



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Engenharia

Departamento de Engenharia Nuclear

Programa de Pós-graduação em Ciências e Técnicas Nucleares

Igor Temponi Costa

**AVALIAÇÃO DA SINERGIA ENTRE *Curcuma longa* E *Piper nigrum* NA
RADIOSENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS DA LINHAGEM
MDA-MB-231**

Belo Horizonte

2021

Igor Temponi Costa

**AVALIAÇÃO DA SINERGIA ENTRE *Curcuma longa* E *Piper nigrum* NA
RADIOSENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS DA LINHAGEM
MDA-MB-231**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Técnicas Nucleares da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências e Técnicas Nucleares.

Área de concentração: Ciências das Radiações.

Orientador: Prof. Dr. Tarcísio Passos Ribeiro de Campos.

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Vieira de Lima.

Belo Horizonte

2021

C837a

Costa, Igor Temponi.

Avaliação da sinergia entre *Curcuma longa* e *Piper nigrum* na radiosensibilização de células neoplásicas da linhagem MDA-MB-231 [recurso eletrônico] / Igor Temponi Costa. - 2021.

1 recurso online (142 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Tarcísio Passos Ribeiro de Campos.

Coorientador: Celso Vieira de Lima.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Anexos: f. 120-142.

Bibliografia: f. 106-119.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia nuclear - Teses. 2. Cúrcuma - Teses. 3. Pimenta-do-reino - Teses. 4. Curcumina - Teses. 5. Fitoterápicos - Teses. I. Campos, Tarcísio Passos Ribeiro de. II. Lima, Celso Vieira de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 621.039(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES



FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA SINERGIA ENTRE Curcuma longa E Piper nigrum NA
RADIOSENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS DA LINHAGEM MDA-MB-231

IGOR TEMPONI COSTA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de PósGraduação em CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES, área de concentração CIÊNCIAS DAS RADIAÇÕES.

Aprovada em 20 de maio de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Tarcisio P.R. Campos

Prof. Tarcisio Passos Ribeiro de Campos - Orientador
Departamento de Engenharia Nuclear - UFMG

Luciana Batista Nogueira

Profa. Luciana Batista Nogueira
Departamento de Anatomia e Imagem - UFMG


Dr. Bruno Melo Mendes
CDTN/CNEN


Prof. Ronicele Pereira da Rocha
Universidade do Estado do Mato Grosso

Belo Horizonte, 20 de maio de 2021.

Dedico este trabalho à minha mãe, sempre a maior incentivadora, neste e em tantos outros projetos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Tarcísio Passos. Não poderia deixar de agradecê-lo em primeiro lugar, por ser não só meu orientador neste trabalho, mas também em grande parte de minha carreira. Agradeço toda a atenção, toda a confiança, toda a compreensão, principalmente durante os últimos meses, e por ter sido sempre um exemplo de dedicação profissional.

À minha família, que é porto seguro. Aos meus pais pelo alicerce onde hoje edifico o que sou e o que busco ser. Aos meus irmãos que, apesar do distanciamento, estão sempre presentes e na torcida.

À Lívia Lourenço, que me motivou por todo esse processo e que, com seu sorriso constante, ilumina nossa convivência e faz a vida mais leve.

Ao Dr. Celso Vieira, pela ajuda fundamental no estabelecimento das culturas celulares e por todo o suporte à parte experimental desse trabalho.

À Dra. Laura Ciribelli, que contribuiu com valiosos ensinamentos sobre estequiometria e técnicas laboratoriais.

À Dra. Mariana Lourenço, pelas aulas de manipulação de culturas, indispensáveis para a condução do ensaio.

À Dra. Telma Fonseca, pelas contribuições tão importantes no começo desse projeto.

À Dra. Patrícia Falcão, pelas poucas e boas conversas e por todas as dicas científicas.

Aos colegas do laboratório atuais e passados, especialmente à velha guarda: Ireda Lana, Larissa Thompson, Janine Muniz, Andrea Silva, Luciana Batista e João Paulo Lopes, que fizeram do NRI um ambiente tão prazeroso no início dessa caminhada, que remonta a mais de 15 anos.

Aos profissionais do CDTN que possibilitaram a execução desse projeto e a todos os profissionais do Departamento de Engenharia Nuclear e da UFMG que, direta ou indiretamente, são indispensáveis para o funcionamento de nossa Universidade.

“Pois como a medicina é um compêndio dos erros sucessivos e contraditórios dos médicos, recorrendo aos melhores destes, corre-se o risco de solicitar uma verdade que será reconhecida falsa alguns anos mais tarde. De modo que acreditar na medicina seria a suprema loucura se não acreditar nela não fosse loucura ainda maior, pois desse amontoado de erros se desvencilharam com o tempo algumas verdades” (Marcel Proust, O Caminho de Guermantes, 1920)

Resumo

A *Curcuma longa* e a *Piper nigrum* são plantas medicinais originárias do sudeste asiático, apresentando emprego milenar nessa região e tendo se difundido pelo mundo nos últimos séculos. A Curcumina e a Piperina, princípios ativos desses vegetais, têm atraído interesse científico crescente, à medida que seus efeitos terapêuticos são elucidados. Ambos já demonstraram propriedades bactericidas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antineoplásicas, além de atividade radioprotetora e radiosensibilizante. O emprego das espécies em associação é observado recorrentemente, uma vez que a Piperina é um potencializador da biodisponibilidade da Curcumina. O presente trabalho objetivou avaliar a sinergia dos dois fitoterápicos como agentes radiosensibilizadores da linhagem celular neoplásica e radorresistente MDA-MB-231. Secundariamente, foram analisadas as propriedades radiosensibilizantes da Curcumina e Piperina em seu emprego isolado, assim como a sinergia dos dois compostos como antineoplásicos. Paralelamente, objetivou-se ainda o desenvolvimento de um protocolo não destrutivo de contagem celular. As propriedades dos fitoterápicos foram avaliadas através de ensaio *in vitro*, com dois conjuntos de análise, cada um com quatro culturas celulares da linhagem MDA-MB-231. Cada conjunto foi elaborado com uma cultura Controle, uma segunda cultura exposta à Curcumina isolada, na concentração 8 μ mol/L, uma terceira exposta à Piperina isolada, na concentração 40 μ mol/L, com uma quarta cultura exposta à associação de Curcumina+Piperina, nas concentrações 7 μ mol/L e 35 μ mol/L respectivamente. As culturas do primeiro conjunto foram irradiadas com fonte de Cobalto-60, empregando-se dose de 5Gy. Já as culturas do segundo conjunto não foram irradiadas. As oito culturas foram acompanhadas em cinética temporal através de imagens digitais de microscopia, com a utilização do software ImageJ para contagem estimativa do número de células por campo. A Curcumina e a Piperina demonstraram efeitos radiosensibilizantes quando empregadas isoladamente, assim como quando associadas. Nos tempos de observação 6h, 12h e 24h após irradiação, a Curcumina isolada induziu contagens celulares 35,6%, 39,4% e 39,7% inferiores ao Controle. A Piperina isolada induziu contagens 10,3%, 21,9% e 8,9% inferiores ao Controle, com a última contagem não apresentando relevância estatística. Já associação Curcumina+Piperina apresentou resultados 10,4%, 7,4% e 42,6% menores que o Controle, não sendo observada relevância estatística na segunda

contagem. Após 36h de evolução não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Ao longo do ensaio não foi constatado efeito sinérgico entre os compostos, assim como não foram observadas propriedades antineoplásicas em nenhuma das condições estudadas. O protocolo de contagem celular se mostrou eficiente, sendo usado ao longo de todo o experimento. Esse, no entanto, apesar de promissor, deve ser aperfeiçoado, uma vez que a precisão da análise reduz com o avançar da cinética temporal. Novos ensaios empregando concentrações variáveis de Curcumina e Piperina permitirão o aperfeiçoamento do protocolo de contagem celular e a determinação da ausência de sinergia entre a *Curcuma longa* e a *Piper nigrum*, permitindo avaliar, inclusive, um possível efeito de dupla inibição entre os fitoterápicos.

Palavras-chave: Cúrcuma, Turmérico, Pimenta-do-reino, Pimenta-preta, Curcumina, Piperina, fitoterápicos, radiosensibilizantes.

Abstract

Curcuma longa and *Piper nigrum* are medicinal plants originated on Southeast Asia. For thousands of years, they are being used in this region, becoming popular worldwide in the last centuries. Curcumin and Piperine, active principles of these vegetals, attract growing scientific interest, as their therapeutic effects are elucidated. They have both shown properties as antibacterials, anti-inflammatories, antioxidants, antineoplastics, as well as radioprotectants and radiosensitizers. The use of these species in association is commonly observed, as Piperine enhances the bioavailability of Curcumin. The objective of this study was to evaluate the synergy of these two phytotherapies as radiosensitizing agents on the neoplastic and radioresistant MDA-MB-231 cell line. Secondarily, the radiosensitizing properties of Curcumin and Piperine, when used isolated, as well as their antineoplastic properties were evaluated. In parallel, it aimed on developing a nondestructive cell counting protocol. The phytotherapies properties were studied through an *in vitro* essay, with two analysis groups, each one with four MDA-MB-231 cell cultures. Each group was composed of one Control culture, a second culture exposed to isolated Curcumin, in 8 μ mol/L concentration, a third exposed to isolated Piperine, in 40 μ mol/L concentration, and a fourth culture exposed to the Curcumin+Piperine association, in 7 μ mol/L and 35 μ mol/L concentrations respectively. The cultures on the first group were irradiated with a Cobalt-60 source, with a 5Gy dose. The cultures on the second group were not exposed to radiation. All the eight cultures were followed up in time kinetics with digital microscopy images, using the software ImageJ to estimate the number of cells in each field. Curcumin and Piperine demonstrated radiosensitizing effects when used isolated, as well as in association. On the periods 6h, 12h and 24h post irradiation, isolated Curcumin led to cell counts 35,6%, 39,4% and 39,7% lower than Control. Isolated Piperine led to cell counts 10,3%, 21,9% and 8,9% lower than Control, but the last observation showed no statistic relevance. The Curcumin+Piperine association resulted in cell counts 10,4%, 7,4% and 42,6% lower than Control, but the second observation showed no statistic relevance. After 36h of evolution, there were no other measurements with statistic relevance in any of the study groups. No synergic effect between the compounds, as well as no antineoplastic properties, were observed in any of the study conditions. The cell counting protocol was efficient, being used throughout the whole experiment. However, even though promising, the protocol should be

improved, since the analysis precision reduces as temporal kinetics advance. New essays using variable concentrations of Curcumin and Piperine will allow the improvement of the cell counting protocol, and the proper determination of the absence of synergy between *Curcuma longa* and *Piper nigrum*, also allowing the evaluation of a possible double inhibition effect of the phytotherapics.

Keywords: Turmeric, Black pepper, Curcumin, Piperine, phytotherapics, radiosensitizers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 3-1: Percentual de mortes mundiais em 2017, separadas por causa | 18 |
| Figura 3-2: Imagens da espécie <i>Curcuma longa</i> | 24 |
| Figura 3-3: Imagem do rizoma e do preparado em pó da <i>Curcuma longa</i> | 24 |
| Figura 3-4: Estrutura tridimensional da Curcumina. | 25 |
| Figura 3-5: Estrutura química da Curcumina. | 25 |
| Figura 3-6: Estruturas químicas dos curcuminóides: diferuloilmetano (1), demetoxicurcumina (2) e bisdemetoxicurcumina (3) | 26 |
| Figura 3-7: Gráfico do número de trabalhos científicos relacionados à Curcumina publicados por ano de 1943 a 2019. | 27 |
| Figura 3-8: Ilustração dos alvos moleculares da Curcumina | 30 |
| Figura 3-9: Pimenta-preta colhida em diferentes estágios de maturação. | 32 |
| Figura 3-10: Estrutura química da Piperina. | 34 |
| Figura 3-11: Estrutura tridimensional da Piperina. | 34 |
| Figura 3-12: Gráfico evidenciando os efeitos dose dependentes da Curcumina na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231. | 42 |
| Figura 3-13: Gráfico evidenciando os efeitos dose dependentes da Piperina na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231. | 42 |
| Figura 5-1: Alvos moleculares modulados pela Curcumina. | 60 |
| Figura 5-2: Processos de sinalização de citocinas pela Piperina | 64 |
| Figura 6-1: Fotografia digital do Grupo Piperina, Campo 1, em T2:12h após a irradiação. | 70 |
| Figura 6-2: Fotografia digital do campo observado na Figura 6-1, após sua conversão em arquivo para o formato 8 bits. | 70 |
| Figura 6-3: Fotografia digital Grupo Curcumina, Campo 1, em T1:6h antes e após o ajuste de contraste e brilho. As setas vermelhas indicam os extremos do histograma, utilizados como limites máximos e mínimos. | 71 |
| Figura 6-4: Fotografia digital do Grupo Curcumina, Campo 1, em T1:6h, antes e após a aplicação do Filtro de dilatação de níveis de cinza (<i>Grayscale Dilation</i>). | 72 |
| Figura 6-5: Fotografia digital do Grupo Curcumina, Campo 1, em T1:6h, antes e após a aplicação do processo de determinação de máximos de luminância com a contagem estimativa do número de células no campo (2597 contagens). | 73 |

| | |
|--|----|
| Figura 6-6: Fotografia digital do Grupo Curcumina, Campo 1, em T1:6h, ilustrando a aplicação do processo de determinação de máximos de luminância, com nível de tolerância 5 à esquerda (3047 contagens) e 15 à direita (2203 contagens). | 74 |
| Figura 7-1: Grupo Controle Não Irradiado 6h após início do ensaio, evidenciando a confluência da cultura celular. | 76 |
| Figura 7-2: Grupo Controle não irradiado 84h após o início do ensaio, evidenciando a confluência da cultura celular. | 76 |
| Figura 7-3: Contagens celulares dos 4 campos da cultura referentes ao Grupo CON+5Gy. | 77 |
| Figura 7-4: Contagens celulares dos 4 campos da cultura referentes ao Grupo CUR+5Gy, concentração 8 $\mu\text{mol/L}$ | 78 |
| Figura 7-5: Contagens celulares dos 4 campos da cultura referentes ao Grupo PIP+5Gy, concentração 40 $\mu\text{mol/L}$ | 79 |
| Figura 7-6: Contagens celulares dos 4 campos da cultura referentes ao Grupo CUR+PIP+5Gy, concentrações 7 $\mu\text{mol/L}$ e 35 $\mu\text{mol/L}$ | 80 |
| Figura 7-7: Gráficos das médias de contagens celulares dos 4 campos de cada um dos grupos irradiados. | 81 |
| Figura 7-8: Gráfico das médias das contagens celulares dos 4 campos de cada um dos grupos irradiados plotado em eixo único. Concentrações: CUR+5Gy: 8 $\mu\text{mol/L}$, PIP+5Gy: 40 $\mu\text{mol/L}$ CUR+PIP+5Gy: 7 $\mu\text{mol/L}$ e 35 $\mu\text{mol/L}$ | 82 |
| Figura 7-9: Variação das contagens celulares dos grupos 6h pós irradiação. | 83 |
| Figura 7-10: Teste de Tukey 6h pós irradiação. | 83 |
| Figura 7-11: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 6h pós irradiação. | 84 |
| Figura 7-12: Variação das contagens celulares dos grupos 12h pós irradiação. | 85 |
| Figura 7-13: Teste de Tukey 12h pós irradiação. | 85 |
| Figura 7-14: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 12h pós irradiação. | 86 |
| Figura 7-15: Variação das contagens celulares dos grupos 24h pós irradiação. | 87 |
| Figura 7-16: Teste de Tukey 24h pós irradiação. | 87 |
| Figura 7-17: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 24h pós irradiação. | 88 |
| Figura 7-18: Variação das contagens celulares dos grupos 36h pós irradiação. | 89 |
| Figura 7-19: Teste de Tukey 36h pós irradiação. | 89 |

| | |
|---|----|
| Figura 7-20: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 36h pós irradiação. | 90 |
| Figura 7-21: Variação das contagens celulares dos grupos 48h pós irradiação. | 90 |
| Figura 7-22: Teste de Tukey 48h pós irradiação. | 91 |
| Figura 7-23: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 48h pós irradiação. | 91 |
| Figura 7-24: Variação das contagens celulares dos grupos 60h pós irradiação. | 92 |
| Figura 7-25: Teste de Tukey 60h pós irradiação. | 92 |
| Figura 7-26: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 60h pós irradiação. | 93 |
| Figura 7-27: Variação das contagens celulares dos grupos 72h pós irradiação. | 93 |
| Figura 7-28: Teste de Tukey 72h pós irradiação. | 94 |
| Figura 7-29: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 72h pós irradiação. | 94 |
| Figura 7-30: Variação das contagens celulares dos grupos 84h pós irradiação. | 95 |
| Figura 7-31: Teste de Tukey 84h pós irradiação. | 95 |
| Figura 7-32: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 84h pós irradiação. | 96 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 6-1: Grupos de culturas celulares usados no ensaio e análises relacionadas. | 68 |
| Tabela 8-1: Valores de IC50 obtidos em ensaios com o emprego de Curcumina em culturas da linhagem MDA-MB-231..... | 97 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|---|
| AINE | Anti-inflamatório não esteroidal |
| ANOVA | Análise de variância |
| CDTN | Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear |
| <i>CON+5Gy</i> | Grupo experimental controle irradiado |
| <i>CON-NIR</i> | Grupo experimental controle não irradiado |
| COX | Ciclo-oxigenase |
| CUR | Curcumina |
| <i>CUR+5Gy</i> | Grupo experimental Curcumina irradiado |
| <i>CUR-NIR</i> | Grupo experimental Curcumina não irradiado |
| <i>CUR+PIP+5Gy</i> | Grupo experimental curcumina e piperina associados irradiado |
| <i>CUR+PIP-NIR</i> | Grupo experimental curcumina e piperina não irradiado |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| ER | Receptor de estrogênio |
| GM-CSF | Fator estimulador de colônias granulócitos-macrófagos |
| HER-2 | Receptores do fator de crescimento epitelial humano tipo 2 |
| IC ₅₀ | 50% da concentração inibitória máxima |
| LINAC | Linear particle accelerator |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MAPK | Mitogen activated protein kinase |
| MMP-1 | Matrix metalloproteinase-1 |
| MTT | Teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina |
| NRI | Núcleo de Radiações Ionizantes |
| PIP | Piperina |
| <i>PIP+5Gy</i> | Grupo experimental piperina irradiado |
| <i>PIP-NIR</i> | Grupo experimental piperina não irradiado |
| PR | Receptor de progesterona |
| PTV | Volume alvo prescrito |
| RT | Radioterapia |
| SBF | Soro fetal bovino |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TNBC | Câncer de mama triplo-negativo |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 16 |
| 2.1. Objetivo principal..... | 16 |
| 2.2. Objetivos secundários | 16 |
| 3. RADIOTERAPIA E FITOTERÁPICOS RADIOMODULADORES | 17 |
| 3.1. A cancerologia e a radioterapia..... | 17 |
| 3.1.1. O câncer..... | 17 |
| 3.1.2. A radioterapia..... | 19 |
| 3.1.3. Os radioprotetores e os radiosensibilizantes | 21 |
| 3.2. A <i>Curcuma longa</i> | 22 |
| 3.2.1. A Cúrcuma | 22 |
| 3.2.2. A Curcumina | 24 |
| 3.2.3. A biodisponibilidade da Curcumina | 30 |
| 3.3. A <i>Piper nigrum</i> | 32 |
| 3.3.1. A Pimenta-Preta | 32 |
| 3.3.2. A Piperina | 33 |
| 3.3.3. A Piperina como potencializador de biodisponibilidade..... | 36 |
| 3.4. A sinergia entre Curcumina e Piperina | 38 |
| 3.5. A linhagem celular MDA-MB-231 | 40 |
| 4. APLICAÇÕES DA CURCUMINA EM RADIOTERAPIA..... | 44 |
| 4.1. Introduction | 44 |
| 4.2. Methodology | 46 |
| 4.3. Results..... | 46 |
| 4.3.1. Head and neck | 47 |
| 4.3.2. Cardiopulmonary system..... | 47 |
| 4.3.3. Genitourinary system | 48 |
| 4.3.4. Gastrointestinal system | 49 |
| 4.3.5. Radiotherapy side effects | 49 |

| | |
|---|----|
| 4.4. Conclusions | 50 |
| 5. A CURCUMINA E A PIPERINA NA MODULAÇÃO DE CITOCINAS E SEU PAPEL NA RADIOTERAPIA | 52 |
| 5.1. Introdução | 52 |
| 5.2. As citocinas e a resposta inflamatória sistêmica | 53 |
| 5.3. Classificação das citocinas | 53 |
| 5.3.1. Interferons e Adipocinas..... | 53 |
| 5.3.2. Interleucinas | 54 |
| 5.3.3. Fatores de necrose tumoral..... | 54 |
| 5.3.4. O papel do fator de transcrição NF-κB e do inibidor IκB..... | 55 |
| 5.4. O papel das citocinas na cancerologia e radioterapia | 56 |
| 5.4.1. IL-6 e IL-10 plasmático e Linfoma de Hodgkin | 56 |
| 5.4.2. Expressão de Interleucinas pós procedimentos de radioterapia | 56 |
| 5.4.3. IL-6, IL-10 e TNF preditores dos efeitos deletérios da radioterapia | 57 |
| 5.4.4. Elevação da IL-6 no microambiente tumoral | 57 |
| 5.4.5. Paradoxo da IL-6 | 58 |
| 5.4.6. Potencial das IL-2 e IL-12 na radioterapia..... | 58 |
| 5.4.7. Correlação da IL-8 com o prognóstico em radioterapia de pulmão..... | 59 |
| 5.4.8. Interleucinas e mucosite..... | 59 |
| 5.5. Fitoterápicos como agentes moduladores de citocinas | 59 |
| 5.5.1. Efeitos da Curcumina na expressão de citocinas | 60 |
| 5.5.2. Efeitos da Piperina na expressão de citocinas | 63 |
| 5.6. Considerações finais | 65 |
| 6. MATERIAIS E MÉTODOS | 66 |
| 6.1. Principais materiais | 66 |
| 6.2. Métodos | 66 |
| 7. RESULTADOS | 75 |
| 8. DISCUSSÃO | 97 |
| 8.1. Das concentrações das substâncias de interesse | 97 |
| 8.2. Dos grupos não irradiados | 98 |

| | |
|--|-----|
| 8.3. Dos grupos irradiados | 99 |
| 8.4. Do protocolo computacional de contagem celular | 102 |
| 9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 104 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 106 |
| ANEXOS | 120 |
| ANEXO A – Artigo: Prospects of the application of curcumin in radiation therapy | 120 |
| ANEXO B – Artigo: A curcumina e a piperina na modulação de citocinas e seu papel na radioterapia – uma revisão | 129 |

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O câncer é um desafio imenso para os sistemas de saúde de todo o mundo. O que antes era visto como uma morbidade restrita às populações de alta renda, já é enfrentado agora como um problema emergente e crítico para países com rendas baixa e média. As estatísticas oncológicas são reportadas com 2 a 3 anos de atraso, devido ao tempo necessário para a coleta e processamento dos dados. As informações consolidadas para 2017 mostram as neoplasias como segunda principal causa de morte nos EUA, quadro semelhante ao projetado para 2020 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, mais de 18 milhões de novos casos desse grupo de doenças foram diagnosticados em 2018. Mais de 9,6 milhões de pacientes foram a óbito no mesmo ano por evolução da morbidade. Projeções para o ano de 2040 indicam um enorme aumento no fardo social da doença, com uma perspectiva de mais de 29 milhões de pessoas acometidas (WHO, 2020). Em nosso país, o Ministério da Saúde projeta, para o ano de 2020, o diagnóstico de mais de 685 mil novos casos, tendo sido constatados 224.712 óbitos pela doença em 2018 (INCA 2020).

As neoplasias podem abordadas basicamente por quatro estratégias terapêuticas: a cirúrgica, a quimioterapia, a terapia biológica e a radioterapia (RT). Esta última tem um papel relevante, uma vez que compõe aproximadamente 50-70% das combinações terapêuticas aplicadas nos tratamentos. Visando reduzir a ausência de assistência em RT em parte do território brasileiro, foi estabelecido, em 2012, o Plano de Expansão da Radioterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), projeto ainda em execução, que propõe aumentar significativamente o número de procedimentos realizados nessa modalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A otimização da distribuição de dose no volume alvo prescrito (PTV), preservando os órgãos de risco adjacentes, e maior eficácia biológica da dose aplicada são temas abordados ao longo da evolução tecnológica da RT. A adequação da distribuição de dose foi inicialmente obtida com a produção de feixes de fótons mais penetrantes, de altas energias (4-20MV), evoluindo para o uso da terapia com elétrons energéticos (8-50MeV), seguindo consecutivamente para a aplicação de feixes de prótons (65-250MeV) e íons de carbono-12 como carreadores enérgicos nos procedimentos, com

o suporte da tecnologia instrumental e computacional (AMALDI; KRAFT, 2005). A melhoria da eficácia biológica, por sua vez, tem sido abordada através de substâncias ou terapias radiosensibilizantes, que não devem ser confundidas com a quimioterapia, que frequentemente é empregada de forma adjuvante, não tendo, no entanto, ação de potencialização do efeito das radiações em si (WARDMAN, 2007).

O estudo de radiosensibilizadores mais eficazes é especialmente interessante para nações que não dispõem de tecnologias radioterapêuticas modernas. O custo de instalação de centros de tratamento mais avançados, como os de íons de carbono ou prótons, por exemplo, é extremamente elevado, e o uso de radiosensibilizadores pode se apresentar como a única forma de melhorar a eficácia dos procedimentos de RT fornecidos a populações carentes. Podemos observar essa situação no projeto brasileiro de expansão da radioterapia, que prevê a criação ou ampliação de 80 centros de tratamento, todos eles limitados a terapias por raios X, e apenas 10 contando com o recurso da braquiterapia, não havendo sequer a previsão da instalação de centros de padrão internacional, como os de tratamentos por prótons, no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Assim, o desenvolvimento de substâncias radiosensibilizadoras se torna ainda mais valioso para a sociedade, sendo que, assim como uma substância radioprotetora ideal, pode-se estabelecer que um composto radiosensibilizador ideal deverá: ter baixa toxicidade, ser de fácil administração (preferencialmente oral), ter baixo custo de produção, ser estável ao armazenamento e aumentar satisfatoriamente o efeito da radiação sobre o tumor alvo (GUDKOV; POPOVA; BRUSKOV, 2015).

Os nutracêuticos, fitoquímicos com propriedades farmacológicas, ganham cada vez mais atenção por todo o mundo, ante seu potencial nutricional, sua segurança e seus efeitos terapêuticos, já sendo empregados em uma vasta gama de morbidades (KAUR; INVALLY; CHINTAMANENI, 2016). Diante da importância do desenvolvimento de radiosensibilizadores eficazes, e frente às características buscadas nessas substâncias, constatamos que os dois fitoterápicos, focos do presente trabalho, aparecem como interessantes candidatos para esse papel. A Curcumina e a Piperina são os princípios ativos da Cúrcuma e da Pimenta-Preta respectivamente. Ambos compostos já são amplamente utilizados por todo o mundo, apresentando baixíssimo perfil de toxicidade. São derivados de plantas cultivadas há

milênios, tendo baixo custo final e sendo estáveis à estocagem. Estudos mostrando a eficácia dessas substâncias na área de cancerologia têm sido realizados há décadas (ZHENG et al., 2016) e, nesse contexto, como contribuição científica, o presente trabalho busca avaliar as potencialidades e a capacidade sinérgica da Curcumina e da Piperina quando empregadas como agentes radiosensibilizadores e antineoplásicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliar o potencial de sinergia entre a Curcumina e a Piperina como agentes radiosensibilizantes na linhagem celular MDA-MB-231.

2.2. Objetivos secundários

. Investigar a reprodutibilidade do efeito radiosensibilizante da Curcumina isolada para a linhagem celular MDA-MB-231, nas condições laboratoriais do Núcleo de Radiações Ionizantes (NRI) da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais.

. Investigar propriedades radiosensibilizantes da Piperina isolada para a linhagem MDA-MB-231.

. Investigar a possível sinergia da Curcumina e Piperina como agentes antineoplásicos na linhagem de interesse.

. Estabelecer um protocolo para um processo não destrutivo de contagem celular em culturas, utilizando ferramentas computacionais.

3. RADIOTERAPIA E FITOTERÁPICOS RADIOMODULADORES

3.1. A cancerologia e a radioterapia

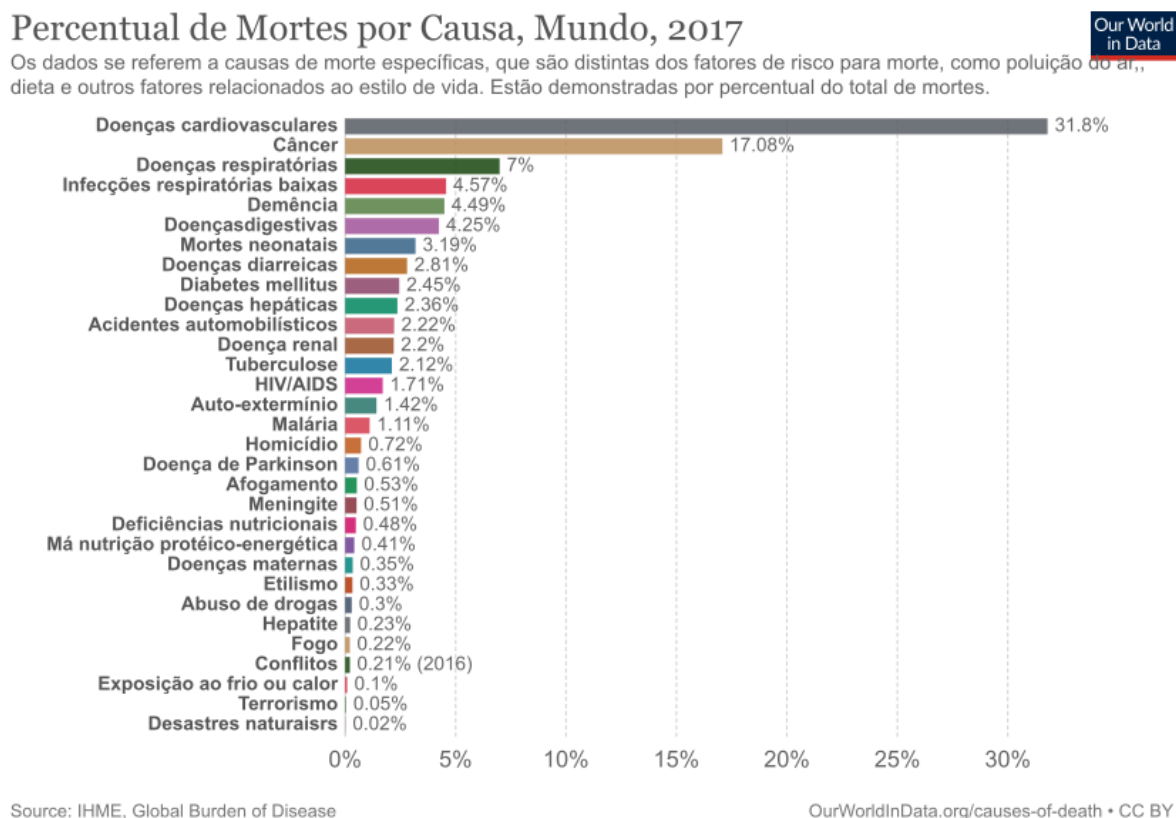
3.1.1. O câncer

Câncer é o nome referente a um conjunto de doenças que apresenta, como manifestação comum, o crescimento celular desordenado, que leva à invasão de tecidos ou órgãos (INCA, 2019). O termo foi utilizado pela primeira vez por Galeno, por volta de 150 d.C., se referindo a um tumor maligno de mama, em que o órgão apresentava veias superficiais túrgidas e ramificadas, lembrando a conformação de um crustáceo, daí o uso do nome, de origem grega, *karkinos* (crustáceo, caranguejo), que em sua tradução latina origina a palavra Câncer. Atualmente o termo é utilizado de forma generalizada, se referindo a qualquer neoplasia maligna, chamadas também, na prática, de tumores (FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2006).

