et al., 2008; MARTIROSYAN et al., 2010).

Várias pesquisas demonstraram o efeito dos agonistas do PPAR γ inibindo a proliferação celular e atuando nos pontos de controle do ciclo celular (KOEFFLER, 2003, HEANEY, 2004). A ativação do PPAR γ também está relacionada a apoptose, principalmente pelo aumento da expressão dos genes p27 e c-myc (OHTA et al, 2001; MARTELLI et al, 2002).

A troglitazona, um potente agonista do PPAR γ , promoveu inibição significativa do crescimento celular em linhagens de células neoplásicas tireoidianas por parada do ciclo celular e apoptose (PARK et al., 2005). Esse fármaco inibiu também a proliferação em células derivadas de câncer de fígado humano (HepG2), pela via de

ativação da caspase 3, redução da expressão do gene BCL2 e aumento da expressão dos genes BAX e BAK (LI et al., 2003).

O tratamento com pioglitazona mostrou-se eficaz em linhagens leucêmicas e em células de câncer de colón, onde houve notável diminuição da proliferação e indução de apoptose (ZANG et al., 2006; CERBONE et al., 2007). Os experimentos realizados por de Zhang et al. (2007), demonstraram que fármacos agonistas do PPAR γ podem ser usados em associação com quimioterápicos, utilizados comumente no tratamento do câncer, potencializando seu efeito.

A associação de lovastatina (inibidor da HMG-CoA) e troglitazona (agonista do PPAR γ) apresentou efeito sinérgico, inibindo a proliferação de células de glioblastoma (DBTRG 05 MG) e câncer de pulmão (CL1-0). Este sinergismo foi acompanhado pela modulação de E2F-1, P27/Kip1, CDK2, ciclina A e do estado de fosforilação da RB, importantes mediadores da atividade antitumoral e regulação do ciclo celular (YAO et al., 2005).

A associação de atorvastatina e pioglitazona, e de outras estatinas e tiazolidinedionas já demonstraram interação sinérgica no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares e diabetes em diversos modelos experimentais (CHU et al., 2006; FORST et al., 2007; HANEFELD et al., 2007). Segundo Forst, (2008), essa combinação potencializa mutuamente o mecanismo de ação desses dois fármacos.

Neste estudo o ácido valpróico, utilizado isoladamente, apresentou um considerável efeito citotóxico in vitro e também foi capaz de inibir o tumor de Ehrlich nos ensaios in vivo. Nossos resultados corroboram com os descritos por outros estudos, onde, o ácido valpróico têm demonstrado efetividade contra diversos tipos de câncer, promovendo reduções na proliferação de células tumorais, inibindo a angiogênese, induzindo a apoptose e provocando diferenciação celular in vitro e in vivo (LIU et al., 2006).

O potencial terapêutico dos inibidores das histonas deacetilase, deriva do seu efeito antiproliferativo em vários tipos de células malignas, combinado com baixa toxicidade para as células normais. Várias classes de iHDAC demonstraram atividade antitumoral em estudos pré-clínicos e estão sendo avaliadas, atualmente,

em estudos clínicos (MARCHION; MÜNSTER, 2007; RASHEED et al., 2008). Vorinostat foi o primeiro inibidor de histonas deacetilase aprovado pelo FDA para o tratamento de linfoma cutâneo de células T (MARKS, 2007).

VPA apresentou efeito antineoplásico em uma grande variedade de ensaios pré-clínicos e clínicos. Em um estudo realizado com células leucêmicas de diferentes linhagens, VPA induziu apoptose pelas vias dependentes e independentes de caspases (KAWAGOE et al., 2002). Vários autores corroboram com a hipótese de que o ácido valpróico atua principalmente induzindo a apoptose e diferenciação em vários tipos de células cancerígenas (LI et al., 2005; VALENTINI et al., 2007; BYUN et al., 2009; CHEN et al., 2009).

Isenberg et al. (2007) demonstrou que o ácido valpróico poderia atuar modulando a angiogênese tumoral e propôs o seu uso combinado com outros quimioterápicos. Alguns ensaios comprovaram a eficácia do VPA combinado com outros fármacos, induzindo a apoptose ou potencializando o mecanismo de ação do fármaco associado (CATALANO et al., 2006; GILLESPIE et al., 2006; PATHIL et al., 2006; FREW et al., 2008; MUNSTER et al., 2009). Um estudo sobre a ação do VPA em células de carcinoma renal mostrou que ele regula a acetilação das histonas H3 e H4, de forma dose dependente, provocando diminuição da proliferação celular. Essa diminuição foi relacionada a alterações em algumas proteínas reguladoras do ciclo celular, em especial CDK2, ciclina B, ciclina D3, p21 e Rb. Nos ensaios in vivo foi observado um acúmulo de p21 e bax, nos tecidos dos animais tratados com VPA (JONES et al., 2008).

O tratamento com ATOR+PIO não induziu alterações nos parâmetros hematológicos, entretanto, a análise histopatológica dos fígados e rins dos animais tratados com essa combinação mostrou sinais de toxicidade. Tanto a atorvastatina quanto a pioglitazona, usadas isoladamente, possuem hepatotoxicidade como reação adversa (WALSH et al., 1996; FARLEY-HILLS et al., 2004), entretanto, a toxicidade renal não é descrita como reação a nenhum dos dois fármacos. As alterações histopatológicas induzidas pelo tratamento com a combinação de atorvastatina e pioglitazona, neste estudo, deixa indícios de que há sinergismo, também, para os efeitos tóxicos dos fármacos.