As neoplasias malignas seguem sendo um dos principais problemas de saúde pública mundial, já sendo consideradas, em conjunto, como uma das quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países (INCA, 2019). No entanto, a evolução do fardo social da doença varia muito entre as nações. Como exemplo, enquanto o Brasil observa uma contínua elevação na taxa de óbitos desde 1979, os Estados Unidos, após um período de 70 anos em crescimento, constataram o início do declínio das mortes por câncer em 1991. Entre 1990 e 2006 as mortes causadas pela doença foram reduzidas em 21% nos homens e 12,3% nas mulheres (LONGO, 2013). Esse país demonstrou uma queda no número de mortes de 215/100.000 habitantes em 1991 para 152/100.000 habitantes em 2017, tendência também observada em alguns países europeus. De maneira geral, considerando o contexto mundial, a taxa de letalidade individual das neoplasias tende a uma contínua descendência, ante ao desenvolvimento de novas técnicas de rastreamento e tratamento. Por outro lado, conforme já exposto, o número total de óbitos mundiais segue aumentando, ante a transição demográfica geral das sociedades e a elevação da expectativa de vida observada em grande parte dos países, além da dificuldade de acesso às terapias mais modernas e eficazes (POU et al., 2017).

Quando todos os tipos de neoplasias são considerados em conjunto, temos o Câncer como a segunda maior causa de mortalidade no mundo (Our World in Data, 2017). A distribuição do número de mortes mundiais, separadas por causa, pode ser observada na Figura 3-1.

Figura 3-1: Percentual de mortes mundiais em 2017, separadas por causa



Fonte: Our World in Data, 2020 (Adaptada).

O mesmo padrão se observa para o Brasil, com uma estimativa de 625 mil novos casos por ano para o triênio 2020-2022. O tipo de neoplasia mais diagnosticado em nosso país continua sendo o câncer de pele não melanoma, seguido pelas neoplasias de próstata para os homens (29,2%), e pelo câncer de mama para as mulheres (29,7%) (INCA, 2019).

O principal fator de risco para o câncer é a idade (66% dos casos ocorrem em maiores de 65 anos), com o risco um pouco maior para o sexo masculino. Estima-se, no entanto, que existam 9 fatores de risco preveníveis que são responsáveis por 33% dos casos, em geral associados ao contato com carcinogênicos, sendo esses: tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, obesidade, inatividade física, baixo

consumo de frutas e vegetais, poluição do ar, fumaça em ambientes fechados, e infecção por vírus mutagênicos, como o HPV. Com a aplicação das técnicas atuais de tratamento, há o consenso que aproximadamente 2 em cada 3 pacientes diagnosticados com câncer, se abordados adequadamente, podem ser curados. Ainda assim, ante o papel histórico desempenhado por essa doença, os pacientes tendem a receber seu diagnóstico de forma avassaladora (LONGO, 2013). O principal objetivo do tratamento do câncer é a cura da doença, no entanto, o fracasso na erradicação das neoplasias não significa o fim das possibilidades terapêuticas. A medicina dispõe hoje de um amplo ferramental tanto para o prolongamento da vida dos pacientes sem possibilidade de cura, quanto para a melhora do conforto de indivíduos fora de possibilidades de abordagem terapêutica.

As modalidades de terapia oncológica se dividem basicamente em quatro: a quimioterapia, a radioterapia, a cirurgia e as terapias biológicas. O uso combinado de terapias é extremamente comum, utilizando-se as características mais interessantes de cada modalidade como forma de potencializar o tratamento (SAUSVILLE; LONGO, 2013).

3.1.2. A radioterapia

A radioterapia (RT) é uma modalidade de abordagem oncológica essencial, contribuindo para o tratamento e palição de pacientes com câncer. É considerada uma terapia efetiva para tratamento de tumores sólidos. A taxa de indicação clínica da RT é variável, dependendo do sítio tumoral. Em um extremo, temos a ausência de indicação para certas neoplasias de fígado, ou para doenças disseminadas, como leucemias. Constata-se, no entanto, a forte indicação para doenças localizadas, como tumores do sistema nervoso central, com taxa de até 92% dos casos clínicos. Em média, estima-se que a RT seja indicada para aproximadamente 60% de todos os tratamentos para câncer (MOHAN et al., 2019). No entanto, o emprego efetivo da modalidade varia entre países, de acordo com a disponibilidade tecnológica.

A precisão em cobrir o volume tumoral com uma dose prescrita efetiva tem sido alcançada através de melhorias instrumentais nos equipamentos e do desenvolvimento de novas técnicas computacionais, passando ainda pela escolha

adequada do espectro energético dos fótons, ou pela aplicação da terapia de elétrons, prótons ou íons pesados, dependendo de cada caso clínico (AMALDI; KRAFT, 2005). As tecnologias de RT seguem em contínuo aprimoramento, com sistemas de planejamento em três dimensões, com alta precisão espacial e temporal, possibilitando o rastreamento dos movimentos de órgãos durante a exposição à radiação, técnicas de radioterapia de intensidade modulada (IMRT), que permitem a entrega de doses com feixes rotacionais ou de múltiplos campos modulados no tempo e no espaço, ampliando a preservação dos tecidos saudáveis (SCHAUE; MCBRIDE, 2015).

Em termos mundiais, a maioria dos pacientes tratados é submetida à teleterapia de megavoltagem. Entretanto, destacam-se, nos países desenvolvidos, centros de radioterapia por partículas pesadas, como o *Heidelberg Ion-Beam Therapy Center* (HIT) na Alemanha, o *Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica* (CNAO) na Itália e o *National Institute of Radiology Sciences* (NIRS) no Japão, assim como vários centros de próton-terapia nos EUA.

Os avanços das tecnologias de RT nem sempre se convertem em um melhor atendimento das populações. Araújo et al. (2016) elaboraram um levantamento das condições dos serviços de RT no SUS brasileiro em 2015, assim como uma previsão de demandas na RT para 2030. Os autores constataram um déficit de 255 centros de RT em 2015, associado à escassez de recursos humanos da ordem de 387 médicos radioterapeutas, 546 físicos-médicos e 114 supervisores de radioproteção. Para entendermos as dimensões de nossa deficiência em centros de radioterapia, no ano de elaboração do estudo, o Brasil contava com um total de 154 serviços de RT instalados, sendo possível constatar a necessidade de um aumento de 166% no número de instalações para suprir o déficit. Segundo dados do Ministério da Saúde, o Plano de Expansão da Radioterapia, iniciado em 2010, tem como meta final a instalação de 94 serviços dedicados à modalidade de tratamento (somados centros novos e a atualização de serviços já existentes). No entanto, constata-se que após a implementação completa do Plano, o país ainda apresentará um déficit de mais de 60% no número de centros de terapia, quadro aquém do desejado (ARAÚJO; SÁ; ATTY, 2016). Além da deficiência no número de serviços de RT disponíveis, a defasagem tecnológica é outro fator de desvantagem em relação a padrões

internacionais, uma vez que não há previsão da instalação de centros de RT por prótons ou íons de carbono, até 2030.

Uma outra abordagem capaz de elevar a eficiência da RT é a melhoria de sua eficácia biológica, através do emprego de substâncias ou terapias radiosensibilizantes. No entanto, o uso dessa abordagem pode ser limitado por alguns aspectos, como pela ocorrência de efeitos adversos ou por um perfil desfavorável de custo/efetividade, entre outros fatores (WARDMAN, 2007). O estudo de radiosensibilizantes mais eficientes é essencial para nações que não dispõem de tecnologias modernas, podendo se apresentar como a única forma de melhorar a eficácia dos tratamentos fornecidos à população.

3.1.3. Os radioprotetores e os radiosensibilizantes

As substâncias radioprotetoras podem ser entendidas como aquelas que reduzem os efeitos deletérios da RT em tecidos saudáveis, sem alterar a radiosensibilidade de células tumorais. Esses podem ser classificados, quanto à sua origem, basicamente em: químicos, tendo como exemplo a amifostina; naturais, como algumas vitaminas antioxidantes; e baseados em plantas, em constante pesquisa (PAINULI; KUMAR, 2016).

A RT, apesar de sua indiscutível capacidade de controle tumoral no tratamento oncológico, pode causar um amplo espectro de efeitos adversos, muitos destes severos e permanentes. Eles podem ser classificados em agudos, quando surgem durante ou logo após as sessões, com mitigação em algumas semanas; ou tardios, iniciando-se semanas ou meses após a RT, podendo ser permanentes. Nesse contexto, destaca-se a importância de radioprotetores eficientes. Os principais compostos radioprotetores propostos são da classe dos antioxidantes, anti-inflamatórios, de ação mista, ou a sulfassalazina (HALL et al., 2016).

Um radioprotetor ideal, de acordo com Gudkov et al. (2015) deve apresentar alta eficiência, ou seja, um fator dose-modulação elevado, ser atóxico, ter uma via de administração favorável, de preferência oral, baixo custo de fabricação, estabilidade de armazenamento, duração prolongada de efeito e capacidade de aliviar os efeitos

de vários tipos de radiação. Podemos observar que as características buscadas em uma substância radiosensibilizante são bastante semelhantes às dos radioprotetores, diferindo, obviamente, na capacidade de potencializar o efeito das radiações.

Uma substância radiosensibilizante, também no contexto da RT, é aquela capaz aumentar o dano causado pela dose de radiação absorvida, enquanto preserva os tecidos não acometidos pela neoplasia. Considerando os critérios propostos por Gudkov et al. (2015), percebemos que alguns fitoterápicos podem ser candidatos interessantes para essa finalidade, sendo utilizados pela humanidade há séculos, virtualmente não apresentando toxicidade, tendo uso oral e apresentando baixo custo.

3.2. A *Curcuma longa*

A *Curcuma longa* é um vegetal da família Zingiberaceae, que talvez tenha como representante mais conhecido o Gengibre (*Zingiber officinale*). O gênero *Curcuma* conta com aproximadamente 120 espécies, tendo sido inaugurado por Lineu, ao catalogar a *Curcuma longa* em 1753 (LAMO; RAO, 2017).

3.2.1. A Cúrcuma

Um dos nomes populares classicamente utilizados para a *Curcuma longa*, no Brasil, é Açafraão-da-Terra, o que o leva a ser, por vezes, confundido com a espécie *Crocus sativus*, o popular Açafraão-Verdadeiro ou simplesmente Açafraão. Nos últimos anos, cada vez mais têm sido utilizados os termos *Curcuma*, ou *Cúrcuma*, sendo este o mais difundido; além de comumente nos depararmos com o termo Turmérico, provavelmente o mais utilizado internacionalmente, se apresentando na língua inglesa como Turmeric (FILHO et al., 2000). No entanto, frequentemente são encontrados regionalismos para a espécie, sendo utilizados também os termos: Açafraão-da-Índia, Gengibre Dourado, Gengibre Amarelo, Mangarataia, Batatinha Amarela e Açafroeira (MAIA et al., 1995)(PEREIRA; MOREIRA, 2009).

Apesar de seu registro científico ocidental relativamente recente, a *Cúrcuma* é utilizada na cultura indiana há mais de 2.500 anos, tanto como um tempero, quanto

como tratamento para várias morbidades nas terapias da Ayurveda, uma modalidade de medicina tradicional indiana, que significa, em tradução livre, Ciência da Vida Longa (AGGARWAL et al., 2007). Além de seu uso muito difundido na região da Índia, o vegetal já faz parte da culinária e medicina tradicionais da China há milênios. Sua utilização é muito ampla, primariamente como agente anti-inflamatório, empregado no tratamento de cólicas, dores de dentes, dores torácicas, distúrbios menstruais e várias morbidades do trato gastrointestinal, como gastrites e acidez excessiva. Seu uso como agente antisséptico bucal, em quadros de gengivite e periodontite, é observado ainda nos dias atuais (GUPTA et al., 2013). O Haldi, como é conhecido na Índia, é também usado como um conservante alimentar, um digestivo, um auxiliar em tratamento de resfriados, além de ser classicamente empregado no alívio de dores articulares. Em sua difusão rumo ao ocidente, a Cúrcuma passa a ser empregada principalmente como tempero, sendo bastante utilizada na culinária do Oriente Médio, marcadamente no Irã e na Turquia. Seu emprego culinário na Europa, e restante do ocidente, também é muito difundido nos dias atuais, observado principalmente nos molhos feitos à base de Curry, sendo responsável pela coloração amarelada tão típica desse tempero (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017).

A *Curcuma longa* é uma planta perene, herbácea, crescendo naturalmente nas encostas dos morros de florestas tropicais do Sudeste Asiático. Após ser introduzida no Brasil, passou a ser encontrada ou cultivada em diversos Estados, de forma subespontânea, ou seja, crescendo sem a interferência deliberada do homem, não sendo, no entanto, natural da região (FILHO et al., 2000). Imagens da espécie *Curcuma longa* em ambiente natural podem ser observadas na Figura 3-2.

Apesar de se tratar de um vegetal herbáceo, as preparações baseadas na Cúrcuma utilizam como matéria prima seu rizoma, um caule que se encontra quase totalmente subterrâneo. Uma vez removido da planta, o rizoma é seco e triturado, originando assim, o pó amarelado comumente encontrado no mercado. (PEREIRA; MOREIRA, 2009). Imagens do rizoma, assim como de seu preparado em pó podem ser observadas na Figura 3-3.

Figura 3-2: Imagens da espécie *Curcuma longa*.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015

Figura 3-3: Imagem do rizoma e do preparado em pó da *Curcuma longa*.



Fonte: DIVYA; ASHOK; RAJAJEYA KUMAR, 2019.

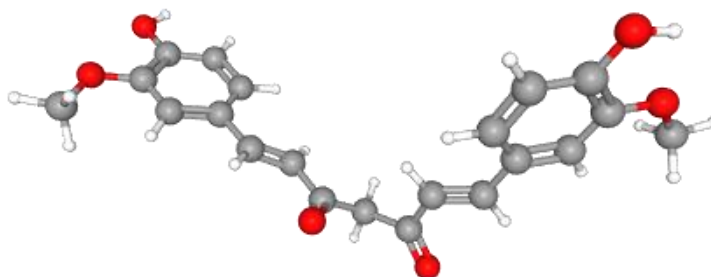
A constituição do rizoma da Cúrcuma é de aproximadamente 69,4% de carboidratos, 6,3% de proteínas, 5,1% de gorduras, 3,5% de minerais e 13,1% de água (PRASAD et al., 2014).

3.2.2. A Curcumina

A Cúrcuma apresenta dezenas de compostos em sua constituição, no entanto, seu principal princípio ativo, descoberto há mais de dois séculos, em 1815, é a Curcumina (CUR). O primeiro relato de extração de CUR em quantidades apreciáveis ocorreu em 1842 por Vogel Jr. (VOGEL JR., 1842), tendo sido realizadas várias tentativas de se estabelecer sua estrutura química nas décadas seguintes. No entanto, somente em 1910 a estrutura exata pôde ser elucidada, sabendo-se hoje tratar-se do 1,7-bis(4-

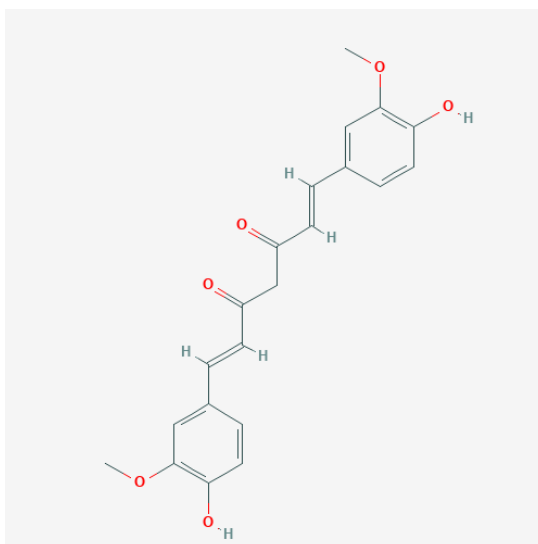
hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona, ou Diferuloilmetano, apresentando fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$. Apresenta peso molecular de 368,4 g/mol, sendo classificada como um pigmento fitopolifenol (National Center for Biotechnology Information, 2020). A estrutura química da Curcumina é ilustrada na Figura 3-4 e Figura 3-5.

Figura 3-4: Estrutura tridimensional da Curcumina.



Fonte: National Center for Biotechnology Information, 2020.

Figura 3-5: Estrutura química da Curcumina.

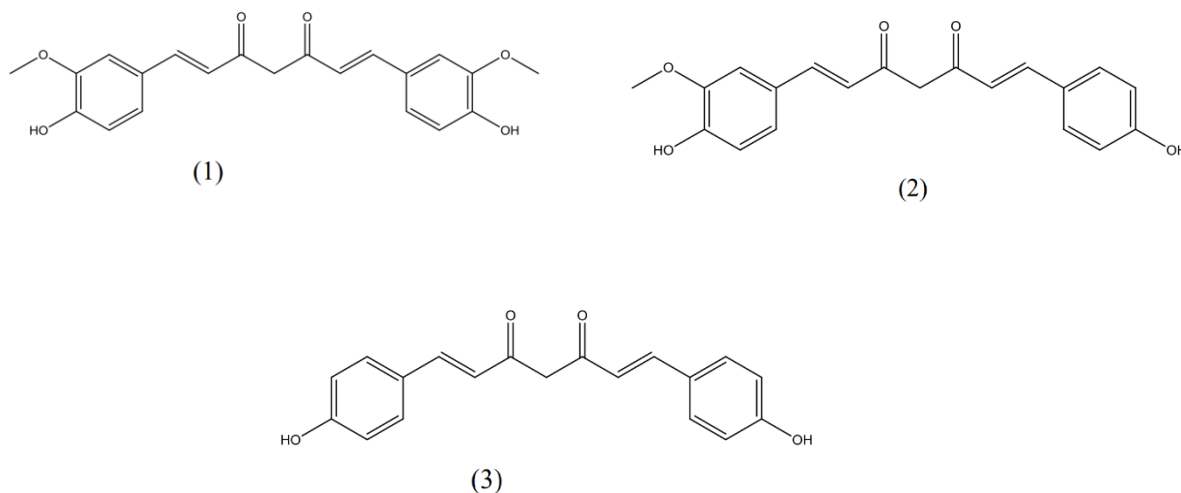


Fonte: National Center for Biotechnology Information, 2020.

Estima-se o rizoma da Cúrcuma seja composto de 2% a 5% por um conjunto de compostos denominado Curcuminóides, sendo esses basicamente três substâncias principais: o diferuloilmetano (Curcumina), a demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina. A maior parte das formulações referidas como Curcumina, em verdade, trazem as proporções aproximadas de: 77% de diferuloilmetano, 18% de

demetoxicurcumina, e 5% de bisdemetoxicurcumina, não se sabendo ao certo a potência individual exata de cada um desses análogos (AGGARWAL et al., 2007). As estruturas químicas dos curcuminóides são apresentadas na Figura 3-6.

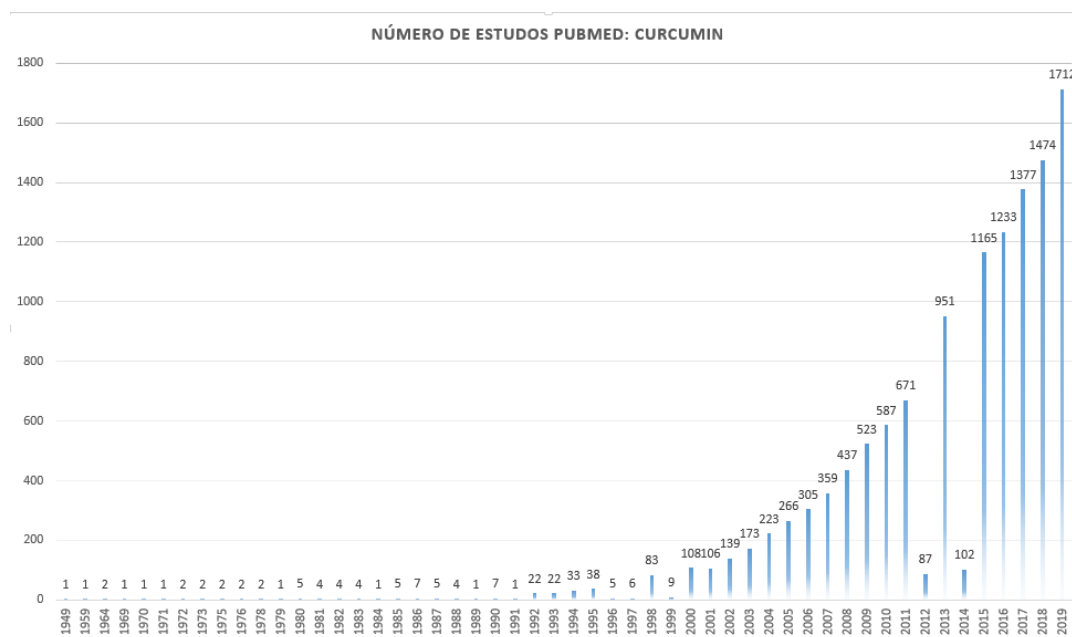
Figura 3-6: Estruturas químicas dos curcuminóides: diferuloilmetano (1), demetoxicurcumina (2) e bisdemetoxicurcumina (3)



Fonte: National Center for Biotechnology Information, 2020.

O uso clássico da Cúrcuma como conservante alimentar talvez tenha sido o primeiro ponto a atrair o interesse científico para o vegetal. Os conservantes alimentares, via de regra, são bactericidas e/ou fungicidas, características que passaram a ser investigadas na *Curcuma longa*. Um grande número de trabalhos já comprovam esses efeitos, sendo encontradas até revisões dedicadas somente ao tema (ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2014)(TEOW et al., 2016)(GUL; BAKHT, 2015). Conforme as propriedades milenares da Cúrcuma foram sendo elucidadas, o número de trabalhos relacionados ao vegetal, assim como a seu princípio ativo, tiveram um enorme aumento, conforme observa-se na Figura 3-7, na fonte de dados PubMed, em pesquisa realizada em abril de 2020, com o termo “Curcumin”, sendo exposto o número de trabalhos publicados por ano, entre 1949 e 2019.

Figura 3-7: Gráfico do número de trabalhos científicos relacionados à Curcumina publicados por ano de 1943 a 2019.



Fonte: National Center for Biotechnology Information, 2020.

Ensaio realizados em dezenas de países nos últimos anos demonstram, cada vez mais, as propriedades da CUR em aplicações nas ciências da saúde. Três revisões relativamente recentes realizadas por Amalraj et al (2016), por Hewlings e Kalman (2017), assim como por Kocaadam e Sanlier (2017), expõem resultados positivos dos Curcuminóides em estudos *in vitro*, *in vivo* e em ensaios clínicos.

As propriedades como antioxidante e anti-inflamatório estão entre as características mais investigadas no fitoterápico. Entende-se hoje que a CUR pode ter um papel importante na redução da peroxidação de lípidos de membrana e na limitação dos danos oxidativos em proteínas e no DNA, fatores que estão provavelmente associados a várias complicações de patologias crônicas, como câncer, aterosclerose e doenças neurodegenerativas. Além disso, a eficácia anti-inflamatória da CUR, já observada em vários contextos, parece estar associada à inibição da ciclo-oxigenase (COX) 2, entre outros mediadores (MENON; SUDHEER, 2007). Ainda em relação às propriedades anti-inflamatórias, foi também demonstrada a inibição da biossíntese de prostaglandinas, a inibição da atividade e expressão da enzima COX-3, assim como a interferência na expressão da isoenzima COX-2. Este último fator provavelmente está ligado à sua habilidade de bloquear a ativação da transcrição do fator nuclear κB

(IRESON, ORR, *et al.*, 2001). A elucidação desses mecanismos de ação poderia promover ainda mais o uso do nutracêutico na prática clínica.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) são amplamente empregados tanto em quadros de dor aguda quanto em diversas doenças crônicas. Essa classe de medicamentos, apesar de muito eficaz, tem um perfil de efeitos colaterais muito prejudicial, sendo inclusive contraindicada para grande parte da população. Ensaios clínicos já demonstraram a segurança e eficácia da CUR no tratamento de quadros de osteoartrite, se mostrando tão eficiente quanto o Ibuprofeno (KUPTNIRATSAIKUL *et al.*, 2009), tendo também eficácia similar ao Diclofenaco, apresentando, no entanto, melhor tolerabilidade entre os pacientes (SHEP *et al.*, 2019). Esses achados são de grande valia, uma vez que o uso de AINE por longos períodos deve ser fortemente evitado por qualquer indivíduo, o que limita seu tempo de utilização em atletas e portadores de doenças reumatológicas, por exemplo, além de, como já mencionado, serem contraindicados em vários quadros clínicos, como pacientes idosos, pacientes portadores de insuficiência cardíaca, de insuficiência renal, entre outros.

Os benefícios da CUR para indivíduos portadores de síndrome metabólica também já foram reportados. A substância tem efeitos antidiabéticos, sendo capaz de reduzir os níveis de glicemia e abrandar as complicações da doença (NABAVI *et al.*, 2015). O fitoterápico já se mostrou eficaz, seguro e bem tolerado para pacientes com quadros de dislipidemia, reduzindo níveis de colesterol LDL e triglicerídeos (QIN *et al.*, 2017). Foi demonstrado por Hadi *et al.* (2019) que o consumo prolongado de CUR provavelmente é capaz de favorecer a redução de valores de pressão sistólica em pacientes hipertensos. Além disso, a suplementação do nutracêutico é também benéfica em quadros de obesidade, mostrando resultados positivos na perda de peso e na redução de fatores inflamatórios crônicos tipicamente observados nesses pacientes (BRADFORD, 2013).

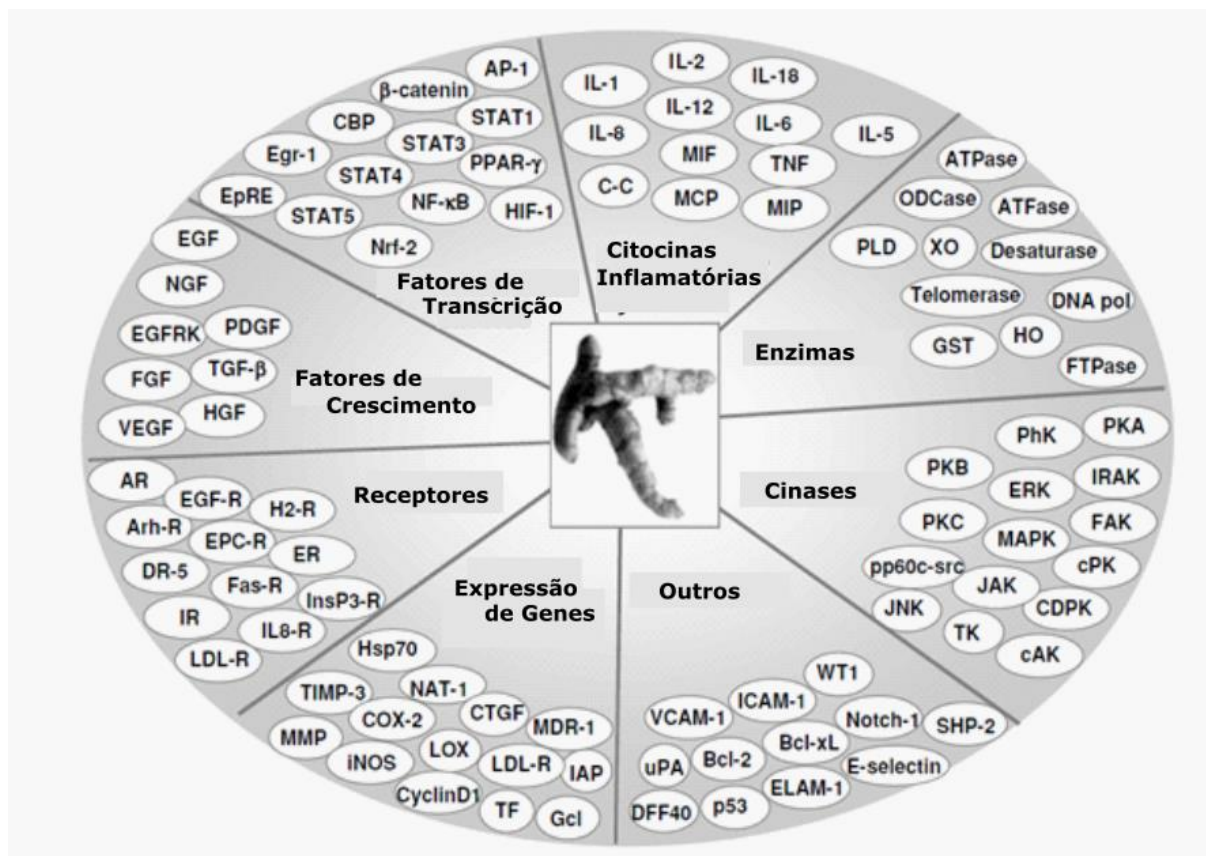
Foram avaliadas diversas possibilidades de aplicação da Curcumina em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. A substância é capaz de agir em diversos mecanismos envolvidos na Doença de Alzheimer, não sendo claras ainda, as possibilidades de seu emprego clínico (TANG; TAGHIBIGLOU; LIU, 2017). A CUR demonstrou eficácia como potencializador de medicamentos, em ensaio animal, em

modelo de Doença de Parkinson induzida em camundongos (MOTAWI et al., 2020). Mostrou ainda efeitos muito encorajadores como tratamento adjunto para quadros de Transtorno Depressivo Maior, inclusive com a elucidação de alguns de seus prováveis mecanismos de ação (LOPRESTI et al., 2015)(LOPRESTI; DRUMMOND, 2017)(KATASONOV, 2020).

Possivelmente um dos campos de pesquisa mais promissores para a Curcumina se encontra na cancerologia. Recente revisão realizada por Giordano e Tommonaro (2019) relata efeitos positivos já descritos em cânceres do sistema hematopoiético, em tumores do sistema digestivo, envolvendo neoplasias de cólon, pâncreas e fígado, além de propriedades benéficas diretas ou adjuvantes para tumores de próstata, fibrosarcomas, tumores de cabeça e pescoço e mesoteliomas, através de vários mecanismos de ação já relatados ou ainda em investigação. As bases científicas para as aplicações cada vez mais difundidas vão se fortalecendo, à medida que os mecanismos bioquímicos da ação da CUR são elucidados. Os alvos moleculares são cada vez mais claros, tendo sido demonstrado que envolvem citocinas inflamatórias, enzimas, quinases, expressão de genes, receptores diversos, fatores de crescimento, fatores de transcrição e também proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (GIORDANO; TOMMONARO, 2019)(AGGARWAL et al., 2007). A Figura 3-8 ilustra os alvos moleculares que podem ser modulados pela Curcumina, de acordo com Aggarwal et al (2007).

Esse enorme potencial despertou o interesse de nosso grupo de pesquisas sobre os possíveis empregos da Curcumina no campo das Ciências das Radiações. Procedemos então a uma ampla revisão bibliográfica que originou o artigo científico “Prospects of the application of curcumin in radiation therapy” publicado no International Nuclear Atlantic Conference (INAC) de 2019, reproduzido no Capítulo 3.6, e apresentado na íntegra no Anexo A.