Nossos resultados mostraram também alterações na massa corpórea, nos parâmetros hematológicos e citotoxicidade hepática induzidas pelo tratamento com ácido valpróico. Devane, (2003) relaciona essas reações fisiológicas ao uso do VPA, entretanto, as classifica como efeitos pouco frequentes. São escassos os trabalhos que associam o tratamento com VPA, inibidores da HMG-CoA redutase, e agonistas do PPAR γ , este trabalho fornece uma importante informação sobre o potencial dessas combinações na inibição do câncer in vivo e seus efeitos tóxicos.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- ❖ A atorvastatina utilizada isoladamente, a combinação de Ácido valpróico e atorvastatina e a associação de atorvastatina e pioglitazona mostrou efeito citotóxico significativo em células da linhagem NCI-H292.
- ❖ A associação de atorvastatina e pioglitazona apresentou efeito citotóxico significativo em células da linhagem Hep-2.
- ❖ O efeito citotóxico induzido pela combinação de Ácido valpróico e atorvastatina não pode ser considerado sinérgico.
- ❖ O efeito citotóxico induzido pela combinação de atorvastatina e pioglitazona demonstrou forte sinergismo superando os efeitos induzidos pela sua administração isolada.
- ❖ O ácido valpróico utilizado isoladamente e a associação de atorvastatina e pioglitazona apresentaram efeito antitumoral em células de Carcinoma de Ehrlich *in vivo* e *in vitro*.
- ❖ O ácido valpróico induziu trombocitopenia e toxicidade hepática.
- ❖ A associação de atorvastatina e pioglitazona induziu toxicidade hepática e renal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AL-HARBI, M. M.; AL-GHARABLY, N. M.; AL-SHABANAH, O. A.; AL-BEKAIRI, A. M.; OSMAN, A. M.; TAWFIK, H. N. Prevention of doxorubicin-induced myocardial and haematological toxicities in rats by the iron chelator desferrioxamine. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 31(3), p. 200-204.1992.

ALLEY, M. C. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p.589-601, 1998.

ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 51. p.786-94. 1964.

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

BAKRI, R.; WANG, J.; WIERZBICKI, A. S.; GOLDSMITH, D. Cerivastatin monotherapy-induced muscle weakness, rhabdomyolysis and acute renal failure. **International Journal of Cardiology**. V. 91, Nº 1. p. 107-109. 2003.

BELLOSTA, S; BERNINI, F; FERRI, N; QUARATO, P; CANAVESI, M; ARNABOLDI, L. Direct vascular effects of HMGCoA reductase inhibitors. **Atherosclerosis**, v. 137 p.101-109,1998.

BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 409-435, fevereiro 2002.

BERTHOLD, I. G.; BERTHOLD, H. K.; WEBER, A. A.; KO, Y.; SEUL, C.; SACHINIDIS, H. V. A. Troglitazone and rosiglitazone induce apoptosis of vascular smooth muscle cells through an extracellular signal-regulated kinase-independent pathway. **Archives of Pharmacology**. v. 363. p. 215–221, 2001.

BEZERRA DP, CASTRO FO, ALVES APNN, PESSOA C, MORAES MO, SILVEIRA ER, LIMA MAS, ELMIRO FJM, ALENCAR NMN, MESQUITA RO, LIMA MW, COSTA-LOTUFO LV. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *J. Appl. Toxicol.* In press. DOI: 10.1002/jat.126. 2007

BITTENCOURT, H. N. S.; BRUNSTEIN, C. G. Fármacos antineoplásicos. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 502-531.

BLANQUICETT, C; ROMAN, J; MICHAEL, H. C. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. **Cancer Therapy**, V. 6,p. 25-34, 2008.

BOCCA, C; BOZZO, F; FRANCICA, S; COLOMBATTO, S; MIGLIETTA, A. Involvement of PPAR gamma and E-cadherin/beta-catenin pathway in the antiproliferative effect of conjugated linoleic acid in MCF-7 cells. **International Journal of Oncology**,v. 121, p. 248–256. 2007.

BOLDEN, J. E; PEART, M. J; JOHNSTONE, R. W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 769-84. 2006.

BOTRUGNO, O. A; SANTORO, F; MINUCCI, S. Histone deacetylase inhibitors as a new weapon in the arsenal of differentiation therapies of cancer. **Cancer Letters**, v. 280(2), p.134-44. 2009.

BOYLE, P.; LEVIN, B. (eds). **World Cancer Report 2008**. International Agency for Research on Cancer. 2008.

BRAISSANT, O.; FOUFELLE, F.; SCOTTO, C.; DAUCA, M.; WAHLI, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR β and γ in the adult rat. *Endocrinology*. v. 137. p. 354-66. 1995.

BYUN, S.; KIM, F.; KHANDRIKA, L.; KUMAR, B.; KOUL, S.; WILSON, S.; KOUL, H. Differential effects of valproic acid on growth, proliferation and metastasis in HTB5 and HTB9 bladder cancer cell lines. **Cancer Letters**. v. 281. p. 196–202. 2009.

CAFFORIO, P.; DAMMACCO, F.; GERNONE, A.; SILVESTRIS, F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 883–891. 2005.

CAMPBELL, M.J.; ESSERMAN, L.J.; ZHOU, Y.; SHOEMAKER, M.; LOBO, M.; BORMAN, E.; BAEHNER, F. Breast cancer growth prevention by statins. **Cancer Res.** v. 66, p. 8707–8714. 2006.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química. Nova**. v.30, n.2, p. 425-430. 2007.

CAREW, J. S.; GILES, F. J.; NAWROCKI, S. T. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. **Cancer Letters**, v.269(1), p. 7-17. 2008.

CATALANO, M. G.; FORTUNATI, N.; PUGLIESE, M.; POLI, R.; BOSCO, O.; MASTROCOLA, R.; ARAGNO, M.; BOCCUZZI, G. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances sensitivity to doxorubicin in anaplastic thyroid cancer cells. **Journal of Endocrinology**, v.191(2), p. 465-472. 2006.

CERBONE A, TOALDO C, LAURORA S, BRIATORE F, PIZZIMENTI S, DIANZANI MU, FERRETTI C, BARRERA G. 4- Hydroxynonenal and PPARgamma ligands affect proliferation, differentiation, apoptosis in colon cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 42, p. 1661–1670. 2007.

CHAVEZ-BLANCO, A.; PEREZ-PLASENCIA, C.; PEREZ-CARDENAS, E.; CARRASCO-LEGLEU, C.; RANGEL-LOPEZ, E.; SEGURA-PACHECO, B.; TAJA-CHAYEB, L.; TREJO-BECERRIL, C.; GONZALEZ-FIERRO, A.; CANDELARIA, M.; CABRERA, G.; DUENAS-GONZALEZ, A. Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell. **Cancer Cell International**. v.6:2. p. 1- 9. 2006.

CHEN, X.; WONG, P.; RADANY, E.; WONG, J. Y. HDAC Inhibitor, Valproic Acid, Induces p53-Dependent Radiosensitization of Colon Cancer Cells. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**. v.24(6), p. 689-699. 2009.

CHINETTI, G.; GRIGLIO, S.; ANTONUCCI, M.; TORRA, I. P.; DELERIVE, P.; MAJD, Z.; FRUCHART, J. C.; CHAPMAN, J.; NAJIB, J.; STAELS, B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. **Journal of Biological Chemistry**. v. 273. p. 25573–25580. 1998.

CHOU, T. C. **The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism**, in **Synergism and Antagonism in Chemotherapy**. Chou, T. C. and Rideout, D. C., eds., Academic, San Diego, p. 61–102. 1996.

CHU, C. S.; LEE, K. T.; LEE, M. Y.; SU, H. M.; VOON, W. C.; SHEU, S. H.; LAI, W. T. Effects of rosiglitazone alone and in combination with atorvastatin on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Cardiology**. v.97, p. 646-650. 2006.

COHEN, R. N. Nuclear receptor corepressor and PPAR γ . **Nuclear Receptor Signaling**, v. 4, p. 1-4, fevereiro 2006.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1585-1612, 1995.

COSTELLOE, T.; FITZGERALD, J.; MURPHY, N. J.; FLAUS, A.; LOWNDES, N. F. Chromatin modulation and the DNA damage response. **Experimental Cell Research**. v. 312. p. 2677-686. 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**., v.60(1), p. 52-60. 1997.

CUZZOCREA, S. Peroxisome proliferator-activated receptors and acute lung injury. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 263-270, Janeiro 2006.

DANGAS, G. J; BADIMON, L; SMITH, D. A; LEVINE, A; AMBROSE, J. A. Pravastatin therapy in hyperlipidemia. Effects on thrombus formation and the systemic hemostatic profile. **American College of Cardiology**, v. 33, p.1294-304. 1999.

DANSETTE, P. M; JOEN, M; PONS, C. HMGCoA reductase activity in human liver microsomes: comparative inhibition by statins. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 52, p.145-8. 2000.

DEMIERRE, M. F.; HIGGINS, P. D. R.; GRUBER, S.B.; HAWK, E.; LIPPMAN, S. M. Statins and cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**. v. 5, p.930–942. 2005.

DENOYELLE, C; VASSE, M; KORNER, M; MISHAL, Z; GANNE, F; VANNIER, J. P; SORIA, J; SORIA, C. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 1139-48. 2001.

DEROANNE, C. F.; BONJEAN, K.; SERVOTTE, S.; DEVY, L.; COLIGE, A.; CLAUSSE, N.; BLACHER, S.; VERDIN, E.; FOIDART, J. M.; NUSGENS, B. V.; CASTRONOVO, V. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. **Oncogene**, v. 21, p. 427–436. 2002.

DEVANE, C. L. Pharmacokinetics, drug interactions, and tolerability of valproate. **Psychopharmacol Bull.** 37(2): 25-42. 2003.

DHALWAL, K.; DESHPANDE, Y. S.; PUROHIT, A. P. Evaluation of in vitro antioxidant activity of *Sida rhombifolia* (L.) ssp. *retusa* (L.). **Journal of Medicinal Food**, v.10(4), p. 683-688. 2007.