Figura 3-8: Ilustração dos alvos moleculares da Curcumina



Fonte: AGGARWAL et al., 2007 (Adaptada).

3.2.3. A biodisponibilidade da Curcumina

Apesar da enorme quantidade de informação acerca dos efeitos benéficos da Curcumina, sua aplicação prática em protocolos médicos, e até mesmo a realização de ensaios clínicos, têm sido recorrentemente criticados. Alguns autores advogam que sua baixa biodisponibilidade seria um fator limitante para seu emprego prático (LIU et al., 2016). Dentre os elementos que dificultam a absorção e disponibilidade da substância, estão sua baixa solubilidade em água, pequena permeabilidade intestinal em humanos, assim como em outros mamíferos, e sua conjugação com outros compostos após a absorção, que pode levar a uma redução em sua meia-vida plasmática (LIU et al., 2016; SIVIERO et al., 2015). Apesar da grande quantidade de dados favoráveis demonstrados *in vitro*, ensaios clínicos no campo da oncologia, por exemplo, têm demonstrado resultados marcadamente positivos quase que restritos a

indivíduos com câncer colorretal, já que concentrações elevadas de CUR persistem na mucosa intestinal (ADIWIDJAJA; MCLACHLAN; BODDY, 2017).

Outros trabalhos, no entanto, indicam que a biodisponibilidade talvez não seja uma barreira intransponível, uma vez que ensaios laboratoriais demonstram bons resultados utilizando concentrações muito reduzidas de CUR, como constatado por Plummer et al (1999), que demonstrou que os efeitos no bloqueio da ativação do fator nuclear κ B em culturas celulares foi observado em concentrações diminutas, na faixa de 10^{-5} e 10^{-4} M. Apesar das concentrações extremamente baixas mostrarem efeitos claros, a biodisponibilidade de CUR em ensaios *in vivo* ainda permanece um desafio. Estudos realizados em camundongos demonstraram que doses orais elevadas do composto, chegando a 1g/kg, levaram a concentrações plasmáticas de apenas $0,5\mu\text{M}$ (PAN; HUANG; LIN, 1999). A biodisponibilidade da CUR em humanos não parece diferir muito desse padrão. Um estudo de Fase 1 demonstrou que dosagens orais de 4 a 8 gramas levaram a picos plasmáticos de apenas 0,41 a $1,75\mu\text{M}$ (CHENG et al., 2001), evidenciando a grande disparidade entre a dose administrada e a dose efetivamente absorvida. Esse mesmo estudo, no entanto, demonstrou mais uma vez a segurança de uso da substância, que não exibiu toxicidade aparente mesmo com o uso contínuo de 4 a 8 gramas diárias, por um período de 3 meses.

Ante esse empasse, várias estratégias para melhorar a biodisponibilidade da CUR foram propostas ao longo dos últimos anos. Dentre essas, foram desenvolvidos veículos na forma de nanogéis, micelas poliméricas, lipossomas, complexos de fosfolípidos, microemulsões, além do design e desenvolvimento de várias nanopartículas. Os resultados de todas essas formas de potencialização de absorção e estabilidade são variáveis, não havendo predomínio de nenhum candidato até o momento (ANAND et al., 2007)(LIU et al., 2016). Seguindo por outra linha, vários grupos de pesquisa propõem o uso de outros princípios ativos derivados de fitoterápicos para cumprir esse papel. Várias substâncias de origem natural apresentam propriedades capazes de ampliar a absorção de diversos compostos, com a mesma potência de produtos sintetizados e, geralmente, com um perfil de efeitos adversos mais favorável. Nesse contexto já são estudados vários compostos fitoquímicos como a quercetina, genisteína, naringenina, sinomenina, glicirrizina e a Piperina (KESARWANI; GUPTA, 2013).

3.3. A *Piper nigrum*

A *Piper nigrum* é um vegetal da família Piperaceae, iniciada em 1753 por Lineu, ao catalogar suas primeiras 17 espécies (YUNCKER, 1957), existindo um número atual de aproximadamente 3.600 membros. A *Piper nigrum* é uma planta trepadeira, natural das florestas tropicais da Ásia, adaptando-se bem em diversas regiões de clima quente e úmido, crescendo junto a troncos de árvores ou tutores de madeira (OYAMA et al., 2004).

3.3.1. A Pimenta-Preta

A Pimenta-preta é utilizada como condimento no Sudeste Asiático há milênios. Seu uso no ocidente foi difundido a partir do século XIV, com o crescimento do comércio de especiarias, sendo então trazida à Europa a partir da região onde se localiza a Índia. Hoje, o Vietnã é o maior produtor mundial, com aproximadamente 34% do mercado global (JOSHI; SHRESTHA; ADHIKARI, 2018).

Seu cultivo no Brasil foi iniciado no século XVII, trazida pelos portugueses, sem muito sucesso, no entanto. Somente em 1933 imigrantes japoneses conseguiram estabelecer o cultivo racional do vegetal. Ao contrário do que comumente se pensa, os condimentos conhecidos como Pimenta-preta, Pimenta-verde, Pimenta-vermelha e Pimenta-branca, não são originados de espécies diferentes, sendo, na verdade, a espécie *Piper nigrum* colhida em estágios diferentes de maturação (OYAMA et al., 2004) como observa-se na Figura 3-9.

Figura 3-9: Pimenta-preta colhida em diferentes estágios de maturação.



Fonte: JOSHI; SHRESTHA; ADHIKARI, 2018.

Internacionalmente, a *Piper nigrum* tem o nome popular de “Black pepper” como o mais difundido. No Brasil, o termo correspondente “Pimenta-preta” é amplamente aceito, no entanto, talvez o nome Pimenta-do-reino seja igualmente reconhecido por todo o país, sendo referenciado também como Pimenta-redonda e Pimenta-negra.

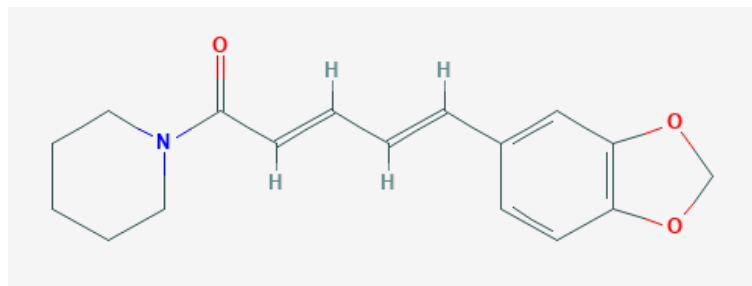
O emprego da Pimenta-preta no ocidente se restringiu à culinária, tendo sido uma das especiarias mais valiosas por séculos. No entanto, no Sudeste Asiático, principalmente na Índia, a medicina tradicional Ayurveda emprega o vegetal classicamente como estimulante do sistema nervoso central, como antiespasmódico, digestivo, afrodisíaco e antipirético (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013).

3.3.2. A Piperina

O emprego da Pimenta-preta como adjuvante em sistemas medicinais milenares levou ao início de pesquisas científicas, na busca da elucidação das propriedades do vegetal. Em 1819, Hans Christian isolou pela primeira vez a Piperina (PIP), um dos compostos químicos responsáveis pelo sabor pungente dessa pimenta, sendo seu principal princípio ativo (JOSHI; SHRESTHA; ADHIKARI, 2018). Um estereoisômero, a Chavicina, também é encontrado na Pimenta-preta; esse se converte lentamente em Piperina durante a estocagem, levando a uma diminuição da pungência do tempero (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013).

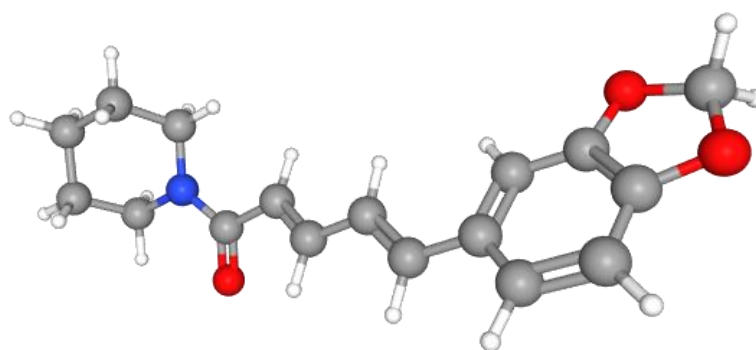
A Piperina é identificada como ((1-5-(1,3)-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienil) piperidina, apresentando fórmula molecular $C_{17}H_{19}NO_3$. Tem peso molecular de 285,34g/mol, sendo classificada como um alcaloide nitrogenado, ou uma N-acilpiperidina (National Center of Biotechnology Information, 2020). A estrutura química da Piperina pode ser observada na Figura 3-10 e Figura 3-11.

Figura 3-10: Estrutura química da Piperina.



Fonte: National Center of Biotechnology Information, 2020.

Figura 3-11: Estrutura tridimensional da Piperina.



Fonte: National Center of Biotechnology Information, 2020.

O princípio ativo da *Piper nigrum* já demonstrou várias propriedades farmacológicas. Como um antioxidante, já foi demonstrado que a suplementação de PIP, em camundongos, pode reduzir o estresse oxidativo celular induzido por uma dieta rica em lipídios (VIJAYAKUMAR; SURYA; NALINI, 2004). A substância também foi capaz de aumentar os níveis de glutathione reduzida, assim como o status antioxidante total em embriões de galinha com catarata induzida por esteroides (VURMAZ et al., 2019). Camundongos, com diabetes mellitus induzido, apresentaram melhora no status oxidativo geral. Essa propriedade é constatada pelos aumentos da concentração de glutathione cerebral, das atividades da glutathione peroxidase e da superóxido dismutase renais, assim como pela elevação da atividade da glutathione redutase cardíaca e da peroxidação de lipídios. No entanto, não foram constatados resultados positivos na melhora do status oxidativo hepático (RAUSCHER; SANDERS; WATKINS, 2000).

Propriedades bactericidas diretas da PIP já foram constatadas, demonstrando que ela pode ser usada tanto na preservação de alimentos quanto como medicamento (ZARAI et al., 2013). A substância demonstrou capacidade de potencializar o efeito de antibióticos e antifúngicos quando usados contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (MGBEAHURUIKE et al., 2019)

Efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da PIP se mostraram protetores para neurônios de camundongos com modelo de *Parkinson* induzido, atenuando déficits motores e cognitivos (YANG et al., 2015). Derivados da PIP demonstraram modular a atividade de vários alvos relacionados a disfunções neurológicas incluindo epilepsia, doença de *Parkinson*, depressão e dores crônicas (CHAVARRIA et al., 2016).

A Piperina é amplamente investigada no campo da cancerologia, com resultados favoráveis em vários tipos tumorais. Greenshields et al. (2015) constatou que a PIP inibe o crescimento de células de câncer de mama triplo-negativo, sem afetar, no entanto, o crescimento de tecido epitelial mamário normal. O resultado também foi observado em tumores hormônio dependentes. A PIP se mostrou radiosensibilizante para as células tumorais, quando expostas à radiação gama, sendo encontradas também evidências sugestivas de atividade antimetastática. Já Do et al. (2013) constatou que a PIP pode ser um agente potencial na prevenção e tratamento do câncer de mama humano com superexpressão dos receptores do fator de crescimento epitelial humano tipo 2 (HER-2), especificando ainda vários níveis de atuação da substância para esses efeitos. Quando empregada tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, utilizando modelo murino, foi constatado por Lai et al. (2012) que a PIP é um componente antitumoral efetivo, com potencial de ser utilizado como um novo medicamento anticâncer.

A Piperina apresenta efeitos antiproliferativos em células de câncer prostático humano, através de mecanismos de interrupção do ciclo celular e autofagia, quando empregada em culturas das linhagens DU145, PC-3 e LNCaP (OUYANG et al., 2013). O tratamento com PIP também demonstrou reduzir o crescimento tumoral tanto de linhagens dependentes quanto independentes de androgênios, em modelo de camundongos xenotransplantados, corroborando os resultados encontrados em outros ensaios (SAMUKUTTY et al., 2013).

A atividade benéfica no campo da oncologia se estende ainda para vários outros tipos de tumores. Foi observado, com exemplo, que a PIP induz apoptose de células de câncer de pulmão da linhagem A-549 (LIN et al., 2014). A substância pode reverter a resistência multimedamentosa de alguns tumores, por mecanismos múltiplos, nas linhagens de tumor de mama MCF-7 e pulmão A-549 (LI et al., 2011). Apresenta ainda efeitos citoestáticos e citotóxicos em células de câncer retal da linhagem HRT-18, através da indução de apoptose dependente de espécies reativas de oxigênio (YAFFE et al., 2013).

Além desse enorme potencial de aplicações demonstrado, uma outra característica amplamente estudada na Piperina é de especial interesse para o presente trabalho: sua atividade como potencializador da biodisponibilidade de outras substâncias.

3.3.3. A Piperina como potencializador de biodisponibilidade

Um biopotencializador é entendido como um agente que não possui, por si só, a atividade farmacológica desejada, mas, no entanto, quando administrado conjuntamente com outra droga, aumenta a biodisponibilidade e eficácia desta. Tal propriedade já é empregada de forma totalmente empírica na fitoterapia de sistemas milenares, como a Ayurveda (AJAZUDDIN et al., 2014).

A Piperina potencializa a biodisponibilidade de várias substâncias e medicamentos, com grande diversidade terapêutica e estrutural. Essas propriedades potencializadoras provavelmente podem ser atribuídas ao aumento da absorção dos compostos, que deve ocorrer pela alteração da dinâmica da membrana lipídica, assim como por mudanças na conformação de enzimas intestinais e sistêmicas, alterando a biotransformação das substâncias. Essa propriedade pode ser benéfica na terapia, mas deve ser avaliada com cuidado, uma vez que a maior biodisponibilidade pode levar a maiores efeitos adversos. (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013) (SRINIVASAN, 2007) (AJAZUDDIN et al., 2014) (LEE et al., 2018).

Já foi demonstrado que a PIP eleva a absorção gástrica de ratos albinos através da potencialização da atividade da lipase pancreática e da estimulação da amilase pancreática, tripsina e quimotripsina (PLATEL; SRINIVASAN, 2016). A elevação da

permeabilidade intestinal à Domperidona (um estimulador da motilidade gástrica), assim como de seu pico plasmático e sua concentração total no tempo, foram constatados quando ratos Wistar eram previamente tratados com PIP (ATHUKURI; NEERATI, 2017). A fexofenadina (um anti-histamínico) tem sua farmacocinética alterada pela PIP em ensaios com camundongos, com aumento de sua biodisponibilidade, provavelmente pela inibição da glicoproteína-P (BEDADA; BOGA, 2017). A inibição da glicoproteína-P pela PIP, reduzindo o efluxo celular durante a absorção intestinal, também foi o mecanismo responsável pela elevação da absorção de Linarina (ansiolítico natural, princípio ativo da Valeriana entre várias outras ervas), observada em ratos, chegando a um aumento de 346% na concentração plasmática da substância (FENG et al., 2014).

Como previamente exposto, a limitada biodisponibilidade tem sido uma grande barreira para o emprego da Curcumina em ensaios clínicos. As propriedades demonstradas pela Piperina poderiam ser de grande valia nesse aspecto e, de fato, o são, conforme foi demonstrado por Shoba et al. (1998). Esse grupo de pesquisa observou que a biodisponibilidade de CUR, quando administrada oralmente em ratos, em uma dose de 2g/kg, associada a uma dose de 20mg/kg de PIP, era correspondente a 154% do valor observado para a CUR empregada isolada. Quando estendido para um ensaio em humanos, observou-se que uma dose de 2g de Curcumina, quando administrada conjuntamente a 20mg de Piperina, apresentava biodisponibilidade relativa de 2.000% em comparação com a CUR isolada. Outro estudo posterior, realizado em 2017, demonstrou resultados diversos, também apresentando algumas diferenças de desenho metodológico. No estudo proposto por Shoba, a proporção Curcumina-Piperina empregada foi 100:1, com ambos os compostos sendo administrados simultaneamente. Chen et al. (2017) realizou o experimento somente com camundongos, empregando proporções CUR-PIP de 20:1, 10:1 e 5:1, tanto com a administração dos compostos simultaneamente, quanto com a Piperina sendo empregada 6 horas previamente à Curcumina. Na administração simultânea foi observada uma biodisponibilidade relativa de 109% em relação à CUR isolada, sendo semelhante nas três concentrações. Já a biodisponibilidade relativa com a administração das substâncias separadas, respeitando o intervalo de 6 horas, foi aproximadamente 426% da observada na CUR isolada, sendo também semelhantes nas três concentrações. A diferença observada no aumento das concentrações

quando as substâncias eram administradas juntas, 154% para Shoba e 109% para Chen, poderia indicar algum tipo de competição na absorção dos compostos, uma vez que o segundo estudo utilizou concentrações muito mais elevadas de Piperina. Um terceiro ensaio, realizado por Zeng et al. (2017), apresentou resultados mais próximos aos encontrados por Shoba et al. (1998), sendo observado, novamente, um desenho metodológico diverso. Nesse estudo, também restrito a cobaias do tipo camundongo, foram utilizadas proporções de CUR-PIP, variando de 1:1 até 100:1, com uma biodisponibilidade relativa média de 135% superior ao observado com a Curcumina isolada. Mais uma vez não foram notadas diferenças significativas com a variação na proporção dos compostos, tornando menos provável a hipótese da competição durante a absorção.

Diversas outras análises foram realizadas relacionando o uso combinado dos dois compostos, sendo possível constatar hoje que, além de aumentar a biodisponibilidade da Curcumina, a Piperina ainda apresenta potencial sinérgico em alguns contextos.

3.4. A sinergia entre Curcumina e Piperina

A Piperina, além de potencializar a absorção da Curcumina, apresenta ainda efeito sinérgico a ela em vários ensaios. Em modelo animal para estudo do Diabetes Mellitus tipo 2, a administração conjunta de CUR, PIP e Quercetina, em ratos com diabetes induzido, demonstrou uma eficácia na redução da glicemia equivalente à Glibenclamida, ocorrendo também redução do colesterol total, colesterol LDL e triglicérides, sendo todas as reduções significativamente superiores ao observado com a CUR usada isoladamente (KAUR; INVALLY; CHINTAMANENI, 2016). Ainda no contexto da síndrome metabólica, um ensaio realizado com camundongos obesos, expostos a dieta com restrição calórica, demonstra que a combinação CUR-PIP é mais eficaz que a Curcumina ou Piperina isoladas na redução da gordura corporal e na supressão do status inflamatório induzido pela dieta hiperlipídica, mostrando potencial para prevenir os efeitos da síndrome (MIYAZAWA et al., 2018). Os dois compostos, usados na proporção 100:1 e associados ao tratamento padrão, demonstraram maior eficácia na redução de todos os fatores do lipidograma de pacientes dislipidêmicos, quando comparado à medicação padrão isolada, em estudo randomizado e controlado (PANAHI et al., 2014).

Martins et al. (2015) observaram um efeito sinérgico importante com o uso de CUR e PIP em culturas de macrófagos, simulando a supressão da osteoclastogênese. A análise foi realizada na investigação de substâncias úteis na prevenção e tratamento da reabsorção de implantes dentários.

Estudo clínico com pacientes apresentando Transtorno Depressivo Maior, não avaliou de forma pormenorizada a sinergia entre os compostos de interesse, mas obteve resultados positivos, demonstrando que um composto de CUR-PIP, associado à medicação padrão, apresentou maior redução em dois scores de depressão, quando comparado com a medicação padrão isolada (PANAHI et al., 2015a). Esse mesmo grupo encontrou resultados positivos da associação CUR-PIP quando aplicada em um estudo randomizado, duplo cego, com pacientes apresentando Síndrome Metabólica. Quando comparada ao placebo, a associação melhorou significativamente a atividade da superóxido desmutase plasmática, reduzindo ainda as concentrações de malondialdeído e proteína C reativa (PANAHI et al., 2015b).

O efeito sinérgico da combinação CUR-PIP foi demonstrado novamente em ensaio *in vivo*, realizado em ratos com carcinoma hepatocelular induzido, em que o conjunto foi mais eficaz na atenuação das mudanças morfológicas, histopatológicas, bioquímicas e proliferativas, tanto no fígado quanto no plasma, quando comparado com os compostos isolados (PATIAL et al., 2015). Esta sinergia também foi observada no aumento do efeito neuroprotetor da CUR, quando avaliada em modelo de neurointoxicação em ratos, com Ácido 3-nitropropiónico, um conhecido indutor de sintomas da Doença de Huntington (SINGH; JAMWAL; KUMAR, 2015).

Em uma aplicação direta dos dois compostos de interesse nas Ciências das Radiações, foi constatado que a CUR, assim como a PIP reduzem o percentual de micronúcleos em linfócitos após irradiação com uma dose de 1,5 Gy. Observou-se ainda que a PIP, em uso isolado, reduziu fortemente a genotoxicidade quando comparada com a CUR no mesmo padrão de aplicação. Esse efeito radioprotetor é fortemente potencializado pela CUR mesmo em baixas concentrações (GHELESHLI; GHASEMI; HOSSEINIMEHR, 2018).

Esses resultados indicam que a *Piper nigrum* se mostra um excelente candidato como promotor da biodisponibilidade da Curcumina, uma vez que, além dessa função primária, poderia ainda apresentar sinergia de ação, potencializando os efeitos buscados na Cúrcuma.

3.5. A linhagem celular MDA-MB-231

As neoplasias de mama são o tipo de câncer com maior incidência entre as mulheres, quando desconsiderados os tumores de pele não melanoma. No contexto brasileiro, são aproximadamente 29,7% do total de neoplasias no sexo feminino e, para o triênio 2020-2022, estima-se a ocorrência de 66.280 novos casos a cada ano, com um risco estimado de 61,61 novos casos para cada 100 mil habitantes (Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil, 2019).

As células dos tumores mamários podem ser divididas em subtipos de acordo com três características: (1) a expressão de receptores de estrogênio (ER: Estrogen Receptor), (2) a expressão de receptores de progesterona (PR: Progesterone Receptor) e (3) a amplificação da expressão dos receptores do fator de crescimento epitelial humano tipo 2 (HER-2). De acordo com a existência ou ausência desses 3 fatores, temos a classificação dos tipos tumorais. A linhagem celular MDA-MB-231 não apresenta nenhum dos fatores de classificação, sendo identificada como uma linhagem de células neoplásicas de Câncer de Mama Triplo-Negativo (TNBC: Triple-Negative Breast Cancer) (CHAVEZ; GARIMELLA; LIPKOWITZ, 2011).

Aproximadamente entre 10% e 15% das pacientes com câncer de mama são diagnosticadas com tumores do tipo Câncer de Mama Triplo Negativo (TNBC). Alguns dos principais alvos moleculares dos tratamentos por quimioterapia para carcinomas mamários são exatamente os receptores ER, PR e HER-2, que não são expressos nos TNBC. Com isso, esse tipo de neoplasia é, geralmente, de difícil tratamento, tendo prognóstico menos favorável, apresentando ainda um padrão mais agressivo, com a instalação precoce de metástases (ANDERS; CAREY, 2010).

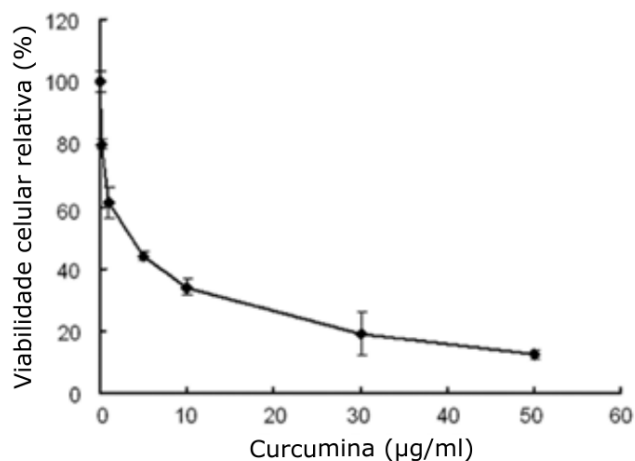
A linhagem celular MDA-MB-231 foi primeiramente isolada em 1973, a partir da efusão pleural de uma paciente com carcinoma de mama, de 51 anos, caucasiana,

constatando-se que o tipo celular é um adenocarcinoma pouco diferenciado, tendendo para uma configuração papilar, com a formação de túbulos (CAILLEAU et al., 1974). É uma das linhagens mais utilizadas na pesquisa oncológica em diversos campos, já existindo inclusive, ensaios que a relacionam com as substâncias de interesse do presente trabalho.

A Curcumina é capaz de inibir a proliferação celular de culturas da linhagem MDA-MB-231, conforme já demonstrado por vários autores. No entanto, a literatura diverge quanto às concentrações da substância eficazes nessa inibição. Estudos mostram que a CUR inibe a síntese de ácidos graxos de células dessa linhagem, induzindo sua apoptose de forma dose dependente, apresentando o valor de $3,63 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$ como IC_{50} (50% da concentração inibitória máxima) (FAN et al., 2016a). Esses resultados concordam parcialmente com o relatado por Liu et al. (2009) uma vez que, para estes autores, o valor de IC_{50} foi discretamente mais elevado, com uma concentração de $5,0 \mu\text{g/mL}$ de CUR sendo eficaz na inibição de 50-60% da cultura celular em 48 horas. O ensaio elucidou ainda alguns dos mecanismos envolvidos na inibição do crescimento celular e apoptose induzidos pela CUR, constatando seu papel na inibição do fator de transcrição NF- κ B, na inibição da Ciclina D, uma proteína fundamental na regulação do ciclo celular, assim como na inibição da MMP-1, uma enzima da classe das collagenases. Já de acordo com os resultados encontrados por Chiu e Su (2009), o valor de IC_{50} da CUR foi $16,25 \mu\text{g/mL}$, mais de quatro vezes e mais de três vezes superior aos valores determinados nos demais ensaios, concentração esta que vai de encontro aos dados expostos quatro anos mais tarde por Cine et al. (2013), que constatou um IC_{50} de $14,73 \mu\text{g/mL}$.

A relação entre a concentração de CUR e a viabilidade celular encontrada no estudo realizado por Fan et al (2016) foi reproduzida na Figura 3-12.

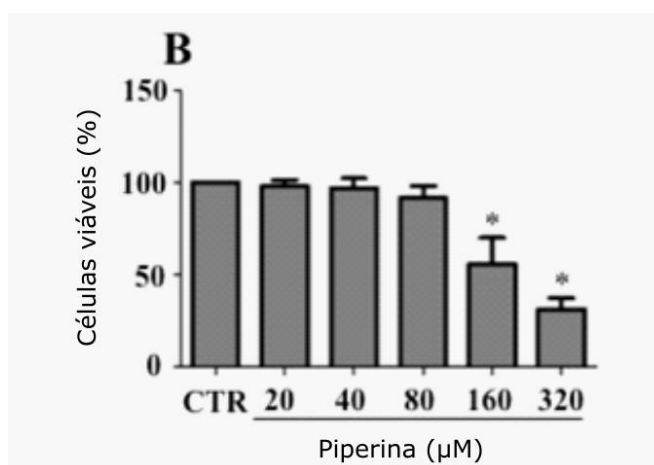
Figura 3-12: Gráfico evidenciando os efeitos dose dependentes da Curcumina na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231.



Fonte: FAN et al., 2016 (Adaptada).

A Piperina também já demonstrou efeitos inibitórios na linhagem celular de interesse, potencializando a eficácia de medicamentos tanto *in vitro* quanto em modelo animal com camundongos. Os efeitos observados são provavelmente causados pela inibição da Survivina, uma proteína inibidora da apoptose, e da inibição da fosforilação da proteína p65, um dos membros da família de fatores de transcrição NF-κB (ABDELHAMED et al., 2014). A PIP também se mostrou citotóxica para as células MDA-MB-231 quando usada isoladamente. O valor de IC₅₀ constatado foi de 238µg/mL (FONSECA et al., 2020), com o perfil completo de inibição sendo reproduzido na Figura 3-13.

Figura 3-13: Gráfico evidenciando os efeitos dose dependentes da Piperina na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231.



Fonte: FONSECA et al., 2020 (Adaptada).

Esse resultado obtido em 2020 foi capaz de complementar um estudo prévio realizado por Greenshields et al. (2015) que, apesar de não ter sido capaz de determinar um valor de IC_{50} , já havia estabelecido que esse era superior a $150\mu\text{g/mL}$, concentração máxima utilizada no trabalho.

Além das propriedades inibitórias sobre as células MDA-MB-231, demonstradas pelas duas substâncias foco desse trabalho, já foi constatada a eficácia da CUR como radiosensibilizante para essa linhagem. Utilizando feixes de raios X originados por um Linac, as células foram irradiadas com doses de 2, 4, 6 e 9 Gy, sendo constatada a radiosensibilização com as dosagens de $5\mu\text{mol/L}$ e $10\mu\text{mol/L}$ de CUR, sendo observada, no entanto, propriedade radioprotetora na dosagem $2,5\mu\text{mol/L}$ (MINAFRA et al., 2019).

4. APLICAÇÕES DA CURCUMINA EM RADIOTERAPIA

O presente capítulo foi desenvolvido como artigo científico de revisão, intitulado “Prospects of the Application of Curcumin in Radiation Therapy”, apresentado no International Nuclear Atlantic Conference (INAC), edição 2019, ocorrido nos dias 21 a 25 de outubro, em Santos/SP. O artigo, em sua íntegra, está apresentado no Anexo A.

4.1. Introduction

The Turmeric, also known as Curcuma, has been used for more than 5.000 years in the Indian culture both as a spice and as treatment for various morbidities on the Ayurveda therapies (AGGARWAL et al., 2007). Reports on the culinary use of the herb in China, as well as its therapeutic use in the Chinese Traditional Medicine, go back thousands of years (ZHANG et al., 2017). The extract used on both ends is obtained from *Curcuma longa* rhizome, a plant that belongs to the ginger family, being also the main responsible for the yellow color of the worldwide known curry spice, which is used mainly in the Indian, Turkish and Southern Asian cultures (PRIYADARSINI, 2014).

Dozens of herb extracts, among them Turmeric, attract growing scientific attention, aiming at proving and elucidating the properties traditionally attributed to them. For instance, the traditional use of Curcuma spice as a natural food preservative has stimulated research on its possible antibacterial and antifungal properties. These effects have already been extensively proven and reported (GUL; BAKHT, 2015)(HU et al., 2017)(KAZI et al., 2018). These results led to other studies that ended up showing benefits also on the treatment human fungal infections (UMA; HUANG; KUMAR, 2017). The active principle of Turmeric is the polyphenol Curcumin or Diferuloylmethane, with IUPAC definition (1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione). Its elucidation opened the way for the research of diverse medical applications. In the last few years, increasing evidence appears showing the beneficial properties of curcumin on the plasma lipid reduction (QIN et al., 2017), as immunomodulator (CATANZARO et al., 2018), as antioxidant (JHA et al., 2015), as antineoplastic agent for a variety of tumors like prostate (HEJAZI et al., 2016), lung

(SHAFIEE et al., 2017), breast (WANG et al., 2016), bladder (FALKE et al., 2018), ovary (SEO et al., 2016) among others (KUNNUMAKKARA et al., 2017). Recent benefits have also been reported on the treatment of metabolic syndrome (DI PIERRO et al., 2015) and on inflammatory states (CHIN, 2016). The greatest amount of data gathered so far led to the publication of some reviews on the positive results obtained with curcumin. The most recent ones date back to 2017 (HEWLINGS; KALMAN, 2017)(KOCAADAM; ŞANLIER, 2017). The diversity of applications, as well as the potential uses of *Curcuma longa*, have drawn the interest of our research group about the application of this phytotherapeutic on the nuclear sciences field.