DIMITROULAKOS, J.; THAI, S.; WASFY, G. H.; HEDLEY, D. W.; MINDEN, M. D.; PENN, L. Z. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias. **Leukemia and Lymphoma**, v.40, p.167–178. 2000.

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

DUBUQUOY, L.; ROUSSEAU, C.; THURU, X.; PEYRIN-BIROULET, L.; ROMANO, O.; CHAVATTE, P.; CHAMAILLARD, M.; DESREUMAUX, P. PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 55, p. 1341-1349, 2006.

DUENAS-GONZALEZ, A; CANDELARIA, M; PEREZ-PLASCENCIA, C; PEREZ-CARDENAS, E; CRUZ-HERNANDEZ, E; HERRERA, L. A. Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34(3), p. 206-22. 2007.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 1-7, abril 2004.

FARLEY-HILLS, E.; SIVASANKAR, R.; MARTIN, M. Fatal liver failure associated with pioglitazone. **British Medical Journal**, v. 329(7463), p.429. 2004.

FEIGE, J. N.; GELMAN, L.; MICHALIK, L.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Progress in Lipid Research**, Switzerland, v. 45, n. 2, p. 120-159, março 2006.

FORST, T.; PFÜTZNER, A.; LÜBBEN, G.; WEBER, M.; MARX, N.; KARAGIANNIS, E.; KOEHLER, C.; BAURECHT, W.; HOHBERG, C.; HANEFELD, M. Effect of simvastatin and/or pioglitazone on insulin resistance, insulin secretion, adiponectin, and proinsulin levels in nondiabetic patients at cardiovascular risk –the PIOSTAT. **Study. Metabolism**, v. 56, p. 491-496. 2007.

FORST, T.; WILHELM, B.; PFÜTZNER, A.; FUCHS, W.; LEHMANN, U.; SCHAPER, F.; WEBER, M.; MÜLLER, J.; KONRAD, T.; HANEFELD, M. Investigation of the vascular and pleiotropic effects of atorvastatin and pioglitazone in a population at high cardiovascular risk. **Diabetes and Vascular Disease Research**. 2008.

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

FREW, A. J.; LINDEMANN, R. K.; MARTIN, B. P.; CLARKE, C. J.; SHARKEY, J.; ANTHONY, D. A.; BANKS, K. M.; HAYNES, N. M.; GANGATIRKAR, P.; STANLEY, K.; BOLDEN, J. E.; TAKEDA, K.; YAGITA, H.; SECRIST, J. P.; SMYTH, M. J.; JOHNSTONE, R. W. Combination therapy of established cancer using a histone

deacetylase inhibitor and a TRAIL receptor agonist. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 105, p. 11317–11322. 2008.

GALM, O.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. **Blood Rev.** v. 20. p. 1-13. 2006.

GAN, Y.; WANG, J.; COSELLI, J.; WANG, X. L. Synergistic induction of apoptosis by HMG-CoA reductase inhibitor and histone deacetylases inhibitor in HeLa cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 365(2), p. 386-92. 2008.

GERAN, R. I.; GREENBER, N. H.; MACDONAL, M. M.; SCHUMACH, R. I.; ABBOTT, B. J. Protocols for screening chemical agents and natural-products against tumors and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Reports**, Part 3, n. 3, v. 2, 1972.

GHOSH, P. M; GHOSH-CHOUDHURY, N.; MOYER, M.L. Role of RhoA activation in the growth and morphology of a murine prostate tumor cell line. **Oncogene.** v. 18. p.4120–30. 1999.

GILLESPIE, S.; BORROW, J.; ZHANG, XD.; HERSEY, P. Bim plays a crucial role in synergistic induction of apoptosis by the histone deacetylase inhibitor SBHA and TRAIL in melanoma cells. **Apoptosis**, v.11, p. 2251–2265. 2006.

GONZALES, F. J.; GRIMALDI, P. A.; KADOWAKI, T.; LAZAR, M. A.; O´RAHILLY, S.; PALMER, C. N. A.; PLUTZKY, J.; REDDY, J. K.; SPIEGELMAN, B. M.; STAEELS, B.; WAHLI, W. International Union of pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 726 741, dezembro 2006.

GRAAF, M. R.; RICHEL, D. J.; VAN NOORDEN, C. J.; GUCHELAAR, H. J. Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of câncer. **Cancer Treatment Review.** v.30 (7). p.609-41. 2004.

GREBE, S. F. Thiazolidinediones, PPAR gamma and thyroid cancer. **Frontiers in Thyroid Cancer**, ATA, Baltimore, USA, 2005.

GUAN, Y. F.; ZHANG, Y.H.; BREYER, R. M.; DAVIS, L.; BREYER, M. D. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) in Human Transitional Bladder Cancer and its Role in Inducing Cell Death Correspondence. **Neoplasia**. v. 4. p. 330-339. 1999.

HAKE, S. B.; XIAO, A.; ALLIS, C. D. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. **British Journal of Cancer**. v. 90. p. 761-69. 2004.

HAN, S.; ROMAN, J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPAR γ dependent and PPAR γ -independent signal pathways. **Mol Cancer Ther**, v.5, p.430–437. 2006.

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

HANEFELD, M.; MARX, N.; PFUTZNER, A.; BAURECHT, W.; LÜBBEN, G.; KARAGIANNIS, E.; STIER, U.; FORST, T. Anti-inflammatory effects of pioglitazone and/or simvastatin in high cardiovascular risk patients with elevated high sensitivity C-reactive protein: the PIOSTAT Study. **Journal of the American College of Cardiology**. 2007.

HEANEY, A. P. Novel pituitary ligands: peroxisome proliferator-activated receptor- γ . **Pituitary**, v. 6, p. 153-159. 2004.

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

HIRASE, N.; YANASE, T.; MU, Y. M.; MUTA, K.; UMEMURA, T.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Thiazolidinedione Induces Apoptosis and Monocytic Differentiation in the Promyelocytic Leukemia Cell Line HL60. **Oncology**.v. 57. p. 17-26.1999.

HUANG, E. H.; JOHNSON, L. A.; EATON, K.; HYNES, M. J.; CARPENTINO, J. E.; HIGGINS, P. D. Atorvastatin Induces Apoptosis In Vitro and Slows Growth of Tumor Xenografts but Not Polyp Formation in Min Mice. **Dig Dis Sci**. 26. 2009.

INSINGA, A.; MONESTIROLI, S.; RONZONI, S.; GELMETTI, V.; MARCHESI, F.; VIALE, A.; ALTUCCI, L.; NERVI, C.; MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Inhibitors of

histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. **Nature Medicine**, v.11(1), p.71-76. 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. 2009. **Estimativa 2010 Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>>. Acesso em: 20 julho de 2010.

ISENBERG, J. S.; JIA, Y.; FIELD, L.; RIDNOUR, L. A.; SPARATORE, A.; DEL SOLDATO, P.; SOWERS, A. L.; YEH, G. C.; MOODY, T. W.; WINK, D. A.; RAMCHANDRAN, R.; ROBERTS, D. D. Modulation of angiogenesis by dithiolethione-modified NSAIDs and valproic acid. **British Journal of Pharmacology**, 2007.

JABBOUR, E. J; GILES, F. J. New agents in myelodysplastic syndromes. **Current Hematology Reports**, v.4, p. 191-99. 2005.

JAKÓBISIAK, M; GOLĄB, J. Potential antitumor effects of statins (Review). **International Journal of Oncology** v. 23, p.1055-69. 2003.

JARRAR, M. H.; BARANOVA, A. PPARgamma activation by thiazolidinediones (TZDs) may modulate breast carcinoma outcome: the importance of interplay with TGFbeta signalling. **J Cell Mol Med**, v.11, p.71–87. 2007

JOHNSTONE, R. W; LICHT, J. D. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: Is transcription the primary target? **Cancer Cell**, v. 4, p. 13-18. 2003.

JONES, J.; JUENGEL, E.; MICKUCKYTE, A.; HUDAK, L.; WEDEL, S.; JONAS, D.; BLAHETA, R. A. The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters growth properties of renal cell carcinoma in vitro and in vivo. **J Cell Mol Med**. 13(8B): 2376-2385. 2008.

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

KAHN, B. B; FLIER, I. S. Obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106(4), p. 473-481, 2000.

KHANZADA, U.K.; PARDO, O.E.; MEIER, C.; DOWNWARD, J.; SECKL, M.J.; ARCARO, A. Potent inhibition of small-cell lung cancer cell growth by simvastatin reveals selective functions of Ras isoforms in growth factor signaling. **Oncogene**, v. 25, p. 877–887. 2006.

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

KAWAGOE, R.; KAWAGOE, H.; SANO, K. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspasedependent and -independent apoptotic signaling pathways. **Leukemia Research**. 26: 495-502. 2002.

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

KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R. **Essentials of Genetics**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, p. 431-449. 2002.

KOEFFLER, H. P. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and cancers. **clinical cancer research**, v. 9, p. 1-9, 2003.

KOTA, B. P.; HUANG, T. H-W.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 85-94, julho 2005.

KOUZARIDES, T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 9(1), p. 40-48. 1999.

KOYUTURK, M.; ERSOZ, M.; ALTIOK, N. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signaling through JNK. **Cancer Letters**. v. 250, p. 220–228. 2007.

KROWN, S.E.; CHAPMAN, P.B. Defining adequate surgery for primary melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 823- 825, 2004.

KHURANA, V.; BEJJANKI, H.R.; CALDITO, G.; OWENS, M.W. Statins reduce the risk of lung cancer in humans: a large casecontrol study of US veterans. **Chest**, v.131, p.1282–1288. 2007.

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

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

LANE, A. A.; CHABNER, B. A. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v.27(32), p.5459-5468. 2009.

LEHRMAN, G; HOGUE, I. B; PALMER, S; JENNINGS, C; SPINA, C. A; WIEGAND, A; LANDAY, A. L; COOMBS, R. W; RICHMAN, D. D; MELLORS, J. W; COFFIN, J. M; BOSCH, R. J; MARGOLIS, D. M. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. **Lancet**, v. 366(9485), p. 549-55. 2005.

LEHRMANN, H; PRITCHARD, L. L; HAREL-BELLAN, A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. **Advances in Cancer Research**, V. 86, p. 41-65. 2002.

LI, X. N.; SHU, Q.; SU, J. M.; PERLAKY, L.; BLANEY, S. M.; LAU, C. C. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. **Molecular Cancer Therapeutics**, 4: 1912–1922. 2005.