Cancer continues being one of the main public health issues worldwide. According to the Brazilian National Cancer Institute (INCA) more than 14.1 million new cases were diagnosed in 2012. More than 8.2 million patients came to death in the same year as a consequence of the disease (INCA, 2018). Radiotherapy is one of the most important cancer treatment modalities. Even though it already shows suitable results for many tumors, the search of new adjuvant drugs is extremely important (WANG et al., 2018). The radiotherapy adjuvant drugs may be separated into two classes: the radiosensitizers and the radioprotectors. A radiosensitizing substance can be defined as the one that increases the radiation-induced damage both on the DNA level, as well as on a cellular level. A radioprotector compound is the one capable of minimizing the radio-induced toxicity in any tissue. Upon looking for adjuvant drugs for radiotherapy we could focus on the radiosensitization of tumoral cells (WANG et al., 2018)(MAIER et al., 2016), or on the radioprotection of the healthy tissues, that will be unavoidably irradiated during the treatment (GUDKOV; POPOVA; BRUSKOV, 2015). It is always desirable that the candidate substances show a favorable administration route, a low side effect profile, as well as an acceptable cost/benefit relation.

Curcuma longa has shown in numerous anti-inflammatory, immunomodulative and anti-neoplastic benefits, being also considered a secure phytotherapeutic in terms of side effects. These characteristics, allied to oral administration and low cost, put Curcumin as an exciting candidate as adjuvant to radiation therapy.

4.2. Metodology

This research group performed a systematic review of the scientific production on the use of curcumin on radiotherapy, published to this day, using the Medline, SciELO, Science Direct databases. An additional grey literature search was performed using the Google Scholar engine. The key words used were Curcumin, Curcuminoids, Turmeric, Curcuma longa, radiotherapy, radiosensitization and radioprotection.

4.3. Results

Reports evaluating the use of curcumin on radiotherapy are being produced for almost three decades. A review study by Goel and Aggarwal (2010) shows papers that date back to 1993. The authors were able to find demonstrations of the radiosensitization effect in vitro for cell lines of glioma, neuroblastoma, prostate and cervical tumors, as well as in vivo studies for colorectal and prostate neoplasms. The use of curcumin as a radioprotective agent was reported on lymphocyte lines, acting also on the reductions of pulmonary toxicity, mucositis and DNA level damage in mice (GOEL; AGGARWAL, 2010). Before this first review, the radiosensitizing and radioprotector effect of curcumin had already been reported by Jagetia (2007). Benefits were observed in animal model, and the probable biochemical mechanisms of action were addressed.

Verma (2016) performed a new literature review about Turmeric. His main objectives were stimulating its use in patients undergoing radiotherapy as well as encouraging the production of new clinical essays. The article reinforces various observations on the applications of curcumin. The main mechanism of its radiosensitizing action is the inhibition of the transcription factor NF- κ B. This compound is already widely related to tumorigenesis and radioresistance. This metabolic mechanism is established for the curcumin radiosensitization of lymphomas, sarcomas, prostate, cervical, gastrointestinal, breast, lung and head tumors. The author emphasizes that almost all data found referred to in vitro studies and, so far, there were no clinical benefits reported. The radioprotection granted by curcumin is even more consistent, though it was analyzed on fewer tissues. This benefit was observed in the reduction of post-irradiation dermatitis on breast cancer patients, on the reduction of cataract occurrence

after the treatment of central nervous system tumors, on the reduction of mucositis, as well as on the reduction of secondary tumors occurrence.

The present article will be limited to raising the recent outcomes and tendencies established after 2016. The three vast reviews already performed until that year made the analysis of previous publications expendable.

4.3.1. Head and neck

The radiosensitizing activity of curcumin on nasopharyngeal carcinoma cells was confirmed by Fan et al.(2016b), both in vitro and in vivo models. The action mechanism is related to the microRNA-593 that leads to a reduced expression of the multidrug resistance gene 1 (MDR-1). Curcumin's efficiency is also established on the radiosensitization of esophageal squamous-cell carcinoma as demonstrated by Liu et al (2018). The analyses of cell cultures showed the inhibition of the NF- κ B signaling pathway as the main target of the substance. The positive results were also found in animal models. Lv et al. (2018) published a broad review on the mechanisms of curcumin radiosensitization in esophageal cancer cells, gathering data that can be very useful for researchers in this field.

4.3.2. Cardiopulmonary system

The curcumin's low oral bioavailability issue has been constantly addressed. One of the methods developed to overcome this matter is the use of nanoparticles as curcumin carriers. Wen et al. (2017) have demonstrated the ability of these compounds on radiosensitizing pulmonary cancerous cells of the A549 lineage. The results were achieved both on cell cultures and on xenograft tumors. The essay is an important step in establishing mechanisms, efficient enough to be applied clinically. Working with the same cell line, originated from non small cell pulmonary tumor, Cai et al. (2019) showed the synergic effect of curcumin and cisplatin on neoplasm radiosensitization. The analysis indicates that the epidermal growth factor signaling pathway may be associated with this property. Curcumin was also capable of attenuating the cardiac damage secondary to radiation exposure in mice, as shown by Kolivand et al. (2018).

The substance was able to reduce the expression of IL-4, IL4Ra1, IL13Ra2, Duox1 and Duox2, as well as reducing the lymphocyte and macrophages infiltrate.

4.3.3. Genitourinary system

The medical application of curcumin has been limited due to the lack of clinical data that corroborates the experimental findings. In the last few years, it has been possible to watch an important shift on this scenario. Curcumin was able to reduce the oxidative status of patients undergoing prostate cancer treatment. It was achieved by enhancing the plasma total antioxidant capacity and lowering the superoxide dismutase activity. The result was obtained by Hejazi et al. (2016) on a double blind, randomized, placebo controlled study with 40 patients. Another essay, conducted with the same dynamics, evaluated the viability of using phytotherapies, including curcumin, on clinical trials with patients with biochemical recurrence of prostatic tumors. Although there were no significant differences on PSA level between the treated and placebo groups, the study was successful in showing the feasibility of this type of trial (VAN DIE et al., 2017). Curcumin has also failed in reducing prostatitis and cystitis of patients under radiotherapy for prostatic cancer. The use of oral nanocurcumin was initiated three days prior to treatment, and maintained through the whole cycle. Even though no benefits were achieved, this was one more step taken on the translation from laboratory essays for clinical applications (SAADIPOOR et al., 2019).

Curcumin and other mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitors were evaluated as radiosensitizers on cervical cancer cell lines. Assad et al. (2018) demonstrated not only the efficacy of curcumin, but also its selectivity to tumoral cells. The result reinforces the extremely low toxicity property of this substance, as already shown.

The recurrence of ovary and uterus tumors is frequently reported. Tumoral radioresistance frequently limits the therapeutic possibilities in such cases. Favorable results in tumoral re-sensitization were obtained by Momtazi-Borojeni et al. (2019). The various metabolic pathways in which curcumin could perform this action are already elucidated and were reported by the authors.

The inhibition of the NF- κ B signaling pathway was approached one more time by Li et al. (2017). The essay demonstrated the radiosensitization capacity of curcumin on

renal carcinoma cells. Radioresistance is an important barrier for the efficacy of treatments for this type of tumor. The results were obtained both on in vitro model and on xenograft tumor in mice.

4.3.4. Gastrointestinal system

Radiotherapy for gastrointestinal tumors, despite its efficiency, shows frequent side effects. An animal model essay performed by Verginadis et al. (2016) demonstrated that curcumin is able to reduce the inflammatory cytokine levels and local intestinal fibrosis in mice exposed to radiation.

The translation in clinical studies is also observed in this field. A randomized, double blind, phase II essay built by Gunther et al. (2017) evaluated the efficacy of curcumin in patients with locally advanced rectum tumors. No significant benefits were shown, but the authors were not able to achieve a definitive conclusion due to the considerable tissue bioavailability variation among patients. The absorption and bioavailability continue as key factors in the clinical application of curcumin. A number of ways to improve this matter have already been proposed. On colorectal tumors these attempts pass through the application of liposomes, micelles, polymeric nanoparticles, nanogels, cyclodextrin, lipid based nanoparticles and gold nanoparticles. The outcomes of these delivery mechanisms are positive, but a larger number of in vivo essays is necessary prior to the translation to clinical trials (WONG et al., 2019).

4.3.5. Radiotherapy side effects

On a large number of situations radiotherapy treatments are not limited by tumoral response, but rather by the deleterious effects in the health tissues induced by the procedures. For this reason, the development of radioprotective substances that minimize the damage of healthy tissues is mandatory.

Mucositis on the oral region is one of the most important side effects of head and neck cancer treatments. Curcumin shows beneficial effects on reducing mucositis, pain, erythema and ulcerated area, when applied to these patients, as reported on a review

by Normando et al. (2019). These results were confirmed by Delavarian et al. (2019). In this essay only 32% of the patients treated with curcumin evolved with mucositis as radiotherapy side effect, while 100% of individuals were affected on the control group. A remarkable aspect was the diversity of administration routes among the trials. Curcumin was applied topically as a gel, as mouthwash and orally in nanomicelles, showing benefits on all routes. These trials succeeded not only on establishing other applications to turmeric, but also on expanding the possibilities of clinical uses.

Synthetic curcumin analogs also present favorable results on preventing intestinal mucosa damage in animal models. Fukuda et al. (2016) found positive outcomes upon using the compound GO-Y031, a curcumin like synthetic substance, in mice exposed to radiation. The search for this class of analogues is another possibility of compensating the low bioavailability frequently reported.

Another common side effect of radiotherapy is dermatitis. Opposing the results reported by Verma (2016), Wolf et al. (2018) did not find benefits on the application of curcumin on breast cancer treatment. The essay included 686 patients, being the largest performed so far, and evaluated the improvement of dermatitis, pain, life quality and other symptoms in women under radiotherapy protocol. No statistical significance was achieved in any of the variables in comparison with the control group.

4.4. Conclusions

This review aims at raising the possibilities of applying curcumin as an adjuvant substance on radiotherapy treatments. A vast number of essays have been performed so far, evaluating the both the radiosensitizing and the radioprotective properties of the Turmeric active principle. There is multiple evidence for the beneficial effects of the substance, both on sensitizing tumoral cells as on lowering the radiation damage of healthy tissues. Recent essays provide even more support for the use of curcumin on tumors of the nasopharynx, esophagus, lungs, heart, prostate, kidneys, cervix and intestines, among others. Radioprotective effects were established mainly for the prevention of mucositis of the gastrointestinal tract. Curcumin has shown positive laboratorial results for decades. However, the translation to clinical trials has faced

barriers for years. A limiting factor, frequently reported, is the low bioavailability of the compound. Curcumin has a very low solubility in water, what leads to a low and sometimes erratic absorption. Recent studies have been seeking ways to surpass this blockage through the development of lipid substances and various nanocompounds, but it remains a broad field of research. This review demonstrated an important shift on curcumin essays, as a growing number of clinical trials are being published. The lack of clinical studies has been a point of concern in the last few years, as the laboratory results could not be corroborated on patients. Phase I and II trials have already been conducted, with beneficial results on the majority of them. At the present date 10 other studies relating curcumin and radiotherapy are registered on the "clinicaltrials.gov" database. The vast number of beneficial results already observed in the application of curcumin as an adjuvant in radiotherapy should encourage additional studies. The bioavailability of the substance is still one more issue to be addressed in future essays.

5. A CURCUMINA E A PIPERINA NA MODULAÇÃO DE CITOCINAS E SEU PAPEL NA RADIOTERAPIA

A análise do papel dos fitoterápicos de interesse na modulação de citocinas, assim como um possível emprego dessa correlação em procedimentos de radioterapia, foi realizada na forma de revisão bibliográfica, estruturada como artigo científico a ser publicado oportunamente. O artigo, em sua íntegra, está apresentado no Anexo B.

5.1. Introdução

Os fitoterápicos, produtos de origem natural com propriedades farmacológicas, recebem cada vez mais atenção mundialmente, apresentando uma ampla gama de efeitos terapêuticos, custo geralmente favorável, quando comparados com medicamentos alopáticos, assim como um bom perfil de segurança, uma vez que geralmente também são utilizados como alimentos (CALIXTO, 2000). A *Curcuma longa*, referenciada como Cúrcuma ou Turmérico, espécie vegetal que apresenta como princípio ativo a Curcumina (CUR), e a *Piper nigrum*, popularmente conhecida como Pimenta-preta, tendo a Piperina (PIP) como princípio ativo, são dois fitoterápicos utilizados há milênios, inicialmente nas culturas do Sudeste Asiático, já sendo amplamente difundidos em todos os continentes. Os dois nutracêuticos apresentam baixíssimo perfil de toxicidade, baixo custo final, amplo perfil de eficácia e emprego em vários campos da medicina (ZHENG et al., 2016).

As citocinas são alguns dos principais sinalizadores celulares, tendo papel fundamental na resposta inflamatória e imunológica. São amplamente usadas como marcadores dessas classes de respostas orgânicas. Esse emprego é observado em estudos de adequabilidade de tratamentos de radioterapia, uma vez que essa modalidade terapêutica induz respostas inflamatórias importantes.

As propriedades radioprotetoras e radiosensibilizantes da CUR e da PIP já são estudadas há décadas. Uma vez que alguns dos principais mecanismos de ação dessas substâncias envolvem propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, a avaliação da atividade desses fitoterápicos através da monitorização da supressão ou

estimulação de citocinas apresenta ampla aplicabilidade. O presente trabalho busca levantar a bibliografia disponível sobre o emprego das citocinas como marcadores da resposta orgânica à radiação, assim como marcadores da efetividade da CUR e PIP como radioprotetores ou radiosensibilizadores em procedimentos de radioterapia.

5.2. As citocinas e a resposta inflamatória sistêmica

As citocinas são um grupo heterogêneo de glicoproteínas importantes na sinalização imunológica, sendo produzidas por diversos tipos celulares. São peptídeos de ~5-30 kDa que não atravessam a bicamada lipídica celular, sendo internalizadas a partir de receptores de membrana. Essas moléculas são responsáveis por sincronizar as respostas do sistema imunológico tanto em duração quanto em intensidade. Seus efeitos podem ocorrer na própria célula produtora, conhecido como efeito autócrino; em células vizinhas, dito efeito parácrino, ou em células de tecidos distantes, sendo esse o efeito endócrino, semelhante ao dos hormônios.

Algumas das citocinas podem produzir efeitos tanto pró, quanto anti-inflamatórios, de acordo com o estímulo recebido, no entanto, a maior parte das substâncias da família das citocinas inflamatórias apresenta efeitos somente em um dos extremos, com suas concentrações plasmáticas variando muito durante o curso de uma doença ou processo inflamatório (KASSAB et al., 2019).

5.3. Classificação das citocinas

Não existe atualmente um sistema de classificação unificado para as citocinas, sendo aceitável sua divisão em Interleucinas, Fatores de Necrose Tumoral (TNF – Tumoral Necrosis Factors), Interferons e Adipocinas.

5.3.1. Interferons e Adipocinas

As citocinas dos tipos Interferons e Adipocinas, diferentemente dos demais grupos, são pouco empregadas em estudos radioterapêuticos. As primeiras estão

principalmente relacionadas à resposta imunológica contra infecções virais. Foi demonstrado, no entanto, que os Interferons podem ter papel na resposta a estímulos provocados por bactérias, compostos de baixo peso molecular e alguns antígenos. Além disso, observa-se que tratamentos com Interferons associados à quimioterapia podem ampliar a atividade antitumoral (STANTON et al., 1987).

Já as Adipocinas são entendidas como o grupo de fatores secretados pelo tecido adiposo. Suas funções ainda não são completamente compreendidas, sendo de grande importância sua ação pró inflamatória, associada a grande parte dos efeitos deletérios relacionados com a obesidade e adiposidade central, principalmente na elevação do risco cardiovascular e na síndrome metabólica (OUCHI et al., 2011).

5.3.2. Interleucinas

As Interleucinas são um amplo grupo de proteínas imunomoduladoras podendo atuar no crescimento, diferenciação e ativação celulares. Alguns elementos desse grupo, como as IL-1, IL-2, IL-6, IL-9, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 e IL-20, estão mais frequentemente relacionados à ampliação da resposta imunológica, sendo consideradas como pró-inflamatórias na maior parte dos contextos. Um outro grupo, composto pelas IL-3, IL-7, IL-9 e IL-11, está mais frequentemente relacionado à maturação celular. As interleucinas IL-4, IL-5 e IL-6 atuam nos processos imunológicos em infecções parasitárias, assim como nos processos alérgicos. Já as IL-2, IL-10, IL-13 e IL-19 apresentam conhecida ação imunomoduladora, com os três últimos exemplares sendo imunossupressores (VARELLA; FORTE, 2001).

5.3.3. Fatores de necrose tumoral

Dentro da família dos Fatores de Necrose Tumoral, temos o TNF- α como membro mais referenciado. O fator é uma proteína transmembrana, que pode funcionar tanto como uma proteína integrada à membrana, quanto como uma citocina solúvel no meio, após ser clivado de sua posição original. Uma vez liberado da membrana, o TNF- α se liga a seu receptor, o TNFR1, ativando várias vias de transdução de sinal. A ativação dessas vias pode levar à fosforilação do I κ B, ativando o NF- κ B e induzindo

vários mediadores inflamatórios. Nos casos de comprometimento celular, em que as vias de ativação e proteção mediadas pelo NF- κ B estejam comprometidas, o TNF- α ativa a proteína Caspase 8 iniciando o processo de apoptose celular (BALKWILL, 2006). Apesar de ter papel fundamental na resposta inflamatória de defesa do organismo, a atividade desregulada do TNF- α está associada a diversas doenças autoimunes, sendo as terapias de inibição do fator um importante campo de estudos científicos (PALLADINO et al., 2003).

5.3.4. O papel do fator de transcrição NF- κ B e do inibidor I κ B

No contexto das Ciências das Radiações, a relação entre o fator de transcrição (TF), denominado Fator Nuclear κ B (NF- κ B), e a produção de algumas citocinas, demonstra especial importância. Fatores de transcrição são proteínas que iniciam ou estimulam o aumento da transcrição de determinados genes do DNA para o RNA mensageiro, se ligando a uma sequência de DNA específica. Assim conseguem “ligar” ou “desligar” um gene determinado. O NF- κ B pode ser ativado por uma grande variedade de estímulos e pode controlar diversos genes e respostas biológicas, estando envolvido em várias doenças humanas. Por este motivo, o NF- κ B é alvo de diversas drogas anti-inflamatórias e anticâncer (BALDWIN, 2001). O NF- κ B fica localizado no citoplasma celular, como um dímero proteico, ligado a um inibidor denominado I κ B. Várias substâncias como a IL-1, TNF- α , lipopolissacárides e, em alguns casos, o peróxido de hidrogênio produzido por estresse oxidativo, podem ativar enzimas que fosforilam o I κ B, ativando assim o NF- κ B, que se desloca para o núcleo onde se liga aos genes alvo (VAN DEN BERG et al., 2001).

Alguns dos genes regulados pelo NF- κ B são responsáveis pela transcrição de diversas citocinas, como a IL-2, IL-6, IL-8, IL12, TNF- α , entre outras. A ativação de citocinas pró-inflamatórias potentes, como a IL-6 e o TNF- α , faz com que o bloqueio desse fator de transcrição seja amplamente pesquisado, tanto visando o manejo de doenças inflamatórias diretamente, quanto no controle de respostas inflamatórias iniciadas por agressões exógenas, como exposição à radiação ionizante, por exemplo (BALDWIN, 2001). Cabe esclarecer, no entanto, que proteínas da família NF- κ B são essenciais para o desenvolvimento de vários tecidos e na proteção de células contra a apoptose. Seu papel na patogênese de diversas morbidades está ligado à sua

ativação anormal, observada no contexto de doenças genéticas, infecções virais, proliferação celular desregulada e inflamações (AGGARWAL et al., 2004).

Uma vez ativados pelo Fator Nuclear κ B, ou por outras vias imunológicas, os vários tipos de citocinas passam a desempenhar seus papéis locais ou sistêmicos.

5.4. O papel das citocinas na cancerologia e radioterapia

O uso de citocinas como marcadores na evolução do tratamento de neoplasias já é feito há décadas. A literatura apresenta ensaios estabelecendo a relação entre tipos de neoplasias e citocinas específicas, os mecanismos de modulação destas, assim como sua relação com o tratamento de vários tipos de câncer.

5.4.1. IL-6 e IL-10 plasmático e Linfoma de Hodgkin

Um exemplo da aplicação das interleucinas na cancerologia pode ser observado na estreita relação em os níveis de IL-6 e IL-10 no plasma de pacientes com Linfoma de Hodgkin. Os níveis dessas interleucinas se apresentam muito elevados nos indivíduos diagnosticados com a doença, apresentando um declínio e quase normalização após o tratamento com quimioterapia convencional. Somado a isso, níveis muito elevados de IL-6 pré-tratamento podem estar relacionados à maior ocorrência de falha terapêutica (GAIOLLA et al., 2011).

5.4.2. Expressão de Interleucinas pós procedimentos de radioterapia

Os procedimentos de radioterapia estão historicamente relacionados à imunossupressão. Tal constatação foi baseada em estudos de irradiação de corpo inteiro (TBI - Total body irradiation), que levavam à redução dos níveis de linfócitos, ante à grande radiosensibilidade da medula óssea, onde estão as células progenitoras destas linhagens. No entanto, enquanto a irradiação de corpo inteiro pode ser considerada “imunossupressora”, procedimentos focais, empregados no tratamento de tumores sólidos, causam alterações no microambiente tumoral, levando a uma ativação de múltiplas células do sistema imune, que podem suprimir ou mesmo

estimular o crescimento tumoral. A maior parte dos processos de ativação dos fatores pró-inflamatórios é iniciada com a ativação da via de dano do DNA (DNA damage pathway). Os danos ao DNA causados pela radiação levam à ativação de uma enzima de correção denominada ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). A ATM, por sua vez, ativa os fatores de transcrição p53 e NF- κ B, que promovem uma resposta imune pró-inflamatória com a expressão de interleucinas, TNF- α , quimiocinas, entre outros (SHIAO; COUSSENS, 2010).

5.4.3. IL-6, IL-10 e TNF preditores dos efeitos deletérios da radioterapia

As citocinas do tipo IL e TNF são importantes marcadores da resposta orgânica às radiações ionizantes em diversos contextos. Elevações precoces nos níveis de IL-6 e IL-10 em pacientes submetidos a procedimentos de radioterapia torácica são preditores independentes de complicações por pneumonite (ARPIN et al., 2005). A ativação do conjunto de interleucinas pró-inflamatórias, assim como as elevações nos biomarcadores que indicam atividade dessas interleucinas, podem estar associadas à sintomas de fadiga observados em pacientes submetidos a radioterapia para neoplasias de mama e próstata (BOWER et al., 2009).

Ainda considerando as neoplasias prostáticas, os níveis plasmáticos de IL-6, assim como de seu receptor solúvel IL-6sR (IL-6 “s” *soluble* “R” *Receptor*) estão associados tanto com a progressão dos tumores quanto com a presença de metástases. Shariat et al. (2001) observaram que os níveis dos marcadores se elevam dramaticamente em pacientes com metástases prostáticas ósseas, sendo também preditores de progressão bioquímica das neoplasias após cirurgias de prostatectomia total, provavelmente sendo indicadores de doença metastática oculta pré-cirurgia.

5.4.4. Elevação da IL-6 no microambiente tumoral

A desregulação da secreção de citocinas pelas neoplasias é notória, sendo a IL-6 um dos principais marcadores do microambiente tumoral, apresentando níveis elevados em praticamente todos os cânceres. Essa elevação reflete o potencial inflamatório dos tumores, trazendo ainda um outro desafio, uma vez que os níveis elevados da própria

IL-6 conferem proteção às células cancerosas, dificultando os danos em seu DNA, aumentando sua resistência ao estresse oxidativo e à apoptose radioinduzida. Com isso, a associação dos tratamentos oncológicos convencionais com o bloqueio ou inibição da IL-6 pode ser uma estratégia terapêutica promissora (KUMARI et al., 2016).

5.4.5. Paradoxo da IL-6

O papel da IL-6, no entanto, pode, por vezes, parecer paradoxal. A supressão de células hematopoiéticas pós radioterapia é um efeito adverso potencialmente grave, uma vez que expõe o organismo a infecções oportunistas. Nesse contexto, já foi relatado o potencial da IL-6 no aumento da velocidade de regeneração das linhagens de células sanguíneas após procedimentos de radioterapia (PATCHEN et al., 1991). Com isso observa-se o grau de complexidade das respostas clínicas às citocinas, podendo ser benéficas ou deletérias, dependendo do contexto e emprego analisados.

5.4.6. Potencial das IL-2 e IL-12 na radioterapia

Não só as IL-6 e IL-10 apresentam interesse científico para as ciências das radiações. Foi demonstrado que a associação de IL-2 e IL-12 pode potencializar os efeitos da radioterapia. Estudo em camundongos com carcinoma de células escamosas em cabeça e pescoço, demonstrou que a terapia com os genes da IL-2 e IL-12 gerou uma resposta imune potente com aumento dos efeitos antitumorais da radioterapia, elevação da infiltração linfocitária e da necrose tumoral, quando comparado com a monoterapia (XIAN et al., 2005).

O potencial da associação entre a IL-2 e a radioterapia também foi observada em humanos. Estudo de fase 1 constatou que a combinação da radioterapia estereotática e de corpo inteiro com a aplicação de IL-2 pode ser mais eficaz que as terapias atuais no tratamento de melanoma metastático e no carcinoma de células renais, duas das neoplasias de pior prognóstico e com maiores restrições de tratamento (SEUNG et al., 2012).

5.4.7. Correlação da IL-8 com o prognóstico em radioterapia de pulmão

Os níveis séricos de IL-8 estão associados com a taxa de sobrevivência de pacientes com câncer de pulmão submetidos à radioterapia. Crohns et al. (2010) demonstraram que níveis séricos de IL-8 mais elevados pré-radioterapia estão associados a piores respostas ao tratamento. Constataram ainda que os níveis de IL-6 no lavado bronco-alveolar aumentaram após o procedimento, indicando a resposta inflamatória local, mas sem repercussões no desfecho terapêutico.

5.4.8. Interleucinas e mucosite

A resposta inflamatória local pode ter repercussões muito negativas durante os tratamentos radioterapêuticos, como, por exemplo, na mucosite induzida por radiação. Nesse contexto, a presença de interleucinas anti-inflamatórias pode ser benéfica, como demonstrado por Sonis et al (2000). O estudo demonstrou o potencial da IL-11 na modulação da mucosite aguda induzida pela radiação em modelo animal, através da atenuação da expressão de citocinas pró inflamatórias.

Como demonstrado, o papel das citocinas tanto na resposta aos tratamentos radioterapêuticos, quanto na limitação das reações adversas a essas intervenções, é um vasto campo de pesquisas.

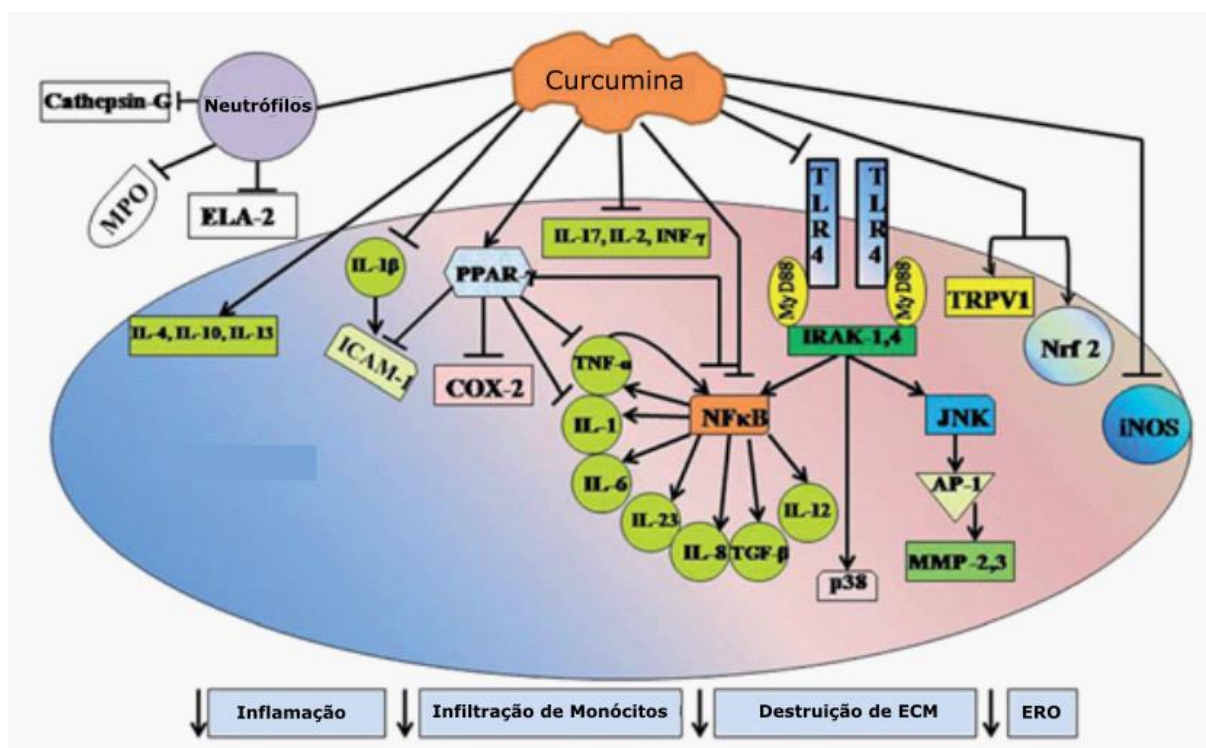
5.5. Fitoterápicos como agentes moduladores de citocinas

A modulação da produção de citocinas pode ser feita por diversos patógenos exógenos, por substâncias endógenas nas doenças autoimunes, pela aplicação de proteínas sintéticas, ou mesmo pelo uso de fitoterápicos. A elucidação dos mecanismos de ação dos fitoterápicos na modulação das citocinas pode trazer à luz a melhor forma de emprego desses nutracêuticos. As citocinas podem ser usadas então como biomarcadores, avaliando, por exemplo, a resposta imune do microambiente tumoral, após o emprego de um fitoterápico radiosensibilizador ou radioprotetor em coadjuvância com a radioterapia.

5.5.1. Efeitos da Curcumina na expressão de citocinas

A Curcumina apresenta um perfil de segurança muito favorável, não apresentando toxicidade em humanos, mesmo em consumo diário contínuo de 8 g/dia (CHENG et al., 2001). Esse composto tem sido investigado como antioxidante, hepatoprotetor, anti-inflamatório, anticarcinogênico, e antimicrobial, sendo empregado ainda em doenças cardiovasculares e gastrointestinais (RAVINDRAM; BABU; SIVARAMAN, 2007). Uma revisão publicada por este grupo de pesquisa demonstrou um apanhado das propriedades radioprotetoras e radiosensibilizadoras da CUR (COSTA; CAMPOS, 2019). Os principais alvos moleculares modulados pela Curcumina podem ser observados na Figura 5-1.

Figura 5-1: Alvos moleculares modulados pela Curcumina.



Fonte: (BALIGA et al., 2012) (Adaptada).