LI, M.; LEE, TW.; YIM, A. P.; MOK, T. S.; CHEN, G.G. Apoptosis induced by troglitazone is both peroxisome proliferator-activated receptor-gamma- and ERK-dependent in human non-small lung cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v.209, p.428–438. 2006.

LI, Y.; DENG, H.; ZHAO, J. M.; DAI, D.; TAN, X. Y. PPARγ pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. **World Journal of Gastroenterology**. v. 9(6). p. 1220- 1226. 2003.

LIAO, J. K., LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** v. 45. p. 89-118. 2005.

LIU, T.; KULJACA, S.; TEE, A.; MARSHALL, G. M. Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. **Cancer Treatment Reviews**. 32: 157–165. 2006.

LIZUKA, M.; SMITH, M. M. Functional consequences of histone modifications. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 13. p.154-60. 2003.

MAGGON, K. Best-selling human medicines 2002-2004. **Drug Discovery Today**, v.1;10(11), p.739-42. 2005.

MANTHA, A.J.; HANSON, J.E.; GOSS, G.; LAGARDE, A.E.; LORIMER, I.A.; DIMITROULAKOS, J. Targeting the mevalonate pathway inhibits the function of the epidermal growth factor receptor. **Clin. Cancer Res**, v.11, p. 2398–2407. 2005.

MARCHION, D.; MÜNSTER, P. Development of histone deacetylase inhibitors for cancer treatment. **Expert Review of Anticancer Therapy**. 7(4): 583–598. 2007.

MARGERON, R; TROJER, P; REINBERG, D. The key to development: interpreting the histone code? **Current Opinion in Genetics & Development**, v.15, p. 163-76. 2005.

MARKS, P. A. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. **Oncogene**. 26(9): 1351–1356. 2007.

MARKS, P. A; JIANG, X. Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. **Cell Cycle**, v. 4, p. 549-51. 2005.

MARTELLI, M. L.; IULIANO, R.; LE PERA, I.; SAMA, I.; MONACO, C.; CAMMAROTA, S.; KROLL, T.; CHIARIOTTI, L.; SANTORO, M.; FUSCO, A. Inhibitory effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on thyroid carcinoma cell growth. **J. Clin Endocrinol Metab**. 87:4728-4735. 2002.

MARTIROSYAN, A.; CLENDENING, J. W.; GOARD, C. A.; PENN, L. Z. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. **BMC Cancer**. 10:103. 2010.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **PLoS Med** 3(11): e442. 2006.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **PLoS Med**, v.3(11), p. e442. 2006.

MELLOR, J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. **Trends in Genetics**. v. 22(6). p. 320-29. 2006.

MERAL K, ERSOZ M & ALTIOK N. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and androgen receptor independent pathway requiring signalling through JNK. *Cancer Letters*. 250: 220-228. DOI:10.1016/j.canlet.2006.10.009. 2007.

MERSFELDER, E. L.; PARTHUN, M. R. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. **Nucleic Acids Research**. v. 34(9). p. 2653-662. 2006.

MICHALIK, L.; AUWERX, J.; BERGER, J. P.; CHATTERJEE, V. K.; GLASS, C. K.; MURPHY, G. J.; HOLDER, J. C. PPAR γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. **TIPS**, v. 21, n. 12, p. 469-474, dezembro 2000.

MINUCCI, S; PELICCI, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6(1), p. 38-51. 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 16: 55–63. 1983.

MUNSTER P, MARCHION D, BICAKU E, LACEVIC M, KIM J, CENTENO B, DAUD A, NEUGER A, MINTON S, SULLIVAN D. Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC. **clinical cancer research**. 15(7):2488-2496. 2009.

MURAKAMI, M; GOTO, T; SAITO, Y; GOTO, S; KOCHI, M; USHIO, Y. The inhibitory effect of simvastatin on growth in malignant gliomas - with special reference to its

local application with fibrin glue spray in vivo. **International Journal of Oncology**, v.19, p. 525-531. 2001.

NEWBOLD, A.; LINDEMANN, R. K.; CLUSE, L. A.; WHITECROSS, K. F.; DEAR, A. E.; JOHNSTONE, R. W. Characterisation of the novel apoptotic and therapeutic activities of the histone deacetylase inhibitor romidepsin. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.7(5), p.1066-1079. 2008.

NEWMAN, A; CLUTTERBUCK, R. D; POWLES, R. I; CATOVSKY, D; MILLAR, J. L. Strategies for overcoming p-glycoprotein-mediated drug resistance in acute myeloblastic leukaemia. **Leukemia and Lymphoma**, v. 24, p.533. 1997.

NUNEZ, N. P; LIU, H; MEADOWS, G. G. PPAR-gamma ligands and amino acid deprivation promote apoptosis of melanoma, prostate, breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 236, p. 133–141. 2006.

OHTA, K.; ENDO, T.; HARAGUCHI, K.; HERSHIMAN, J. M.; UNAYA, T. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells. **J Clin Endocrinol Metab**. 86(5): 2170-2177. 2001.

OKURA, T.; NAKAMURA, M.; TAKATA, Y.; WATANABE, S.; KITAMI, Y.; HIWADA, K. Troglitazone induces apoptosis via the p53 and Gadd45 pathway in vascular smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 407. p. 227–235, 2000.