5.5.1.1. *A Curcumina como imunomodulador*

A CUR é um potente agente imunomodulador, com potencial de ação estabelecido para vários tipos celulares. Provavelmente através da inativação do fator de transcrição NF- κ B, a CUR é capaz de reduzir a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, assim como algumas quimiocinas (JAGETIA; AGGARWAL, 2007). O bloqueio da ativação do NF- κ B pela CUR é obtida mesmo quando a expressão do fator de transcrição é estimulada por várias substâncias, como ésteres, peróxido de hidrogênio e pelo próprio TNF- α . A CUR tem uma ação inibitória tão potente que é capaz de sobrepujar a ação desses vários ativadores (SINGH; AGGARWAL, 1995).

5.5.1.2. *A Curcumina reduz o stress oxidativo celular*

A CUR é capaz de reduzir o status oxidativo celular, inibir enzimas promotoras da inflamação, suprimir a atividade da óxido nítrico sintase (iNOX), da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e da lipoxigenase (LOX), sendo eficaz ainda na inibição a secreção de IL-6 e IL-8 induzidas pelo TNF α , além da inibição direta dessas interleucinas, como já descrito (SHEHZAD; REHMAN; LEE, 2013).

5.5.1.3. *A Curcumina em ação na regulação de IL-6 e IL-1 na COVID-19*

A COVID-19, morbidade que tem assolado todo o mundo na atual pandemia de 2019-2021, tem demonstrado potencial de causar sérias complicações, algumas dessas relacionadas à tempestade de citocinas observada nos quadros mais graves. Foi demonstrado que a CUR, administrada em pacientes infectados pelo SARS-COV-2, foi capaz de reduzir a expressão de IL-6 e IL-1, não demonstrando efeitos sobre os níveis de TNF- α e IL-18 (VALIZADEH et al., 2020).

5.5.1.4. *A Curcumina na redução da IL-1, IL-4 e VEGF na obesidade*

Além das doenças infecciosas, a obesidade também tem sido utilizada como modelo de inflamação sistêmica, ante a capacidade do tecido adiposo em produzir agentes

pró-inflamatórios como as adipocinas, estimulando direta ou indiretamente a secreção de outras citocinas. Essa inflamação crônica sistêmica é apontada como um dos grandes fatores deletérios da obesidade. Em um ensaio randomizado com 30 indivíduos, a CUR demonstrou capacidade de reduzir os níveis séricos de IL-1, IL-4 e de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-2, IL-6, IL-8 e IL-10 (ESMAILY et al., 2014).

5.5.1.5. Curcumina inibindo TNF- α , IL-6, IL-8, TGF β induzidos por irradiação torácica

Os benefícios do fitoterápico também foram demonstrados na prevenção da pneumonite induzida pela radiação, um importante fator limitante na radioterapia torácica. A CUR foi capaz de inibir o fator de transcrição NF- κ B em camundongos, inibindo fatores inflamatórios como TNF- α , IL-6, IL-8, TGF β induzidos por irradiação torácica. Os resultados indicam que a CUR pode mitigar a pneumonite induzida por radiação, reduzindo a fibrose pulmonar (SHI et al., 2012)

5.5.1.6. CUR na inibição do TNF- α e COX-2 inibindo NF κ B na radiação

O potencial na redução da fibrose e inflamação pulmonar induzidas pela radiação foi novamente demonstrada em ratos por Cho et al (2013), que relatou a eficácia da CUR na inibição do TNF- α e COX-2 inibindo ainda o NF- κ B, como já previamente demonstrado (CHO et al., 2013). A inibição desse fator de transcrição provavelmente apresenta mais benefícios que apenas a redução do status inflamatório de indivíduos expostos à radiação. A CUR, através do mesmo mecanismo, levou à supressão dos genes dos fatores de necrose tumoral em células de neuroblastoma humano, o que aumentou a apoptose celular induzida pela radiação, demonstrando que as propriedades radiosensibilizantes da CUR provavelmente também ocorrem pela modulação de citocinas (ARAVINDAN et al., 2008).

5.5.2. Efeitos da Piperina na expressão de citocinas

Assim como observado para a Curcumina, o potencial da Piperina na ativação do sistema imunológico e, principalmente, sua capacidade na modulação da expressão de citocinas já foram demonstrados em vários estudos.

5.5.2.1. *A PIP com via de ação no NFκB indução da IL-1β e inibição da IL-6*

A PIP é um potente anti-inflamatório e antioxidante, sendo que a inibição da expressão do fator de transcrição NF-κB também parece ser uma de suas principais vias de atuação, assim como observado para a CUR (AZAB et al., 2017)(KUMAR et al., 2007) (PRADEEP; KUTTAN, 2004). Essa, no entanto, não é a única via de ação do fitoterápico, uma vez que a PIP inibe a expressão de IL-6 induzida pela IL-1β, de forma dose dependente, aparentemente através da supressão da via de sinalização p38 MAPK, conforme demonstrado em estudo realizado com células de câncer de estômago (XIA et al., 2015).

5.5.2.2. *PIP reduz ação de citocinas pró-inflamatórias IL-1β IL-6 TNFα GM-CSF*

Sabe-se ainda que a PIP é capaz de reduzir a expressão de das citocinas inflamatórias IL-1β, IL-6, TNFα e GM-CSF (Fator estimulador de colônias granulócitos-macrófagos), tanto através da inibição da ativação do fator de transcrição NF-κB, quanto pela inibição da transcrição dos genes das citocinas diretamente, como constatado em experimento realizado com células de melanoma (PRADEEP; KUTTAN, 2004). O mesmo achado foi obtido quando a PIP foi empregada em linhagem celular do tipo BV2 de micróglia. A inibição da expressão das citocinas inflamatórias IL-1β, IL-6 e TNF-α foi mais uma vez constatada, demonstrando tanto o potencial da PIP no tratamento de doenças neurodegenerativas, como em outras aplicações que envolvam o status inflamatório (WANG-SHENG et al., 2017). Apesar de uma ação anti-inflamatória bem estabelecida, os mecanismos de ação da PIP talvez não sejam tão simples e diretos, ou nem mesmo únicos. Quando administrada conjuntamente com lipopolissacarídeo (LPS), um potente estimulador de resposta inflamatória, a PIP foi capaz de inibir a expressão de TNFα, não tendo, no entanto, nenhuma ação sobre

5.6. Considerações finais

O potencial de imunomodulação da CUR já está bem estabelecido, assim como seu papel na ativação de diversas citocinas. Com isso, a avaliação da expressão de algumas interleucinas e do TNF- α , pode ser um importante marcador da atividade da CUR em novos contextos, como em sua aplicação na radioterapia para redução dos efeitos deletérios no tecido sadio e na intensificação dos efeitos radio tóxicos tumorais. Os achados já obtidos no emprego das citocinas como marcadores da bioatividade da PIP, demonstram, mais uma vez, que essa diversa e complexa classe de substâncias pode ser empregada na proposta de ensaios combinados com radiação.

O potencial de sinergia entre a CUR e PIP pode ser observado não somente pela avaliação direta da resposta celular à irradiação in vitro, mas também através de modulação da resposta inflamatória radio induzida in vivo com a maior ou menor expressão de citocinas.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Principais materiais

- . Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-231 (NRI).
- . Curcumina comercializada pela empresa Sigma-Aldrich, referência C1386.
- . Piperina comercializada pela empresa Sigma-Aldrich, referência P49007.
- . Dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente das substâncias de interesse.
- . Filtro de nylon para filtragem do DMSO.
- . Conjunto de frascos T-25 para cultura.
- . Incubadora de CO₂ para cultura celular, com umidificador (NRI).
- . Microscópio ótico invertido (Culemman) com câmera fotográfica DSLR acoplada (Canon) (NRI).
- . Freezer de armazenamento de células com temperatura de conservação -80°C.
- . Meio de cultura RPMI-1640 (CultiLab).
- . Soro fetal bovino, filtrado e inativado.
- . Filtros autoclaváveis 0,22 µm e 0,45 µm para esterilização.
- . Banho maria.
- . Autoclave.
- . Vibrador magnético.
- . Refrigeradores -8°C e -20°C.
- . Antibióticos gentamicina e estreptomicina.
- . Software ImageJ (NIH)

6.2. Métodos

Cultura Celular. Células da linhagem MDA-MB-231, de adenocarcinoma de mama de origem do ATCC (EUA), congeladas no banco de células cancerosas do Núcleo de Radiações Ionizantes (NRI), foram empregadas no experimento. As células MDA-MB-231 foram descongeladas e semeadas em concentração de 1×10^6 células/mL em 08 frascos modelo T-25, com 10 mL de meio completo. O meio completo foi elaborado com RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), 1% de soro fetal bovino (SBF, CultiLab), e os antibióticos gentamicina (50 µg/mL) e estreptomicina (500mg/mL). As culturas foram realizadas em incubadora com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C até

atingir confluência, mantendo o crescimento celular acompanhado com microscopia de inversão a cada 24h (BUTLER; DAWSON, 1992).

Reagentes de interesse. Curcumina em pó ((E,E)-1,7-bis(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) extraída da *Curcuma longa* (Sigma-Aldrich), referência C1386, foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO), após filtragem com nylon, para elaboração de uma solução de armazenamento com concentração 100 mmol/L, estocada a -20°C. Piperina ((E,E)-5-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4-pentadienoylpiperidide) (Sigma-Aldrich), referência P49007, foi diluída também em DMSO, com solução de armazenamento com a mesma concentração. Para a realização dos experimentos uma nova diluição das substâncias foi realizada.

Grupos experimentais. Após atingir a confluência, os 8 frascos T-25, contendo as culturas celulares, foram lavados com RPMI para promover a remoção do soro fetal bovino. Tal intervenção é necessária para possibilitar, futuramente, a análise do perfil de citocinas e proteínas presentes no sobrenadante das culturas, em coletas isoladas. Em seguida, foram introduzidos 10mL de um novo meio de cultura, composto por RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), gentamicina (50 µg/mL) e estreptomicina (500mg/mL). O meio foi então complementado com as substâncias de interesse, diluídas em DMSO, atingindo concentrações finais: Curcumina isolada 8 µmol/L, Piperina isolada 40 µmol/L, Curcumina e Piperina associadas 7 µmol/L e 35 µmol/L respectivamente. Os frascos T-25 foram divididos em quatro setores e cada um dos setores foi analisado separadamente ao longo do ensaio. Os grupos de análise constam na Tabela 6-1.

Controle. O controle foi realizado com cultura da linhagem MDA-MB-231 não irradiada, mantida como descrito, com a adição de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), gentamicina (50 µg/mL) e estreptomicina (500mg/mL), num total de 10mL, adicionados a 2mL de DMSO puro. Foi realizado ainda um segundo grupo controle, em condições de cultura semelhantes, submetido à irradiação com dose de 5Gy.

Tabela 6-1: Grupos de culturas celulares usados no ensaio e análises relacionadas.

| Grupo | Exposição | | | Análise | Nome de referência do Grupo |
|-------|-----------|-----|--------|---|-----------------------------|
| | CUR | PIP | IR 5Gy | | |
| 1 | - | - | - | Grupo controle não irradiado. | CON-NIR |
| 2 | - | - | ✓ | Efeitos da irradiação isolada. | CON+5Gy |
| 3 | ✓ | - | - | Efeito da Curcumina isolada. | CUR-NIR |
| 4 | - | ✓ | - | Efeito da Piperina isolada. | PIP-NIR |
| 5 | ✓ | ✓ | - | Efeito da Associação Curcumina Piperina | CUR+PIP-NIR |
| 6 | ✓ | - | ✓ | Efeito radiosensibilizante da Curcumina | CUR+5Gy |
| 7 | - | ✓ | ✓ | Efeito radiosensibilizante da Piperina | PIP+5Gy |
| 8 | ✓ | ✓ | ✓ | Há sinergia como radiosensibilizantes? | CUR+PIP+5Gy |

Fonte: Elaborado pelo autor. CUR: Curcumina, PIP: Piperina, IR 5Gy: Irradiação com dose de 5Gy.

Processo de irradiação. Após o preenchimento com os respectivos meios, as garrafas T-25, contendo as células, foram vedadas com parafilme e transportadas dentro de uma caixa térmica, previamente descontaminada com álcool a 70%, até o local de irradiação. As culturas pertencentes aos grupos 2, 6, 7 e 8 foram submetidas à irradiação com o Irradiador Panorâmico Multipropósito com fonte de Cobalto-60, do Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). O intervalo de tempo entre introdução das substâncias de interesse e o processo de irradiação foi de aproximadamente uma hora.

Cinética de dose. Conforme demonstrado por Falcão et al. (2015), a exposição da linhagem MDA-MB-231 a doses de 2Gy não induz a redução de viabilidade celular, levando ainda à expansão clonal 48h a 72h após irradiação. Para o presente ensaio foi empregada uma dose de 5Gy para irradiação das amostras. Essa dose se mostra eficaz na redução da viabilidade celular, com evolução lenta o suficiente para a análise da radiosensibilização promovida pelas substâncias de interesse, conforme demonstrado por Minafra et al. (2019). A dose de 5Gy foi obtida utilizando-se uma distância de 1,6m entre fonte e amostra foi obtida uma taxa de dose de 87,91 Gy/h, resultando em uma exposição de 3 minutos e 25 segundos.

Estabilização e preparação dos frascos para análise. Após a irradiação as amostras foram transferidas de volta ao NRI, sendo recolocadas na incubadora para estabilização por 6h. O conteúdo das amostras controle e experimentais foi submetido então à sequência de coleta de dados para análise.

Cinética temporal. Os 8 frascos T-25 com as culturas celulares referentes aos Grupos Controle Não Irradiado (CON-NIR), Controle Irradiado (CON+5Gy), Curcumina Não Irradiado (CUR-NIR), Curcumina Irradiado (CUR+5Gy), Piperina Não Irradiado (PIP-NIR), Piperina Irradiado (PIP+5Gy), Curcumina e Piperina Associadas Não Irradiado (CUR+PIP-NIR) e Curcumina e Piperina Associadas Irradiado (CUR+PIP+5Gy) foram acompanhados ao longo dos 8 intervalos da cinética temporal proposta. Os frascos T-25 foram retirados da incubadora nos períodos pré-estabelecidos, de T1:6h, T2:12h, T3:24h, T4:36h, T5:48h, T6:60h, T7:72h, T8:84h, sendo analisados por microscopia invertida (Culemman), com sistema fotográfico acoplado, em cinética temporal. Foram realizados registros fotográficos digitais de 4 campos pré-estabelecidos na malha de cada um dos frascos. Os campos observados foram identificados como Campo 1, Campo 2, Campo 3 e Campo 4.

Registros fotográficos. Foram realizados registros fotográficos com aumentos de 100X, 400X e 800X, sequenciais de cada campo selecionado.

Análise dos registros fotográficos. Os registros fotográficos coletados foram colocados em ordem cronológica. A análise da evolução temporal das culturas celulares foi realizada utilizando as fotografias digitais com aumento 100X. Com o uso do software ImageJ, fornecido de forma livre pelo National Institutes of Health americano (NIH), foi realizada uma contagem de células em cada um dos 4 campos de cada frasco. As técnicas usuais de contagem celular com o software dependem da coloração das culturas, uma vez que é necessário um elevado contraste de cores entre o meio e as células a serem analisadas. O processo de coloração, no entanto, inviabiliza as culturas tratadas, fazendo necessário o uso de um frasco para cada período da cinética temporal. A fim de utilizar os mesmos 8 frascos ao longo de todo o experimento, foi desenvolvido, como parte do presente trabalho, um novo método de contagem celular utilizando ferramentas do software ImageJ. O método, desenvolvido e empregado pela primeira vez neste ensaio, é realizado conforme descrito:

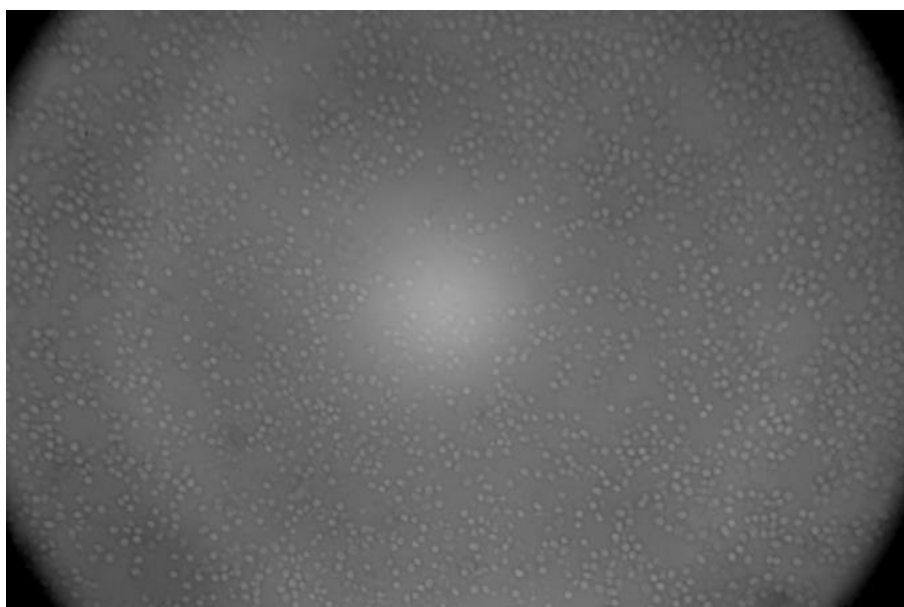
- i. Inicialmente as imagens são abertas no software e convertidas em formato 8 bits, o que possibilita o uso dos filtros descritos. O procedimento é realizado através sequência de comandos: *Image – Type – 8-bit*. As Figuras 6-1 e 6-2 ilustram a fotografia digital de um dos campos de cultura celular em seu formato original e após a conversão para arquivo de 8 bits.

Figura 6-1: Fotografia digital do Grupo Piperina, Campo 1, em T2:12h após a irradiação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

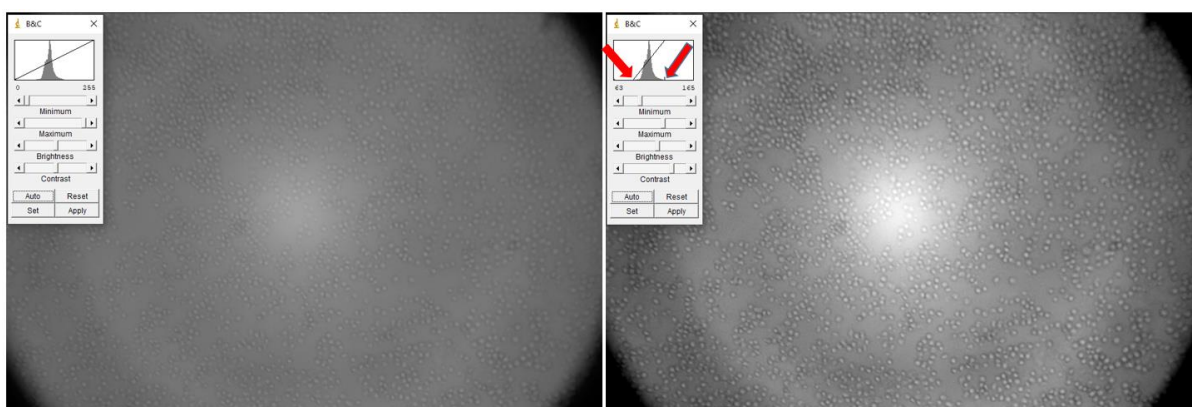
Figura 6-2: Fotografia digital do campo observado na Figura 6-1, após sua conversão em arquivo para o formato 8 bits.



Fonte: Elaborado pelo autor.

- ii. É realizado ajuste de brilho e contraste das imagens através da limitação do histograma de cores, padronizando todas as fotos obtidas. Os parâmetros mínimo e máximo de brilho e contraste são ajustados de forma a tocar os extremos direito e esquerdo na base do histograma, que vai variar entre imagens. A sequência de comandos utilizados para a função: *Image – Adjust – Brightness/Contrast – Minimum=X Maximum=Y*. O ajuste dos limites do histograma pode ser observado na Figura 6-3, na qual as setas vermelhas indicam as bases direita e esquerda do histograma.

Figura 6-3: Fotografia digital Grupo Curcumina, Campo 1, em T1:6h antes e após o ajuste de contraste e brilho. As setas vermelhas indicam os extremos do histograma, utilizados como limites máximos e mínimos.

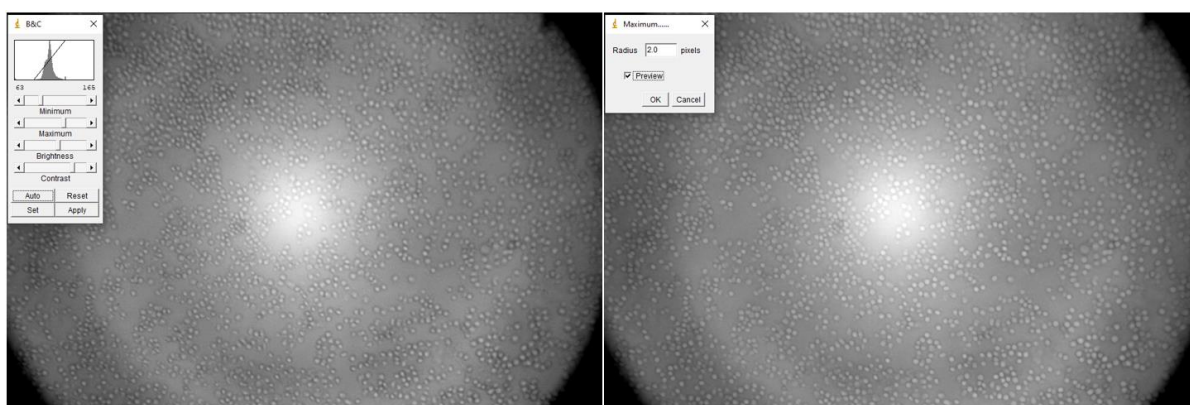


Fonte: Elaborado pelo autor.

- iii. É aplicado um filtro de redução do ruído para minimizar os erros das contagens celulares. O processo reduz o nível de ruído da imagem, trazendo maior definição dos contornos celulares, sendo realizado através da sequência de comandos: *Process – Noise – Despeckle*. Os resultados da aplicação do filtro não são perceptíveis em análise visual da imagem, apenas após o processo de contagem celular.
- iv. É aplicado um filtro para padronização dos pixels da imagem. Tal processo é realizado através de dilatação em níveis de cinza (*Grayscale Dilation*) e, de acordo com as instruções técnicas do software, substitui cada pixel da imagem pelo pixel vizinho de maior valor, sendo realizado pela sequência: *Process – Filters – Maximum*. Através do processo a imagem é clareada, passando a ter maior definição das bordas celulares. O raio de alcance do

filtro foi estabelecido empiricamente como 2 pixels. A Figura 6-4 ilustra a aplicação do filtro descrito.

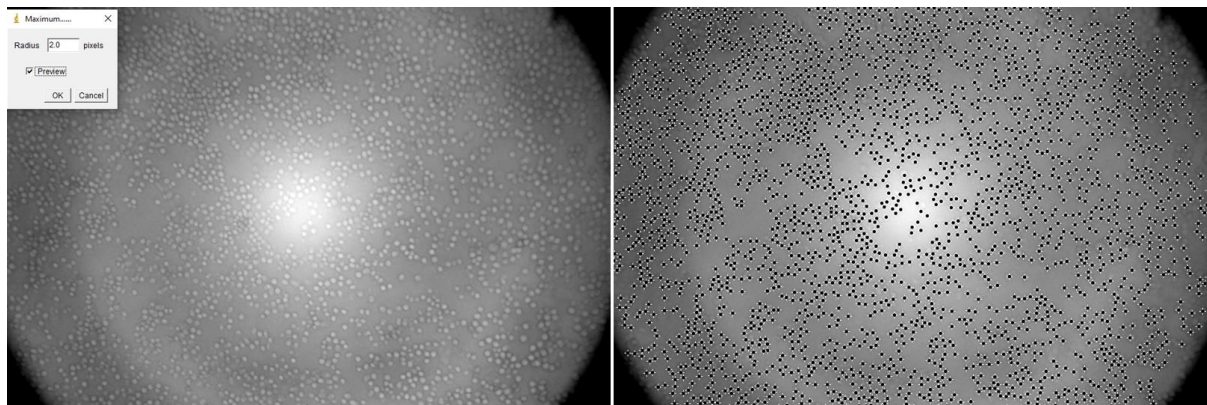
Figura 6-4: Fotografia digital do Grupo Curcumina, Campo 1, em T1:6h, antes e após a aplicação do Filtro de dilatação de níveis de cinza (Grayscale Dilation).



Fonte: Elaborado pelo autor.

- v. É aplicado o processo de “Determinação de Máximos de Luminância” (Local Maxima of Luminance). Através do procedimento os pontos de maior luminância da imagem são delimitados e marcados. Uma vez que os citoplasmas celulares, conforme pode ser observado nas Figuras 6-1 a 6-4, são alguns dos pontos de maior luminância, esse processo pode ser utilizado para realizar uma contagem estimativa da quantidade de células presentes no campo fotografado. O procedimento é realizado através dos comandos: *Process – Find Maxima*. A Figura 6-5 ilustra o resultado do processo.

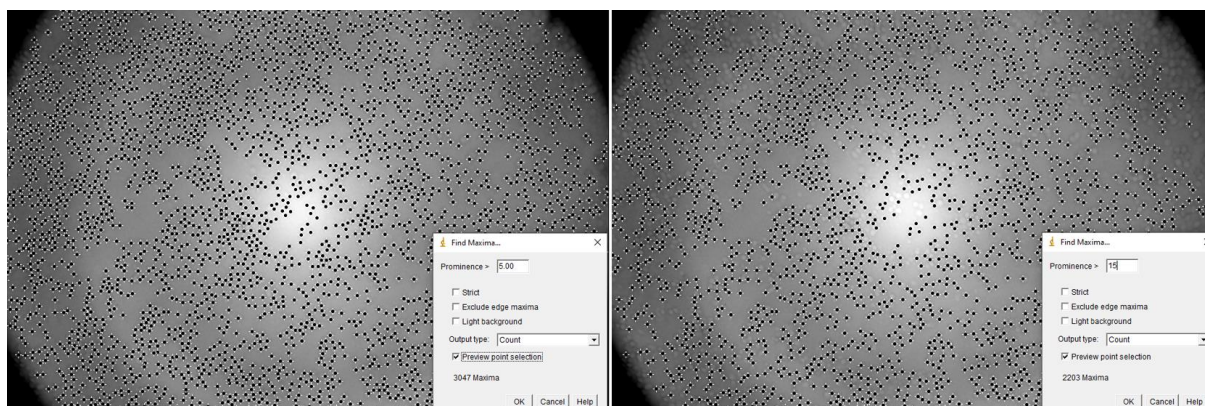
Figura 6-5: Fotografia digital do Grupo Curcumina, Campo 1, em T1:6h, antes e após a aplicação do processo de determinação de máximos de luminância com a contagem estimativa do número de células no campo (2597 contagens).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O processo de determinação de máximos de luminância apresenta a possibilidade de ajuste do intervalo de tolerância de ruído (*Noise Tolerance* ou *Prominence* nas versões mais recentes do software). Os máximos de luminância são ignorados se não se destacarem dos pixels vizinhos por valores maiores que o determinado no intervalo de tolerância. Com isso, intervalos de tolerância menores identificarão um maior número de pontos máximos de luminância, gerando estimativas mais elevadas de número de células. A análise foi realizada com 3 níveis diferentes de tolerância de ruído para cada imagem. O valor padrão de tolerância do software é definido como 10. Os valores 5 e 15 foram utilizados empiricamente, representando amostras com maior e menor sensibilidade. A Figura 6-6 ilustra a aplicação do processo de determinação de máximos de luminância para níveis de tolerância 5 e 15. As contagens celulares para os dois intervalos foram 3047 pontos e 2203 pontos respectivamente. Utilizando o nível de tolerância padrão do software, qual seja 10, foram estabelecidos 2597 pontos para a mesma imagem.

Figura 6-6: Fotografia digital do Grupo Curcumina, Campo 1, em T1:6h, ilustrando a aplicação do processo de determinação de máximos de luminância, com nível de tolerância 5 à esquerda (3047 contagens) e 15 à direita (2203 contagens).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Coleta de sobrenadante. Nos períodos de análise T3:24h, T5:48h e T7:72h foram coletadas amostras de 500 μ L do sobrenadante de cada um dos grupos em análise. O material coletado foi armazenado em frascos Eppendorf, sendo congelados a -20°C . O material coletado do sobrenadante permitirá outras análises posteriores, por eletroforese, para avaliação do perfil de proteínas expressas pelas células em estudo, quando submetidas às condições relatadas.

Análise Estatística. As médias e desvios padrão do número de células, entre as 3 contagens realizadas para cada um dos 4 campos de cada frasco, foram obtidas conforme cinética de tempo relatada. A proposta inicial de análise estatística incluía a comparação dos grupos: Controle Não Irradiado (*CON-NIR*), Controle Irradiado (*CON+5Gy*), Curcumina Não Irradiado (*CUR-NIR*), Curcumina Irradiado (*CUR+5Gy*), Piperina Não Irradiado (*PIP-NIR*), Piperina Irradiado (*PIP+5Gy*), Curcumina e Piperina Associadas Não Irradiado (*CUR+PIP-NIR*) e Curcumina e Piperina Associadas Irradiado (*CUR+PIP+5Gy*). As análises estatísticas foram realizadas com software MicroCal Origin 8.0, com o emprego de análise de variância (ANOVA), seguido pela aplicação do Teste de Tukey utilizando intervalo de significância de 0,05.

7. RESULTADOS

Ao longo do experimento não foram constatadas contaminações em nenhum dos frascos. As culturas celulares referentes aos Grupos *CON-NIR*, *CUR-NIR*, *PIP-NIR* e *CUR+PIP-NIR* rapidamente atingiram a confluência e permaneceram em total confluência ao longo de todo o experimento, não sendo observadas variações ao longo da cinética temporal. Por esse motivo esses grupos foram retirados da análise estatística. As Figuras 7-1 e 7-2 ilustram um dos campos desses Grupos ao início e ao término do ensaio, com baixa luminosidade para favorecer o contraste e contagem celular.

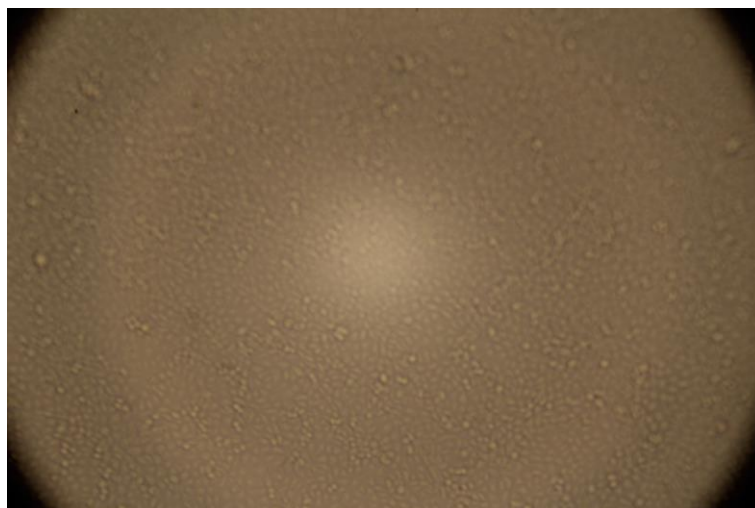
A estimativa do número de células por campo, doravante referida como “Contagem Celular”, foi obtida através da análise das fotografias com o software ImageJ. A avaliação de todos os demais grupos, quais sejam: *CON+5Gy*, *CUR+5Gy*, *PIP+5Gy* e *CUR+PIP+5Gy*, foi realizada para os 8 períodos temporais pré-estabelecidos.

O valor da contagem celular para cada um dos tempos de observação, para cada um dos campos dos grupos analisados, foi obtido pela média das 3 estimativas do número de células, utilizando as diferentes sensibilidades já descritas (*Noise Tolerance 5, 10 e 15*).