PADDOCK, M. L; WILEY, S. E; AXELROD, H. L; COHEN, A. E; ROY, M; ABRESCH, E. C; CAPRARO, D; MURPHY, A. N; NECHUSHTAI, R; DIXON, J. E; JENNINGS, P. A. MitoNEET is a uniquely folded 2Fe 2S outer mitochondrial membrane protein stabilized by pioglitazone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104(36), p.14342-7, 2007.

PANNACCIULLI, N.; TATARANNI, A. P. Obesity, diabetes and energy metabolism. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**. v. 2. N°. 1. p. 1-5. 2007.

PARK , C.; LEE, I.; KANG, W. K. Lovastatin-induced E2F-1 modulation and its effect on prostate cancer cell death. **Carcinogenesis**. v. 22. p.1727–31. 2001.

PARK, J. W.; ZARNEGAR, R.; KANAUCHI, H.; WONG, M. G.; HYUN, W. C.; GINZINGER, D. G.; LOBO, M.; COTTER, P.; DUH, Q. Y.; CLARK, O. H. Troglitazone, the peroxisome proliferator- activated receptor-gamma agonist, induces antiproliferation and redifferentiation in human thyroid cancer cell lines. **Thyroid**. 15(3):222-31. 2005.

PARMIGIANI, R. B.; XU, W. S.; VENTA-PEREZ, G.; ERDJUMENT-BROMAGE H.; YANEVA, M.; TEMPST, P.; MARKS, P. A. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.15, p.105-128. 2008.

PATHIL, A.; ARMEANU, S.; VENTURELLI, S.; MASCAGNI, P.; WEISS, T. S.; GREGOR, M.; LAUER, U. M.; BITZER, M. HDAC inhibitor treatment of hepatoma cells induces both TRAIL independent apoptosis and restoration of sensitivity to TRAIL. **Hepatology**. 43: 425–434. 2006.

PÉREZ, L.; DANISHEFSKY, S.J. Chemistry and biology in search of antimetastatic agents. **ACS Chem. Biol.** 2: 159-162. 2007.

PETERSON, C. L.; LANIEL, M. A. Histones and histone modifications. **Current Biology's**. v. 14(4). p. 546-51. 2005.

RASHEED, W.; BISHTON, M.; JOHNSTONE, R. W.; PRINCE, H. M. Histone deacetylase inhibitors in lymphoma and solid malignancies. **Expert Review of Anticancer Therapy**. 8: 413–432. 2008.

ROSA, H. S.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **European Journal of Cancer**. v. 41. p. 2381-402. 2005.

ROSATO, R. R.; J. ALMENARA, A.; DAI, Y.; GRANT, S. Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, V.2, p.1273–1284. 2003.

ROSEN, E. D. PPAR is a required for differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Molecular Cell**, v. 4, p. 611-717, 1999.

ROSEN, E. D; SPIEGELMAN, B. M. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 37731-37734, 2001.

ROSENBERG, G. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? **Cellular and molecular life sciences**, v. 64(16), p. 2090-103. 2007.

ROTH, S. Y; DENU, J. M; ALLIS, C. D. Histone acetyltransferases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 81-120. 2001.

RUIZ, E.; REDONDO, S.; GORDILLO-MOSCOSO, A.; TEJERINA, T. Pioglitazone induces apoptosis in human vascular smooth muscle cells from diabetic patients involving the TGF-beta/ALK-4/5/7/Smad2 signaling pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 10. p. 1124. 2007.

SASSANO, A; PLATANIAS, L. C. Statins in tumor suppression. **Cancer Letters**, v. 260, p. 11-19. 2008.

SATOH, T.; TOYODA, M.; HOSHINO, H.; MONDEN, T.; YAMADA, M.; SHIMIZU, H.; MIYAMOTO, K.; MORI, M. 1 Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-g stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in nonsmall cell lung carcinoma cells. **Oncogene**. v. 21. p. 2171-2180. 2002.

SATOH, T.; TOYODA, M.; HOSHINO, H.; MONDEN, T.; YAMADA, M.; SHIMIZU, H.; MIYAMOTO, K.; MORI, M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells. **Oncogene**, v.21, p.2171–2180. 2002.

SCHMIDT, F.; GROSCURTH, P.; KERMER, M.; DICHGANS, J.; WELLER, M. Lovastatin and phenylacetate induce apoptosis, but not differentiation, in human malignant glioma cells. **Acta Neuropathol**. v. 101. p. 217–24. 2001.

SEGAWA, Y.; YOSHIMURA, R.; HASE, T. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. **Prostate**, v. 51, p. 108-116, 2002.

SHAO, Y.; GAO, Z.; MARKS, P. A.; JIANG, X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, p.18030–18035. 2004.

SHEPHERD, J. The role of the exogenous pathway in hypercholesterolaemia. **European Heart Journal Supplements**. V. 3. p. E2–E5. 2001.

SHEPHERD, J.; COBBE, S. M. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). **New England Journal of Medicine**; v. 333, p. 1301-7. 1995.

SILVA, E. D.; MORAES, T. M. Controle da dor. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR., H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia Atual: Um Enfoque Multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000.

SLATER, S.F., SAWTER, R., STRAULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase system III. Points of coupling of different tetrazolium salts. **Biochemical et Biophysica Acta**, v.77, p. 383-393, 1963.

SMYTH, M. J.; DUNN, G. P.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Advances in Immunology**, v. 90, p. 1-50. 2006.

SPANDIDOS, D. A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. **Journal of Buon**, v.12 Suppl 1, p.S9 – 12, 2007.

SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P.G. **Oncology**, Oxford University Press, Oxford, p.536, 2001.

STAAL, A.; FRITH, J. C.; FRENCH, M. H.; SWARTZ, J.; GÜNGÖR, T.; HARRITY, T. W.; TAMASI, J.; ROGERS, M. J.; FEYEN, J. H. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 18(1). p. 88-96. 2003.

STIENSTRA, R.; DUVAL, C.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. PPARs, obesity, and inflammation. **PPAR Research**, v. 2007:95974, 2007.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends in Immunology**, v. 28, n.12, p. 551-558, novembro 2007.

SUTHEESOPHON, K.; NISHIMURA, N.; KOBAYASHI, Y.; FURUKAWA, Y.; KAWANO, M.; ITOH, K.; KANO, Y.; ISHII, H. Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228), **Journal of Cellular Physiology**, v. 203,p. 387–397. 2005.

TALLARIDA, R. Drug synergism: Its detection and applications. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.298, p.865-872. 2001

THIAGALINGAM, S; CHENG, K. H; LEE, H. J; MINEVA, N; THIAGALINGAM, A; PONTE, J. F. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 983, p. 84-100. 2003.

TONTONOZ, P.; HU, E.; GRAVES, R. A.; BUDAVARI, A. I.; SPIEGELMAN, B. M. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes & Development**, v. 8, p. 1224-1234, 1994.

TONTONOZ, P; NAGY, L; ALVAREZ, J. G; THOMAZY, V. A; EVANS, R. M. PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. **Cell**, v. 93, p. 241-252, 1998.

TSUBOUCHI, Y.; SANO, H.; KAWAHITO, Y.; MUKAI, S.; YAMADA, R.; KOHNO, M.; INOUE, K.; HLA, T.; KONDO, M. Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 270, p. 400–405. 2000.

VALENTINI, A.; GRAVINA, P.; FEDERICI, G.; BERNARDINI, S. Valproic Acid Induces Apoptosis, p(16INK4A) Upregulation and Sensitization to Chemotherapy in Human Melanoma Cells. **Cancer Biology and Therapy**. 6: 185–191. 2007.

VAUGHAN, C. J; GOTTO, A. M; BASSON, C.T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**. v.35 p.1-10. 2000.

WALSH, K. M.; ALBASSAM, M. A.; CLARKE, D. E. Subchronic toxicity of atorvastatin, a hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor, in beagle dogs. **Toxicol Pathol**. 24(4):468-76. 1996.

WANG, W.; MACAULEY, R. Mevalonate prevents lovastatin-induced apoptosis in medulloblastoma cell lines. **Canadian Journal of Neurological Sciences**. v. 26. p.305–10. 1999.

WERMUTH, C. G. **The Practise of Medicinal Chemistry**. Academic Press: San Diego. p. 243 e 304. 1996.

WIERZBICKI, A. S. MIKHAILIDIS, D. P. WRAY, R. SCHACHTER, M. CRAMB, R. SIMPSON, W. G. BYRNE, C. B. Diabetic dyslipidaemia: the triad. **Current Medical Research and Opinion**. v. 19. p.155. 2003.

World Health Organization. Cancer (WHO). Fact sheet n° 297. Feb 2009. [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>.

YANG, F. G.; ZHANG, Z. W.; XIN, D. Q.; SHI, C. J.; WU, J. P.; GUO, Y. L.; GUAN, Y. F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, p. 753–761. 2005.

YAO, C. J.; LAI, G. M.; CHAN, C.F.; CHENG, A. L.; YANG, Y. Y.; CHUANG, S. E. Dramatic synergistic anticancer effect of clinically achievable doses of lovastatin and troglitazone. **International Journal of Cancer**. 118(3):773-9. 2005.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 6. p. 37-50. 2006.

YU, S.; REDDY, J. K. Transcription coactivators for peroxisome proliferator activated receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 936-951, agosto 2007.

YUAN, Z. L.; GUAN, Y. J.; CHATTERJEE, D.; CHIN, Y. E. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. **science**. v. 307. p. 269-73. 2005.

ZANG, C.; LIU, H.; WAECHTER, M.; EUCKER, J.; BERTZ, J.; POSSINGER, K.; KOEFFLER, H. P.; ELSTNER, E. Dual PPARalpha/ gamma ligand TZD18 either alone or in combination with imatinib inhibits proliferation and induces apoptosis of human CML cell lines. **Cell Cycle**. 5:2237–2243. 2006.

ZHANG, Y. Q.; TANG, X. Q.; SUN, L.; DONG, L.; QIN, Y.; LIU, H. Q.; XIA, H.; CAO, J. G. Rosiglitazone enhances fluorouracil-induced apoptosis of HT-29 cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **World Journal of Gastroenterology**. 13:1534–1540. 2007.

ZHANG, W; ZHANG, H; XING, L. Influence of ciglitazone on A549 cells growth in vitro and in vivo and mechanism. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, v. 26, p. 36–39. 2006.