A evolução da contagem celular dos 4 campos referentes ao Grupo *CON+5Gy* pode ser observada nos gráficos presentes na Figura 7-3. O desvio padrão das medidas está representado neste e nos gráficos referentes aos demais grupos, apresentados nas Figuras 7-3 a 7-7.

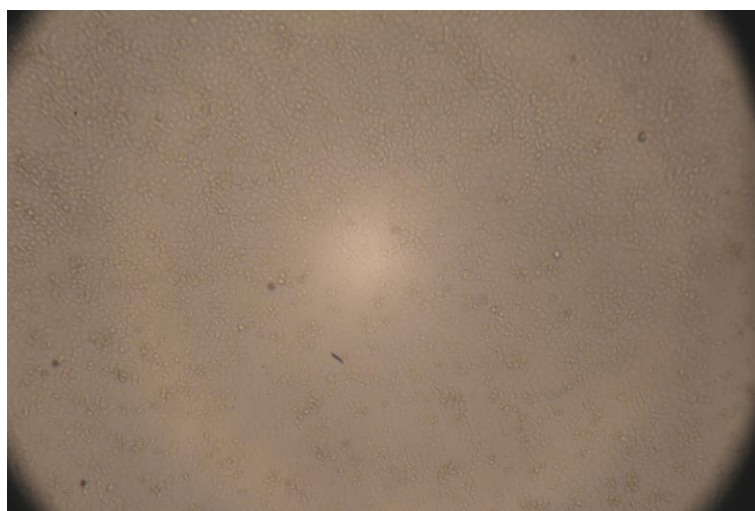
Para as culturas em confluência, o valor médio das estimativas do número de células com cada uma das sensibilidades, foi de 5210 contagens, sendo esse o valor inicial para todas as culturas.

Figura 7-1: Grupo Controle Não Irrradiado 6h após início do ensaio, evidenciando a confluência da cultura celular.



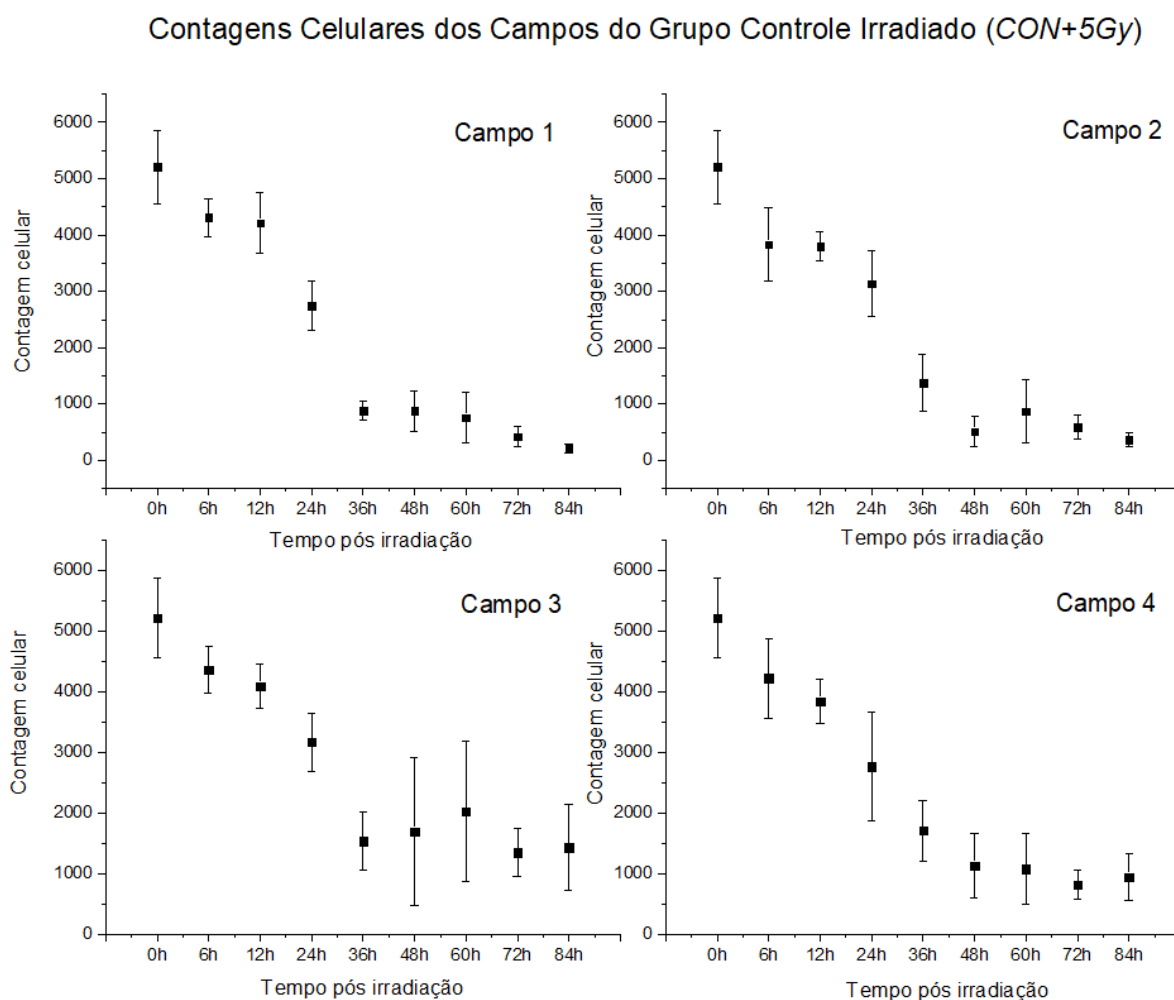
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7-2: Grupo Controle não irradiado 84h após o início do ensaio, evidenciando a confluência da cultura celular.



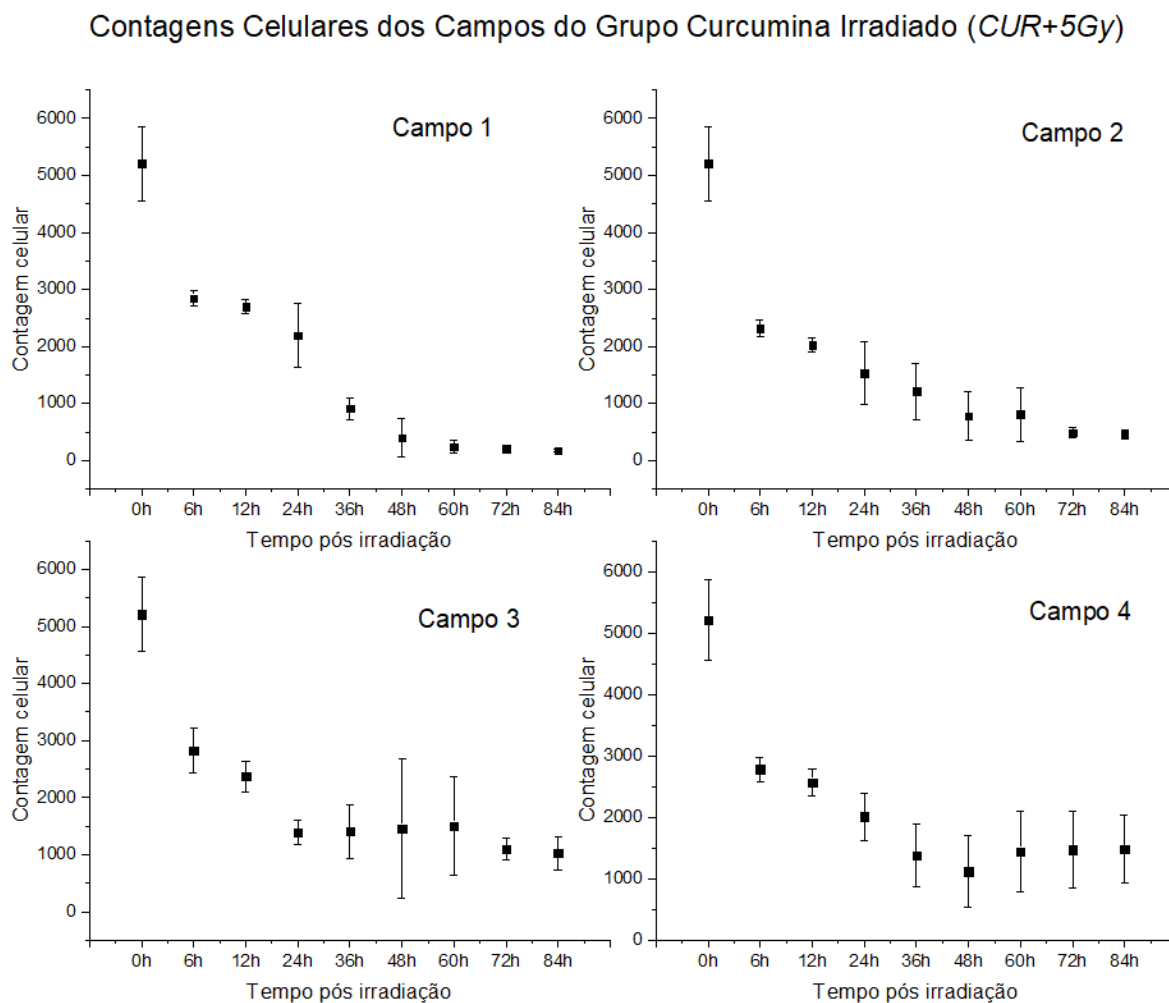
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7-3: Contagens celulares dos 4 campos da cultura referentes ao Grupo CON+5Gy.



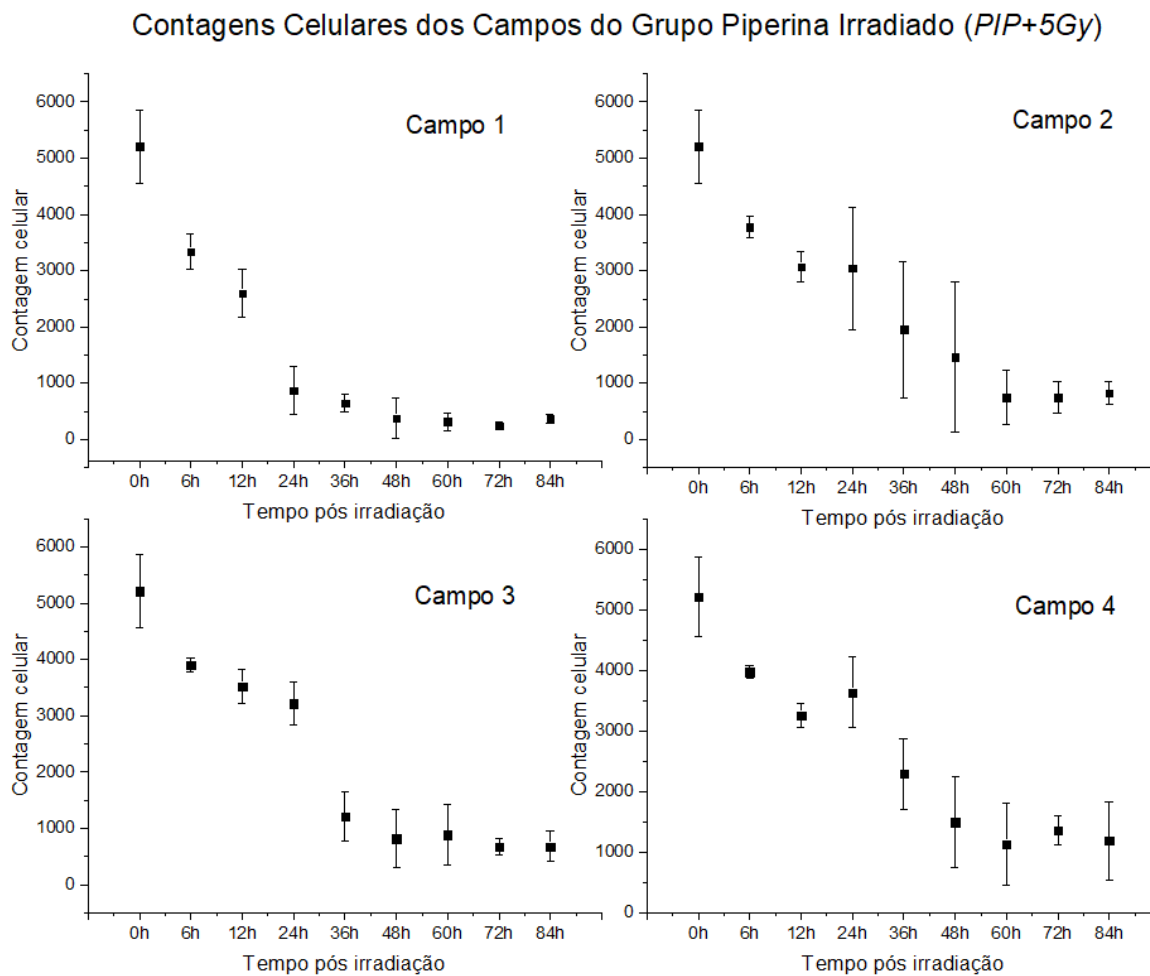
A evolução dos campos do Grupo *CUR+5Gy* ao longo da cinética temporal pode ser observada nos gráficos presentes na Figura 7-4. Nesse contexto o fitoterápico foi utilizado isoladamente, na concentração de 8 $\mu\text{mol/L}$.

Figura 7-4: Contagens celulares dos 4 campos da cultura referentes ao Grupo CUR+5Gy, concentração 8 $\mu\text{mol/L}$.



Os gráficos presentes na Figura 7-5 evidenciam as contagens celulares dos 4 campos de análise do Grupo *PIP*+5Gy, com o fitoterápico utilizado isoladamente, na concentração 40 $\mu\text{mol/L}$.

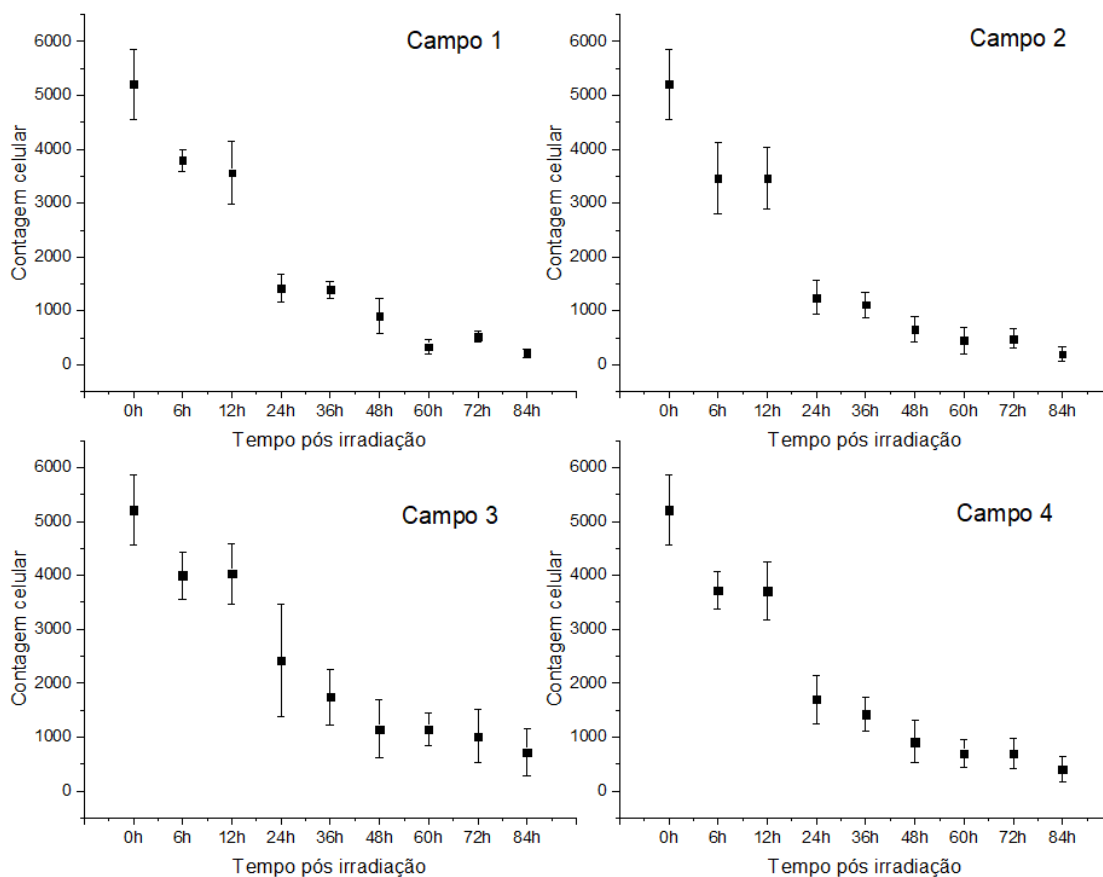
Figura 7-5: Contagens celulares dos 4 campos da cultura referentes ao Grupo PIP+5Gy, concentração 40 $\mu\text{mol/L}$.



A evolução da contagem celular dos 4 campos referentes ao Grupo *CUR+PIP+5Gy*, nas concentrações 7 $\mu\text{mol/L}$ e 35 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente, pode ser observada nos gráficos presentes na Figura 7-6.

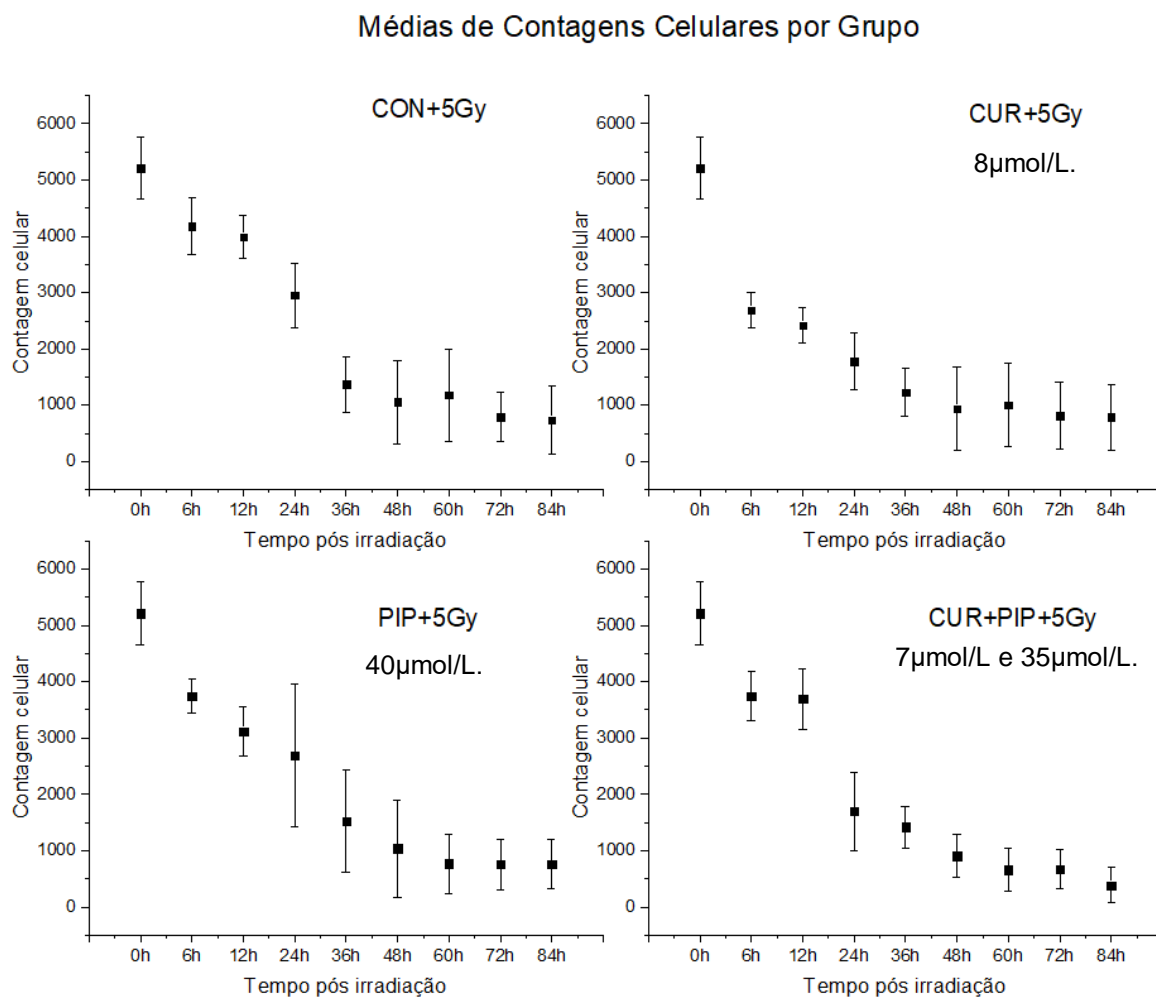
Figura 7-6: Contagens celulares dos 4 campos da cultura referentes ao Grupo CUR+PIP+5Gy, concentrações 7 $\mu\text{mol/L}$ e 35 $\mu\text{mol/L}$.

Contagens Celulares dos Campos do Grupo Curcumina e Piperina Irrradiado (CUR+PIP+5Gy)



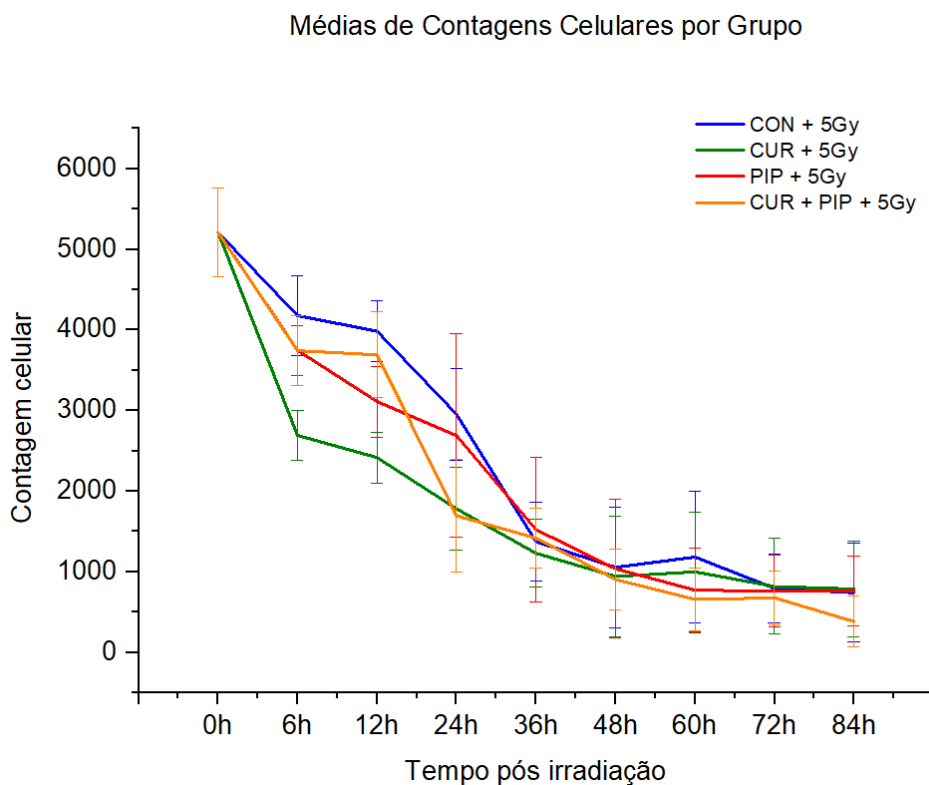
A evolução da média de contagens celulares dos 4 campos de cada um dos Grupos pode ser observada nos gráficos presentes na Figura 7-7. O desvio padrão das medidas está representado em cada medida temporal nos gráficos.

Figura 7-7: Gráficos das médias de contagens celulares dos 4 campos de cada um dos grupos irradiados.



A Figura 7-8 apresenta o gráfico da evolução da média de contagens celulares dos 4 campos de cada um dos grupos plotada em eixo único.

Figura 7-8: Gráfico das médias das contagens celulares dos 4 campos de cada um dos grupos irradiados plotado em eixo único. Concentrações: CUR+5Gy: 8 μ mol/L, PIP+5Gy: 40 μ mol/L CUR+PIP+5Gy: 7 μ mol/L e 35 μ mol/L.



Após a finalização do tratamento das imagens digitais referentes a todos os campos de interesse, foi procedida a análise de variância (ANOVA) para cada um dos períodos da cinética temporal a partir do intervalo de tempo referente a 6h pós irradiação. Em seguida foi procedida a comparação entre grupos através do Teste de Tukey, com intervalo de significância de 0,05.

As Figuras 7-9 a 7-11 ilustram a variação de contagens celulares, os resultados do Teste de Tukey e a variação percentual dos Grupos *CUR+5Gy*, *PIP+5Gy*, e *CUR+PIP+5Gy* em relação ao Grupo *CON+5Gy* para o intervalo 6h pós irradiação.

Figura 7-9: Variação das contagens celulares dos grupos 6h pós irradiação.

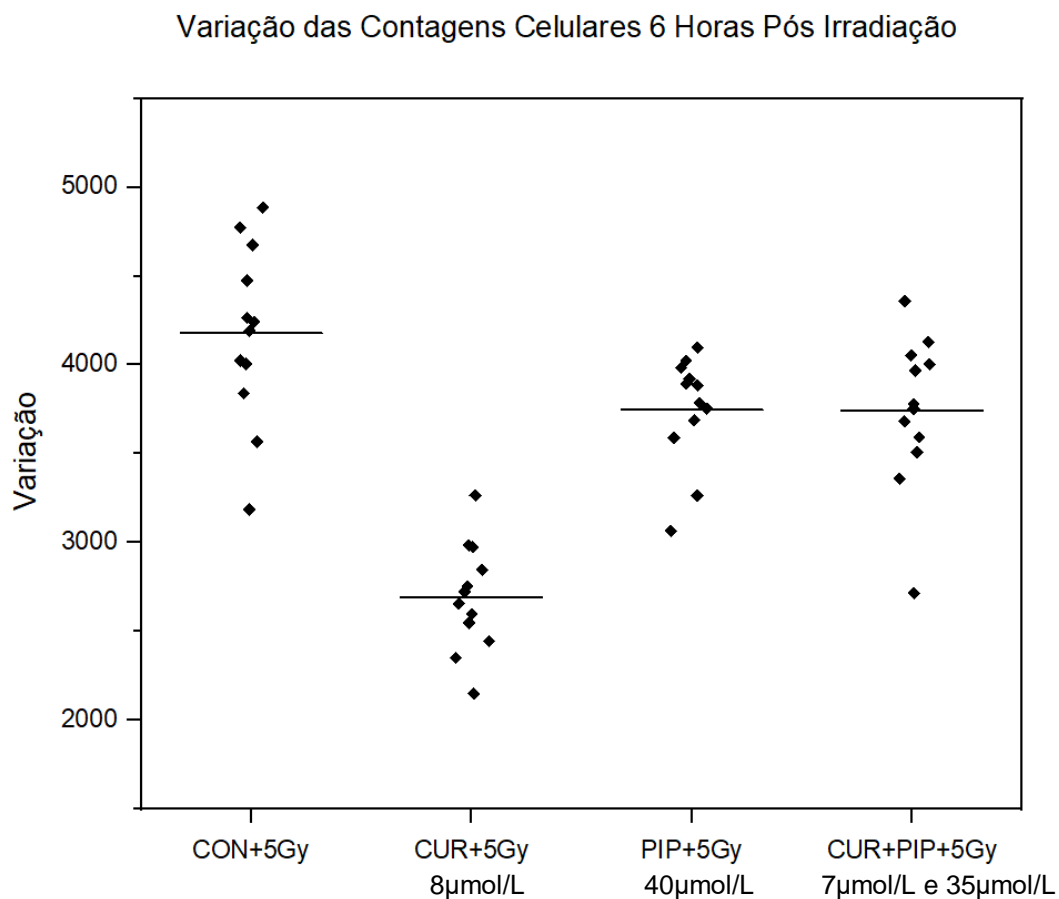


Figura 7-10: Teste de Tukey 6h pós irradiação.

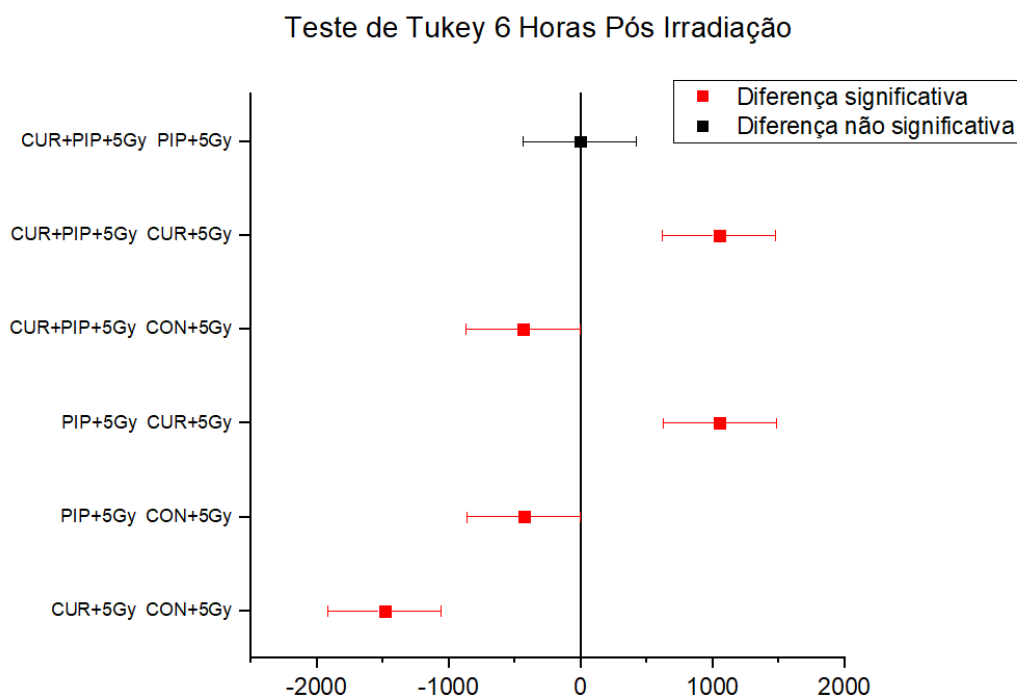
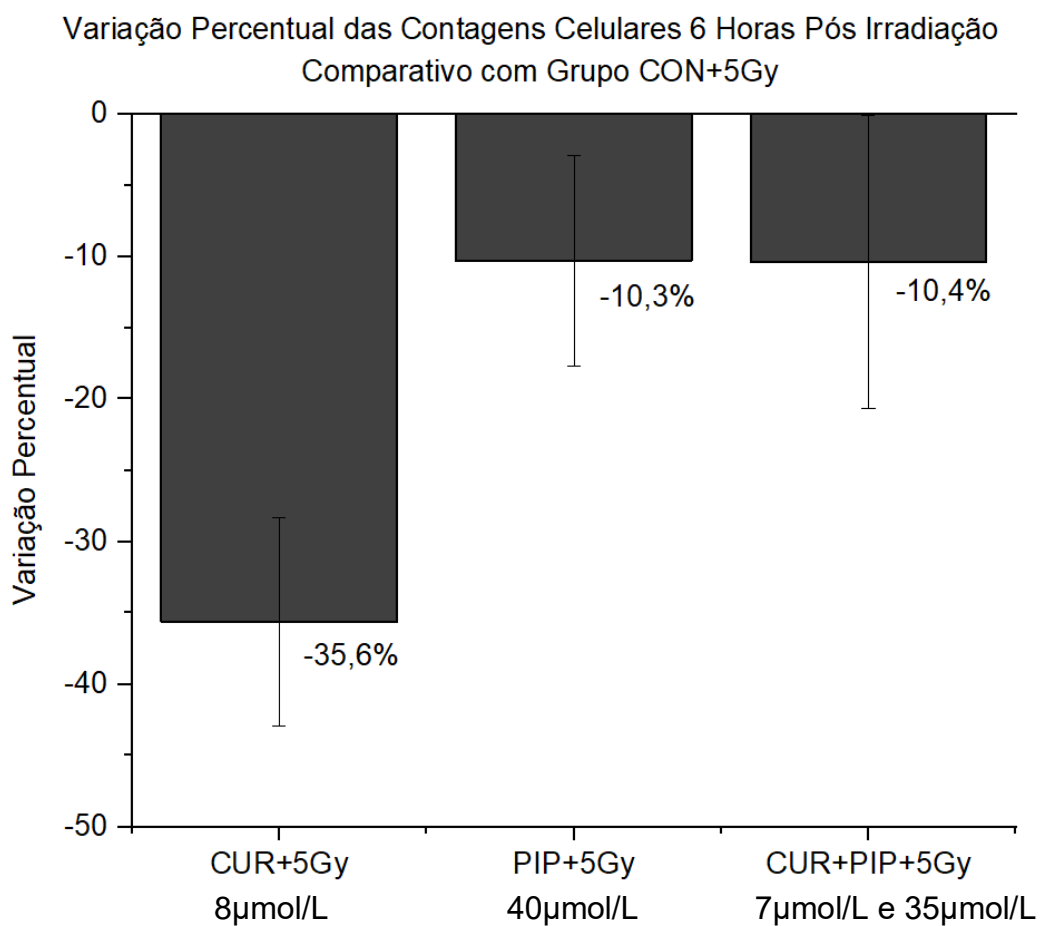


Figura 7-11: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 6h pós irradiação.



As Figuras 7-12 a 7-14 ilustram a variação de contagens celulares, os resultados do Teste de Tukey e a variação percentual dos Grupos *CUR+5Gy*, *PIP+5Gy*, e *CUR+PIP+5Gy* em relação ao Grupo *CON+5Gy* para o intervalo 12h pós irradiação.

Figura 7-12: Variação das contagens celulares dos grupos 12h pós irradiação.

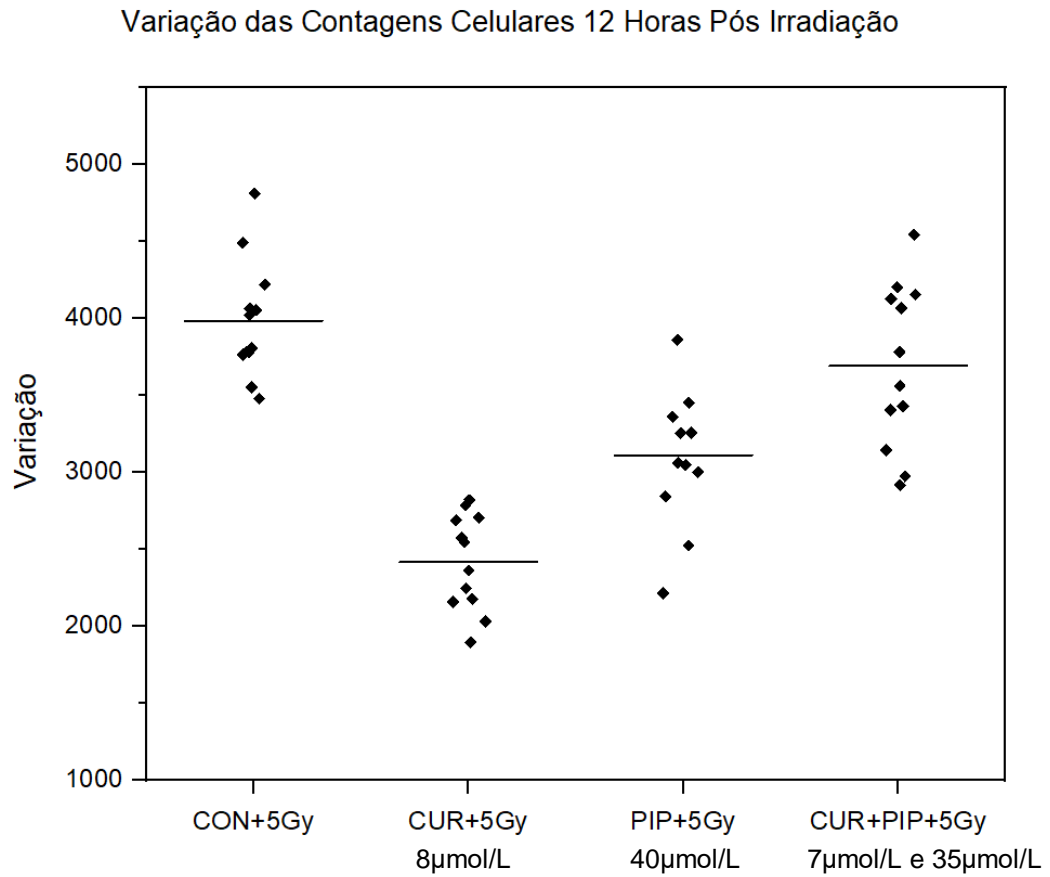


Figura 7-13: Teste de Tukey 12h pós irradiação.

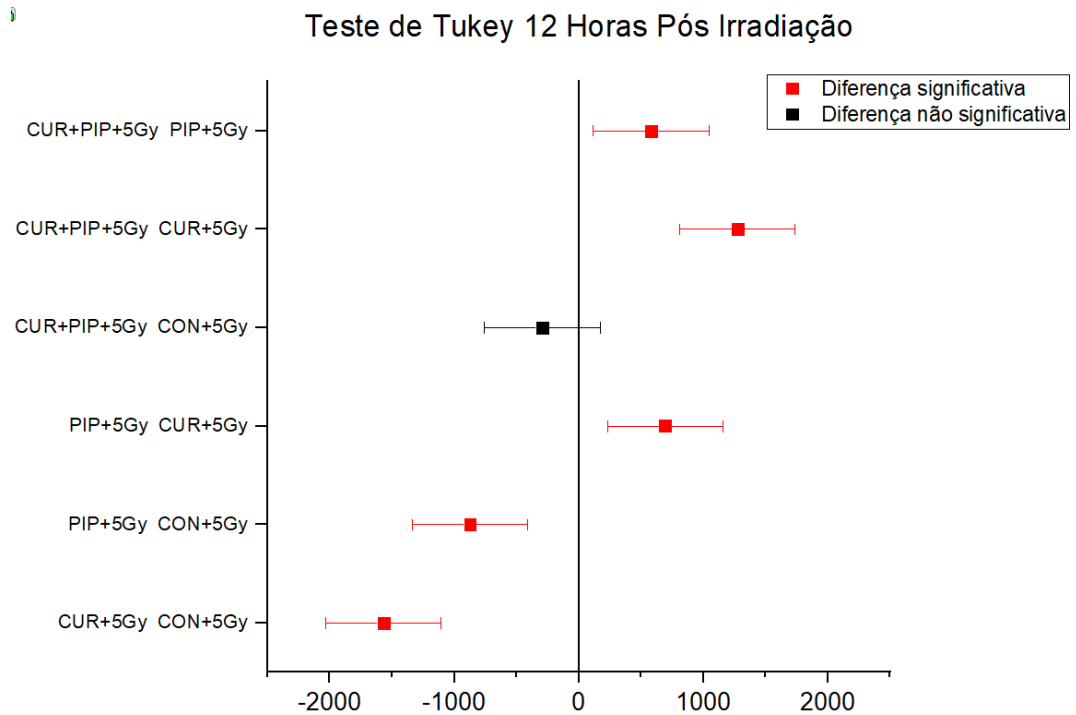
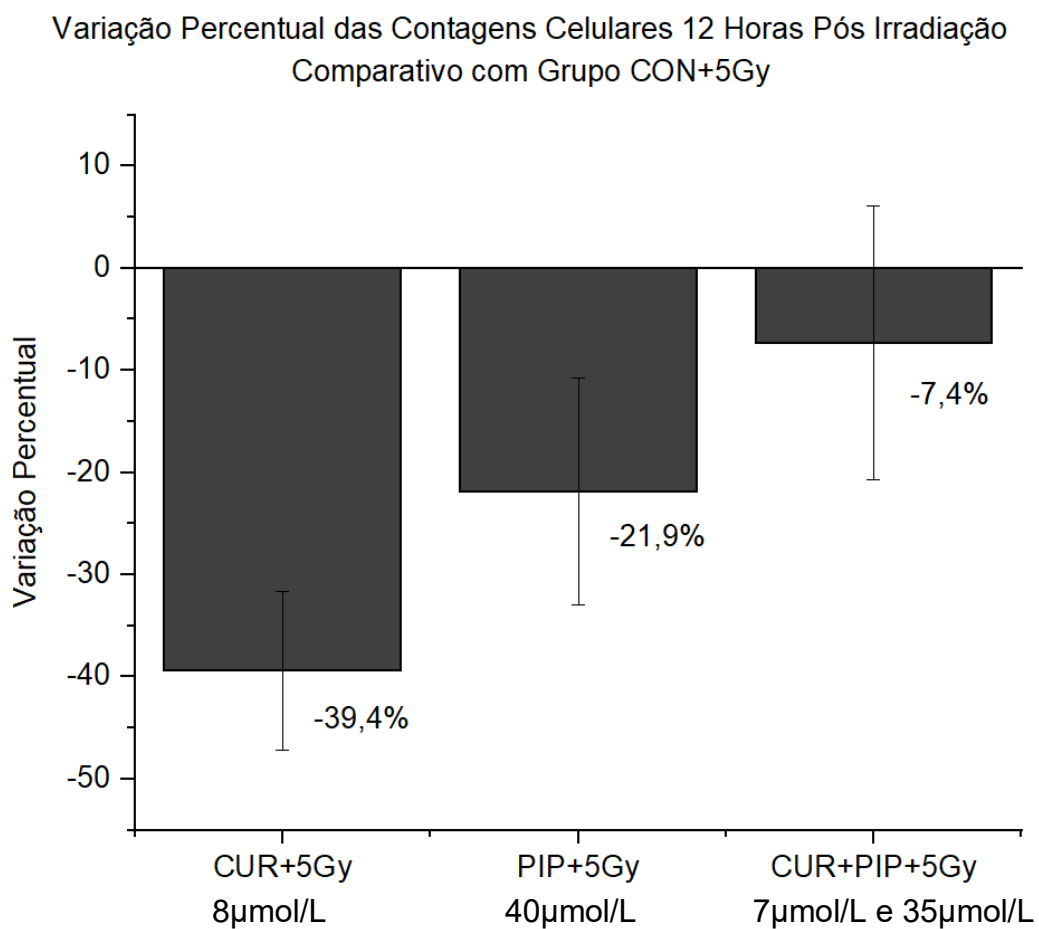


Figura 7-14: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 12h pós irradiação.



As Figuras 7-15 a 7-17 ilustram a variação de contagens celulares, os resultados do Teste de Tukey e a variação percentual dos Grupos *CUR+5Gy*, *PIP+5Gy*, e *CUR+PIP+5Gy* em relação ao Grupo *CON+5Gy* para o intervalo 24h pós irradiação.

Figura 7-15: Variação das contagens celulares dos grupos 24h pós irradiação.

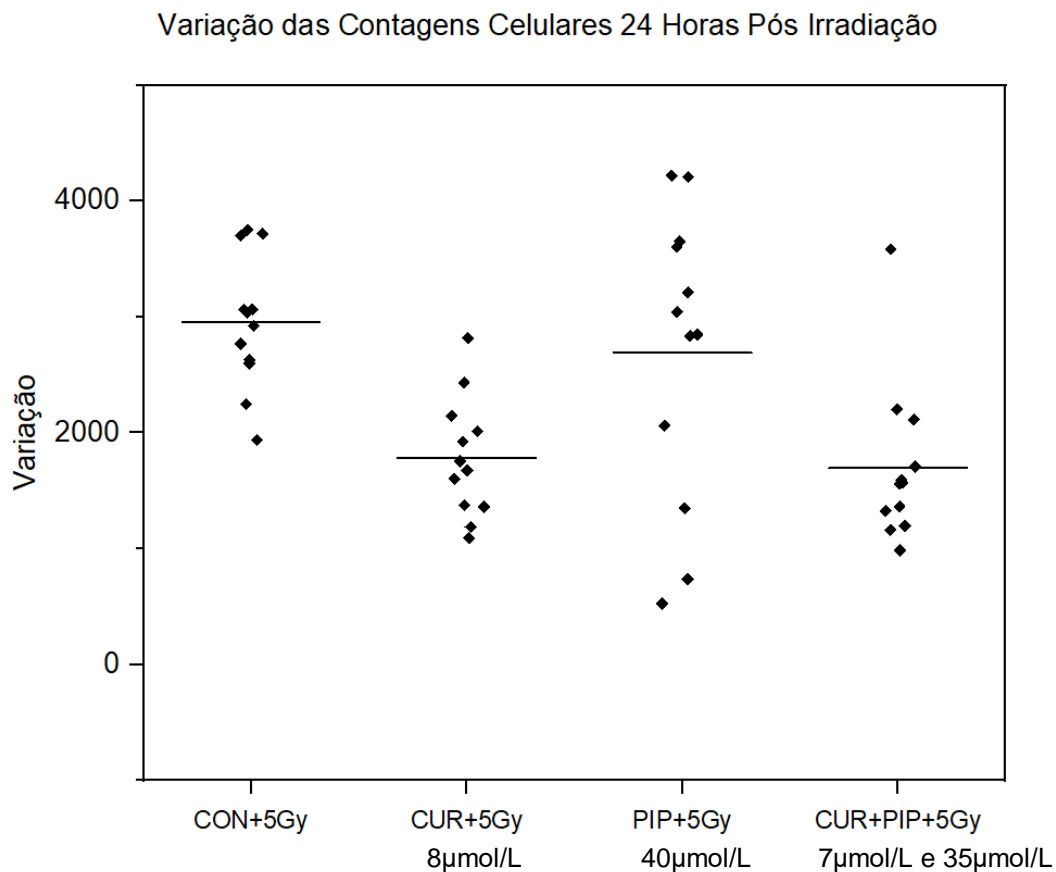


Figura 7-16: Teste de Tukey 24h pós irradiação.

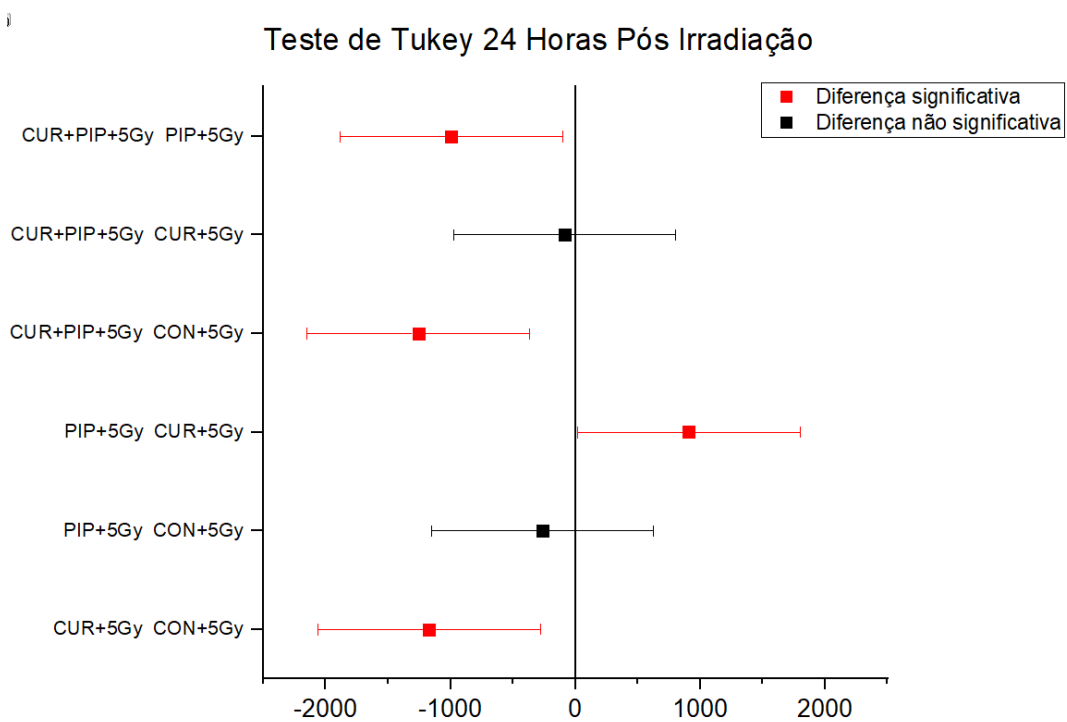
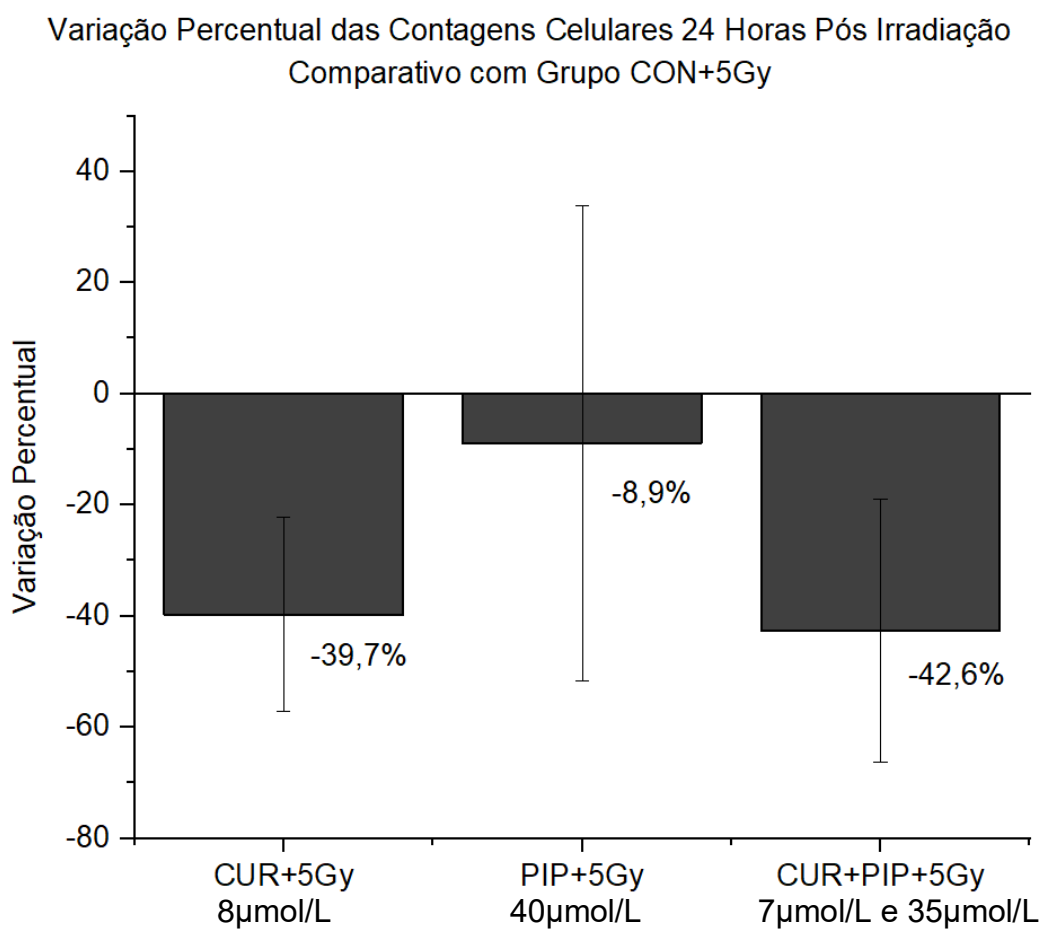


Figura 7-17: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 24h pós irradiação.



A evolução da variação das contagens celulares intragrupos, dos Testes de Tukey e das variações percentuais em relação do Grupo *CON+5Gy*, ao longo restante da cinética temporal, podem ser observados nas Figuras 7-18 a 7-32.

Figura 7-18: Variação das contagens celulares dos grupos 36h pós irradiação.

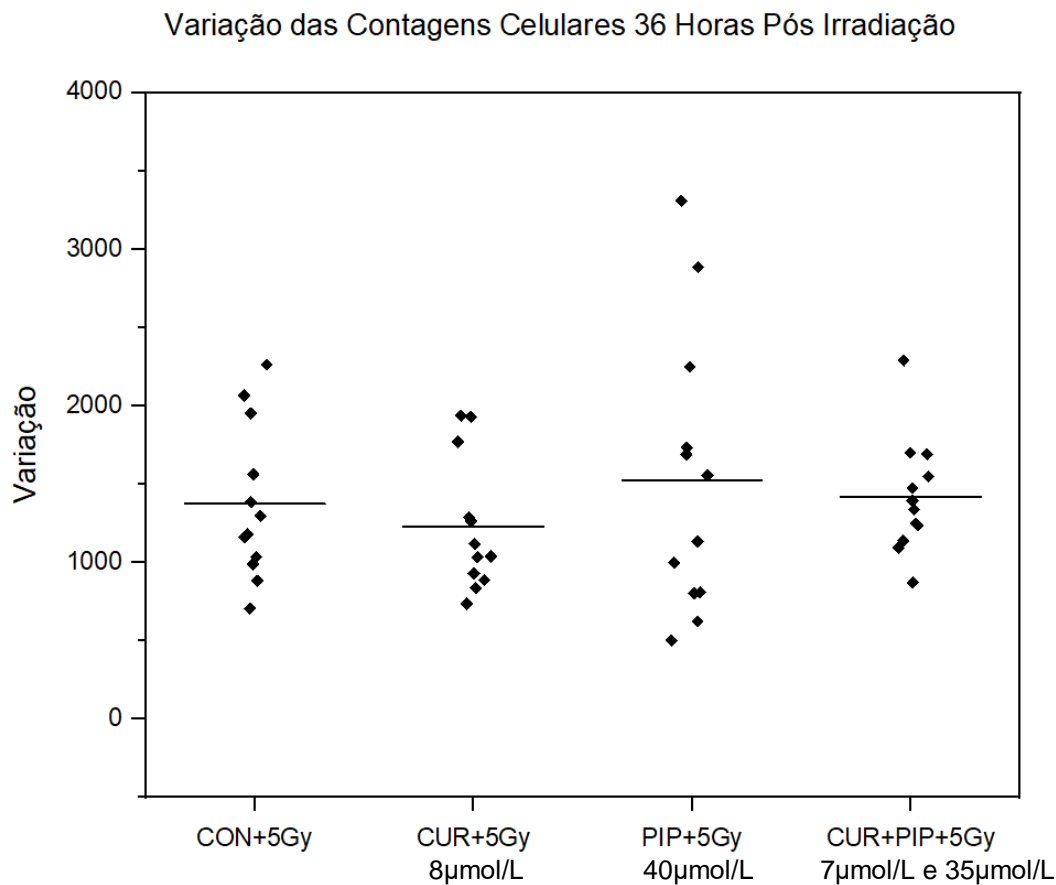


Figura 7-19: Teste de Tukey 36h pós irradiação.

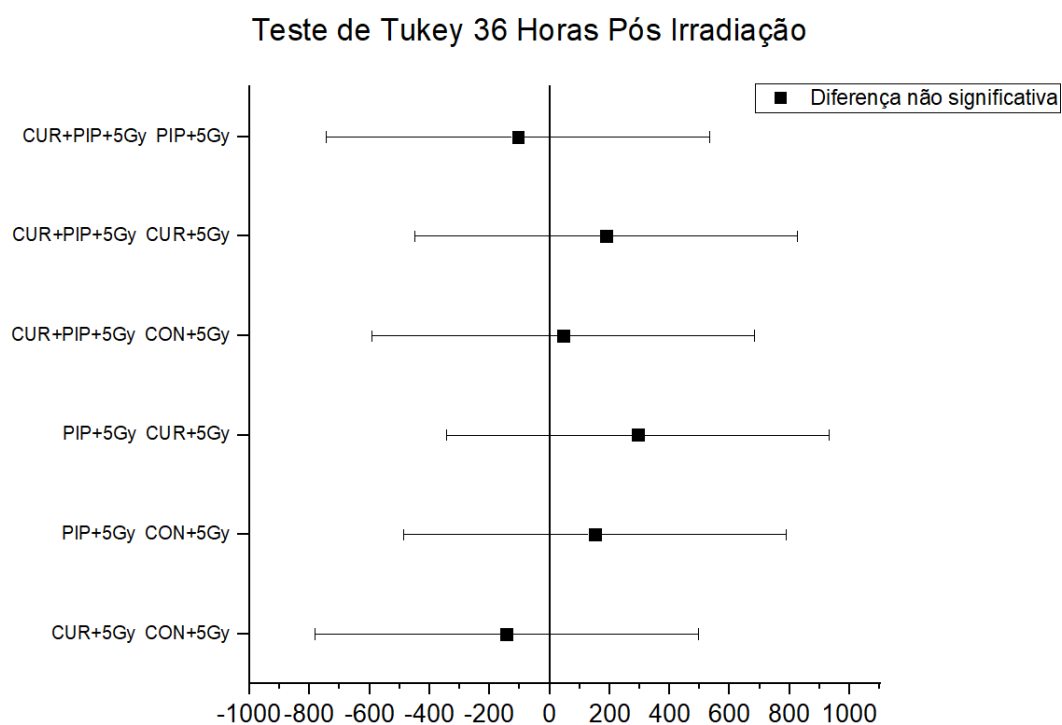


Figura 7-20: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 36h pós irradiação.

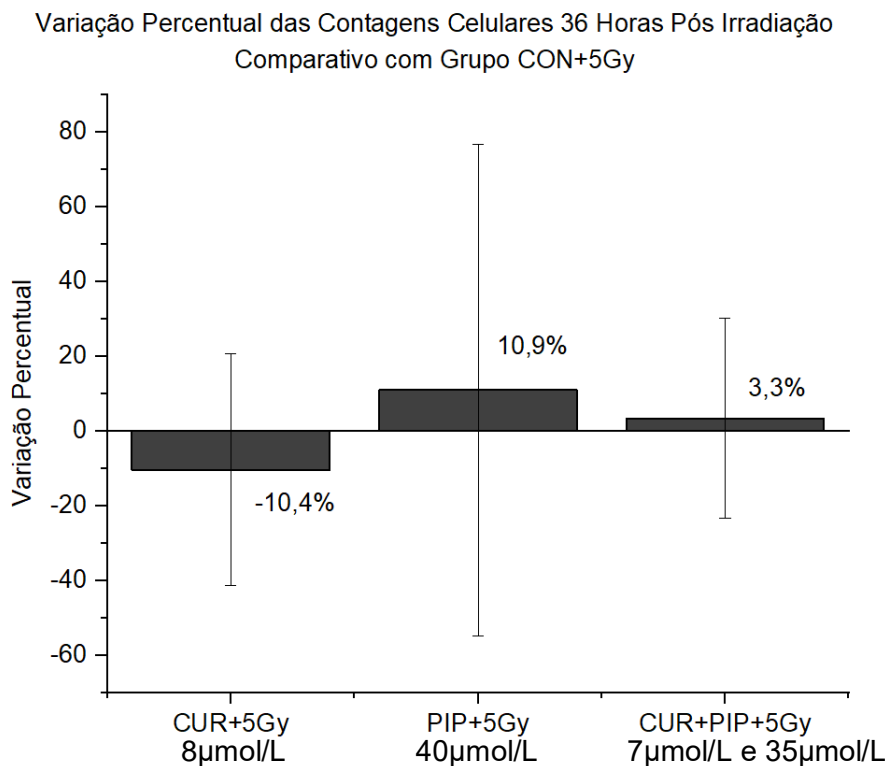


Figura 7-21: Variação das contagens celulares dos grupos 48h pós irradiação.

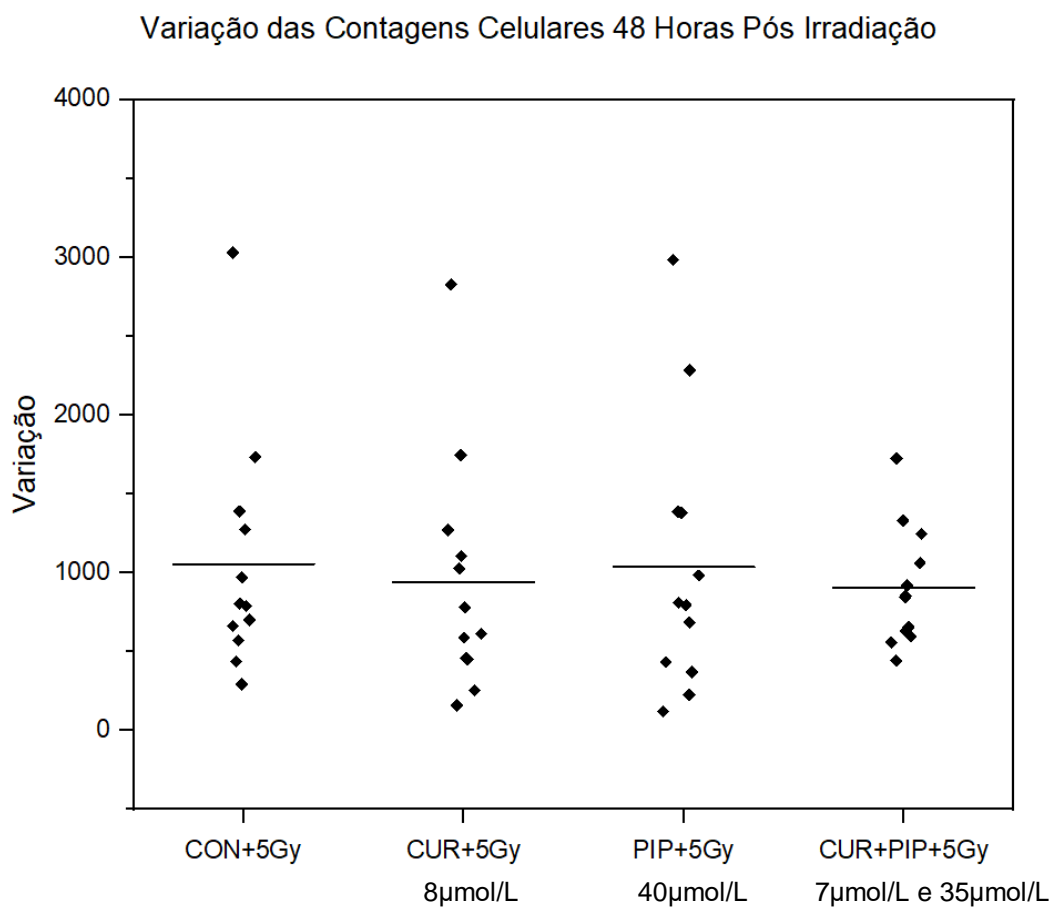


Figura 7-22: Teste de Tukey 48h pós irradiação.

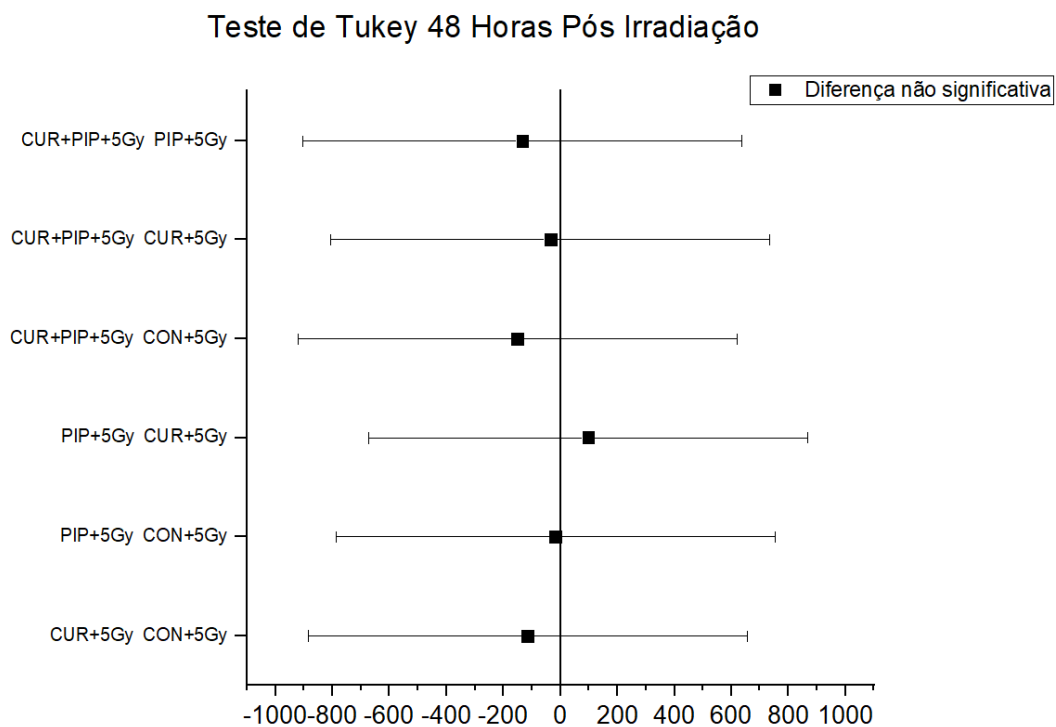


Figura 7-23: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 48h pós irradiação.

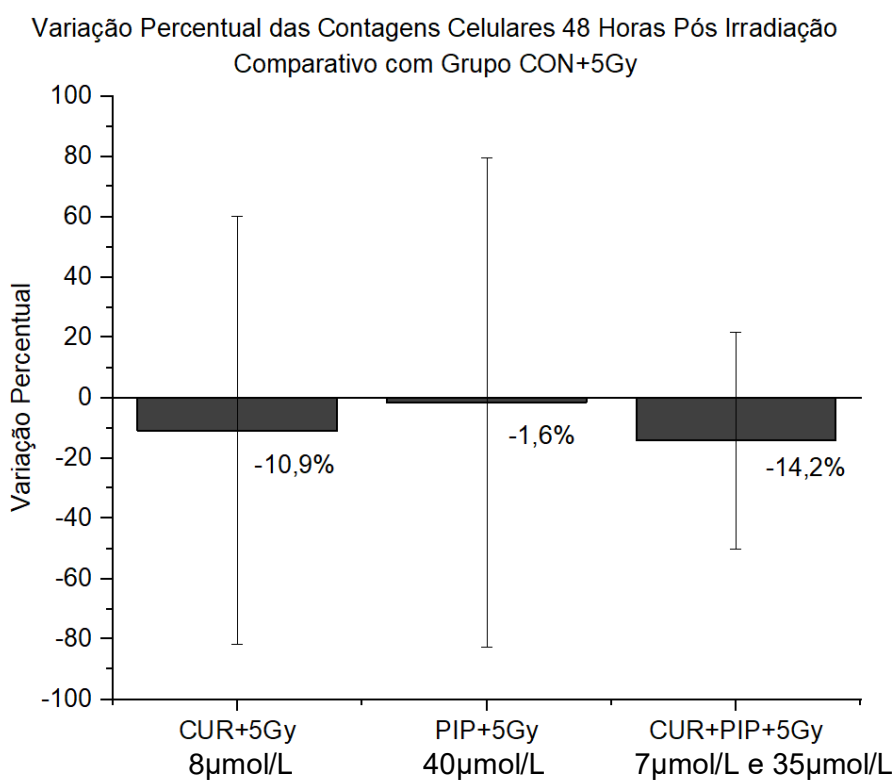


Figura 7-24: Variação das contagens celulares dos grupos 60h pós irradiação.

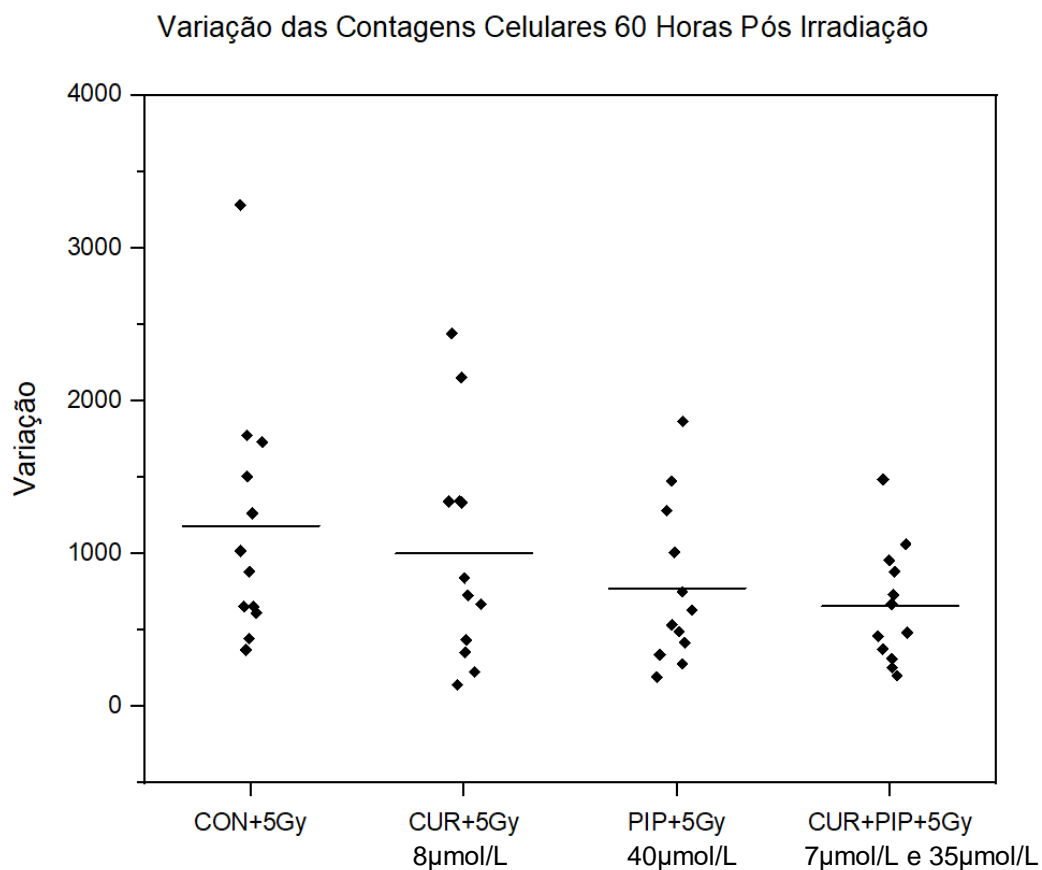


Figura 7-25: Teste de Tukey 60h pós irradiação.

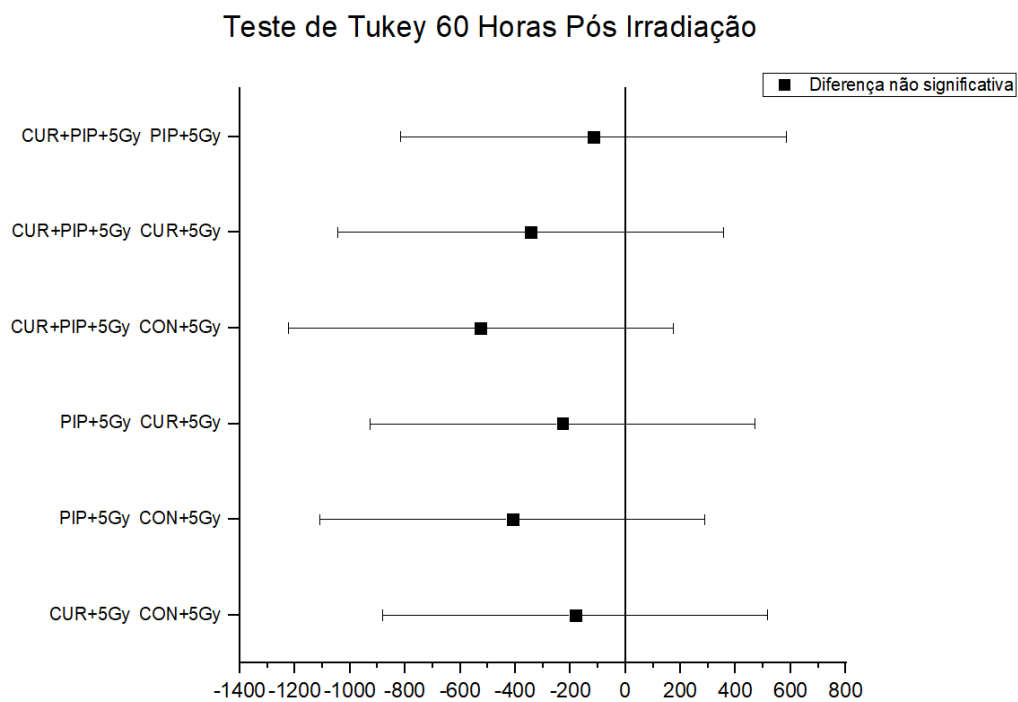


Figura 7-26: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 60h pós irradiação.

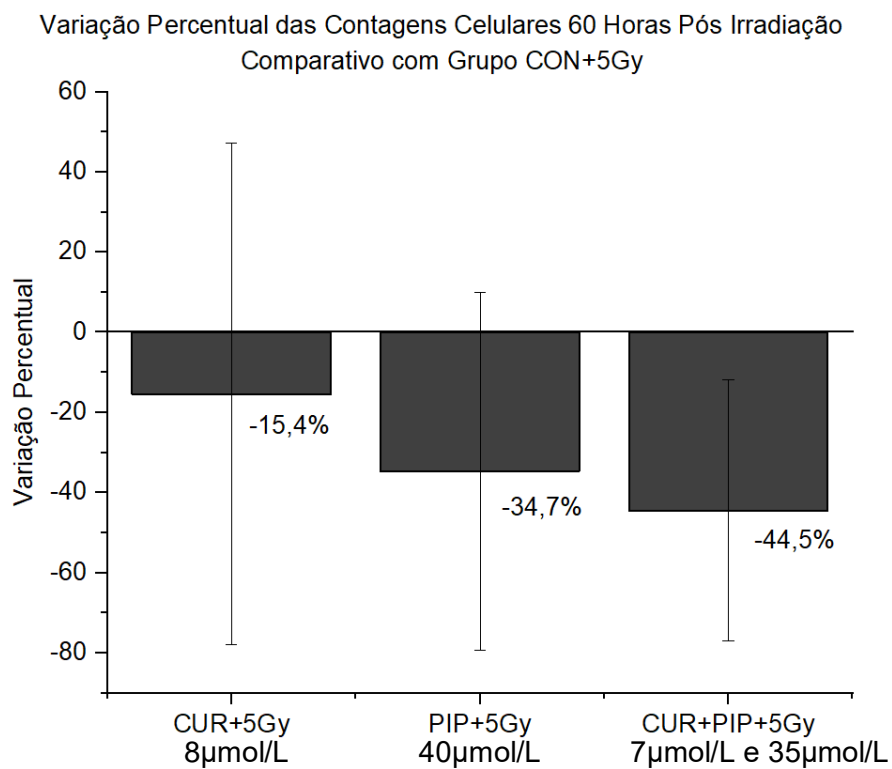


Figura 7-27: Variação das contagens celulares dos grupos 72h pós irradiação.

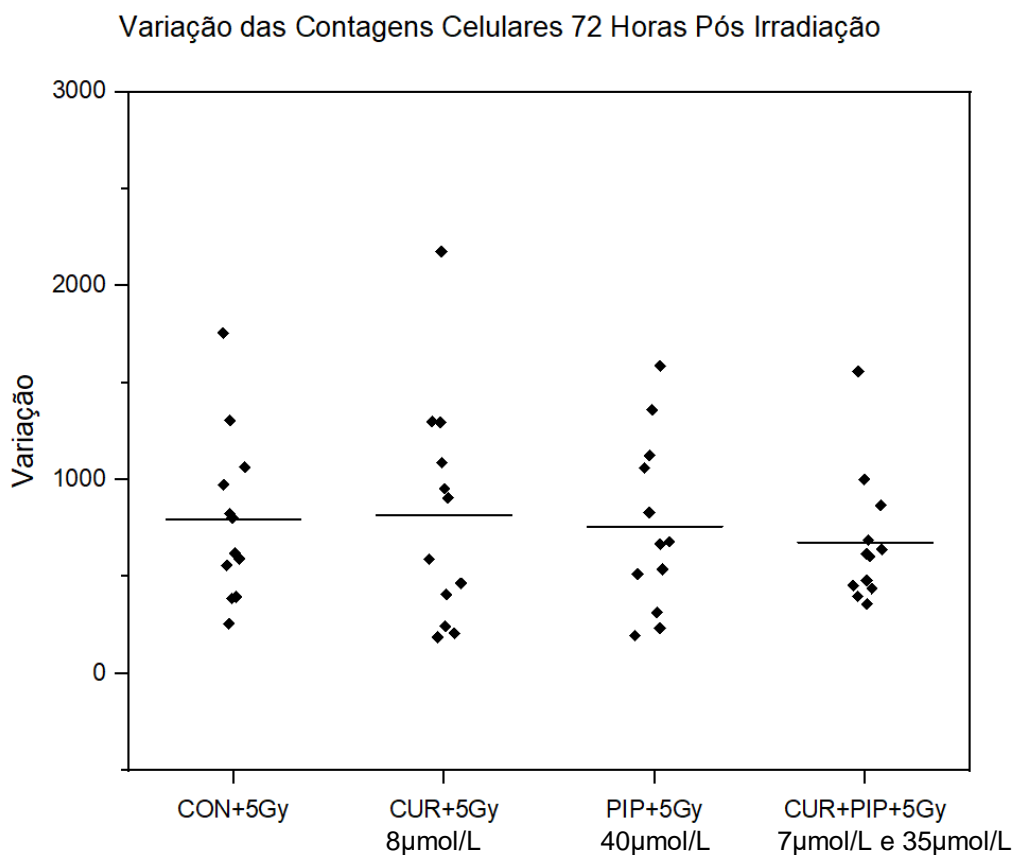


Figura 7-28: Teste de Tukey 72h pós irradiação.

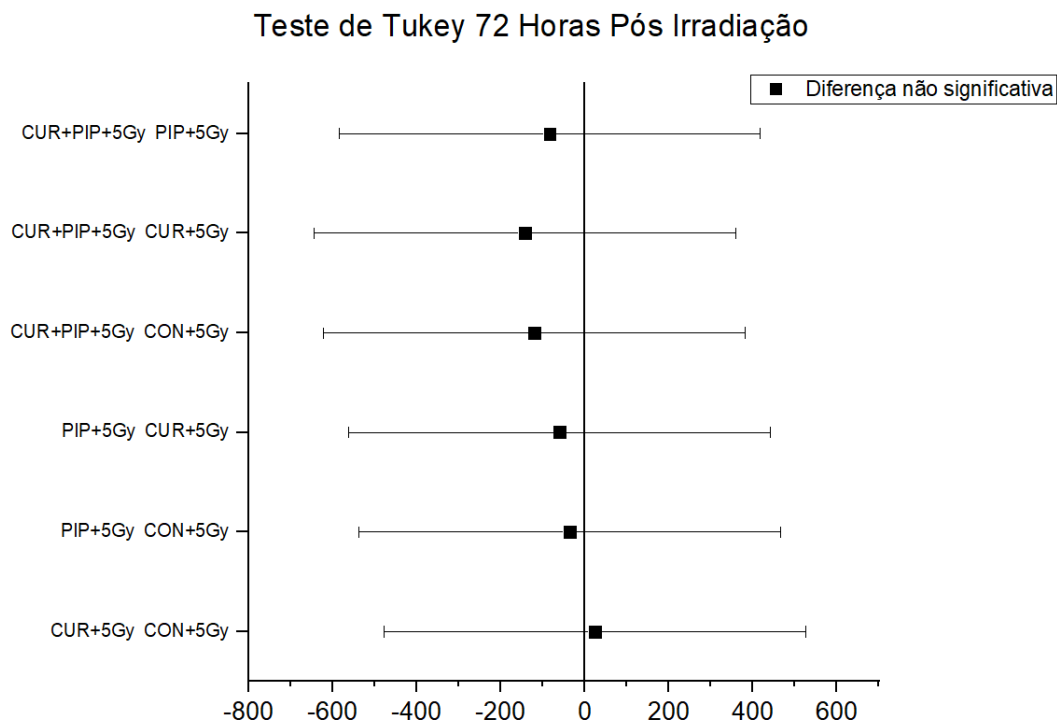


Figura 7-29: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 72h pós irradiação.

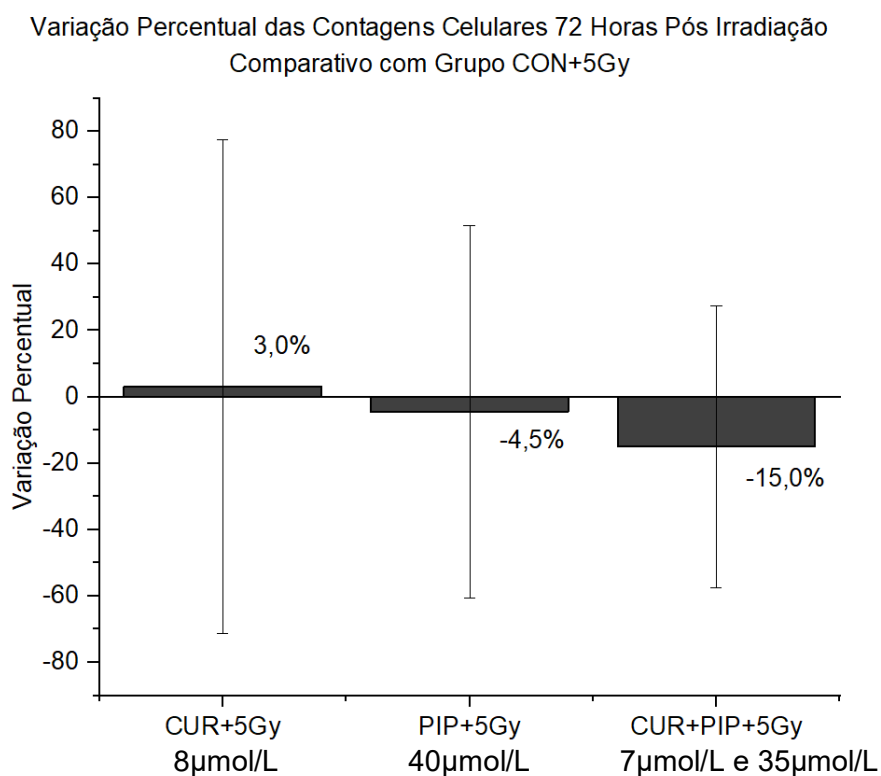


Figura 7-30: Variação das contagens celulares dos grupos 84h pós irradiação.

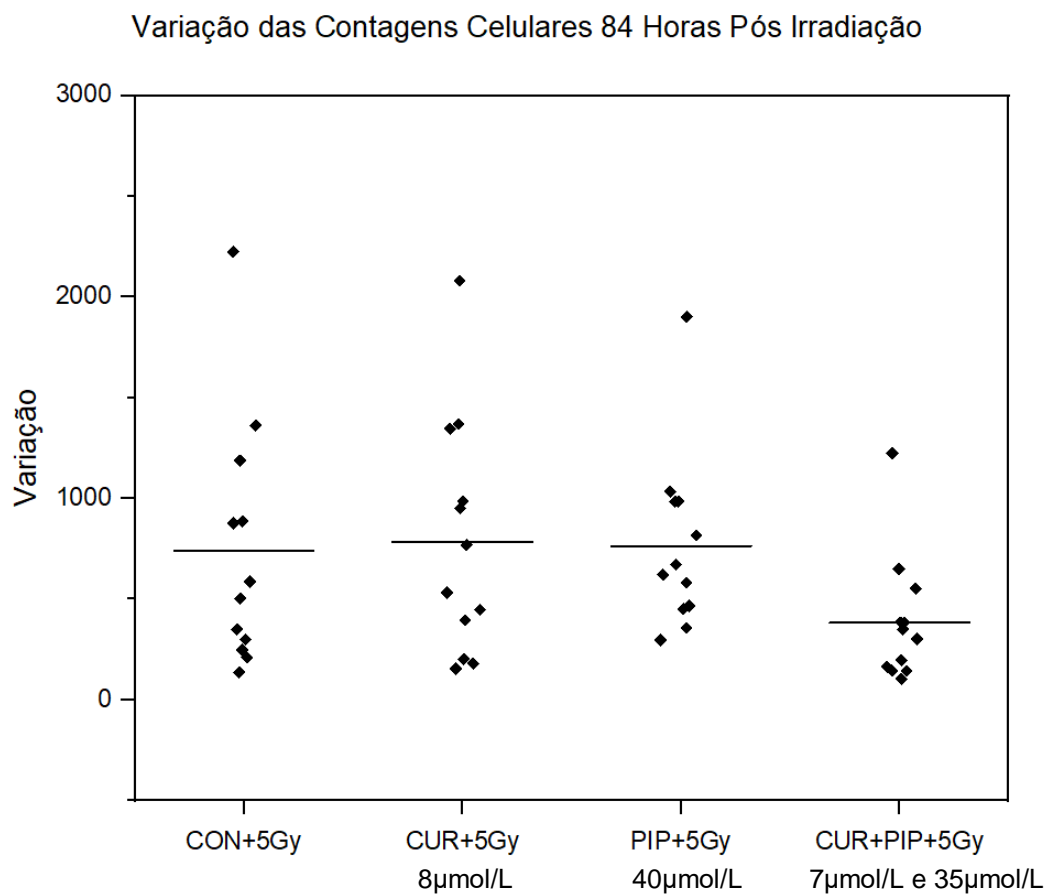


Figura 7-31: Teste de Tukey 84h pós irradiação.

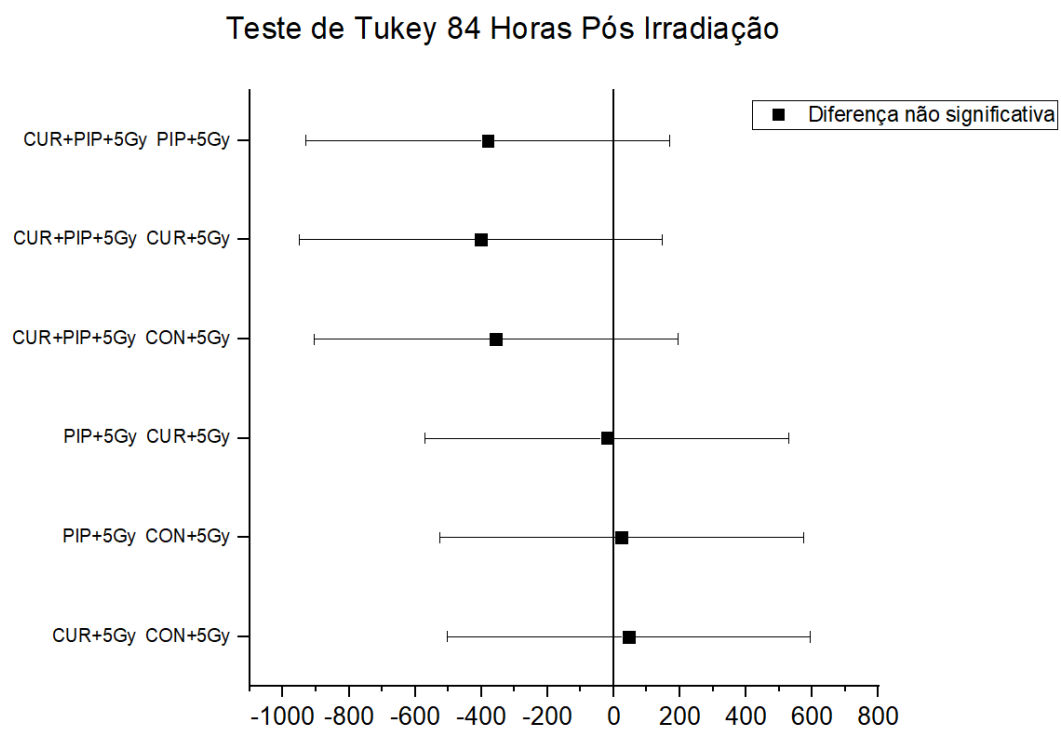
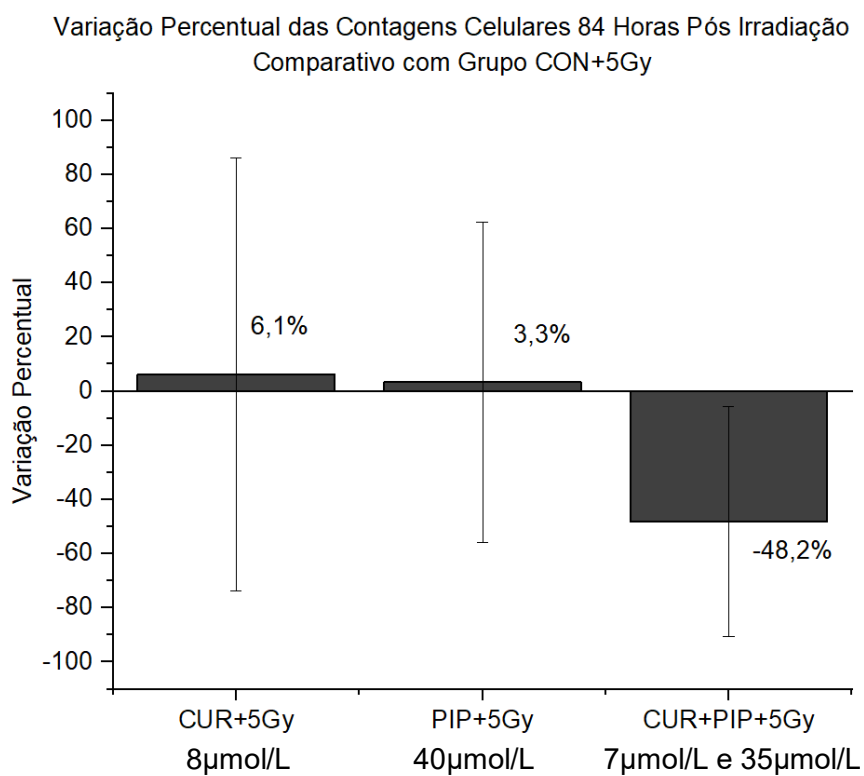


Figura 7-32: Variação percentual das contagens celulares em relação ao Grupo CON+5Gy 84h pós irradiação.



8. DISCUSSÃO

8.1. Das concentrações das substâncias de interesse

As concentrações de Curcumina e Piperina utilizadas no ensaio foram estabelecidas com base na literatura. O potencial da CUR na inibição do crescimento e indução de apoptose em culturas da linhagem celular MDA-MB-231 já foi demonstrado em alguns estudos. A literatura, no entanto, diverge quanto às concentrações da substância eficazes nessa inibição. A Tabela 6-1 exibe os valores de IC₅₀ já relatados para a CUR, quando empregada na linhagem MDA-MB-231. A maior parte dos ensaios apresenta a concentração aplicada em µg/mL, a Tabela 6-1 exibe as concentrações originais e suas conversões para µmol/L, unidade utilizada neste trabalho.

Tabela 8-1: Valores de IC₅₀ obtidos em ensaios com o emprego de Curcumina em culturas da linhagem MDA-MB-231.

| Referência | Valor de IC ₅₀ µg/mL | Valor de IC ₅₀ µmol/L |
|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| (FAN et al., 2016a) | 3,63±0,26 | 9,85±0,71 |
| (LIU et al., 2009) | 5,00 | 13,57 |
| (CINE et al., 2013) | 14,73 | 39,99 |
| (CHIU; SU, 2009) | 16,25 | 44,11 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Já foi demonstrado que a PIP apresenta IC₅₀ de aproximadamente 214 µmol/L para linhagens celulares HeLa (PAARAKH et al., 2015), apresentando, para a linhagem MDA-MB-231, um IC₅₀ de 238 µg/mL, ou aproximadamente 834 µmol/L (FONSECA et al., 2020). Greenshields et al. (2015) constatou uma redução significativa da população da mesma linhagem celular com concentrações da ordem de 150 µmol/L, não relatando, no entanto, o valor de IC₅₀. Considerando linhagens celulares diversas, não foi constatada qualquer toxicidade da PIP em concentrações inferiores a 60µmol/L em ensaios realizados por Thiel et al (2014). Apesar das concentrações citotóxicas da PIP serem consideravelmente mais elevadas que as observadas para a CUR, as concentrações de PIP utilizadas em ensaios de radiosensibilidade são bastante

inferiores ao seu IC_{50} , com valores da ordem de 30 a 80 $\mu\text{mol/L}$ (TAK; LEE; PARK, 2011) (SHAHEER; SOMASHEKARAPPA; LAKSHMANAN, 2020) (SHAHEER; LAKSHMANAN, 2021).

Qian et al. (2015) demonstraram a eficácia da CUR em potencializar a radiosensibilidade de células de glioblastoma nas concentrações de 5 $\mu\text{mol/L}$ e 10 $\mu\text{mol/L}$, sendo esta última a concentração de escolha para ensaios de radiosensibilização para várias outras linhagens celulares (LI et al., 2017) (LIU; WANG; LI, 2018) (CALAF et al., 2012).

Com base na bibliografia já estabelecida, (LI et al., 2017), (LIU; WANG; LI, 2018), (CALAF et al., 2012), (PAARAKH et al., 2015), (THIEL et al., 2014) e (TAK; LEE; PARK, 2011) as concentrações iniciais para este experimento, conforme já relatado, foram definidas como Curcumina: 8 $\mu\text{mol/L}$ e Piperina: 40 $\mu\text{mol/L}$ nos grupos com as substâncias isoladas. Para o grupo de análise contendo as duas substâncias associadas, as concentrações iniciais foram definidas como Curcumina: 7 $\mu\text{mol/L}$ e Piperina: 35 $\mu\text{mol/L}$.

8.2. Dos grupos não irradiados

Os grupos não irradiados *CON-NIR*, *CUR-NIR*, *PIP-NIR* e *CUR+PIP-NIR*, atingiram a confluência da cultura ao início do experimento, permanecendo em condição laboratorial estável ao longo das 84 horas da cinética temporal, não sendo constatadas reduções em suas populações. Com isso, nenhuma das combinações de substâncias demonstrou potencial antineoplásico no estudo.

A CUR isolada, na concentração 8 $\mu\text{mol/L}$, foi ineficiente na indução de apoptose das culturas celulares MDA-MB-231. Tal resultado diverge do relatado por (FAN et al., 2016a) e (LIU et al., 2009), que demonstraram inibição IC_{50} em concentrações muito próximas, da ordem de 9,8 $\mu\text{mol/L}$ e 13,6 $\mu\text{mol/L}$. De acordo com estes ensaios, esperaria-se algum efeito inibitório com a concentração empregada. Por outro lado, o resultado observado vai de encontro ao relatado por (CINE et al., 2013) e (CHIU; SU, 2009), que apresentam valores de IC_{50} de aproximadamente 40 $\mu\text{mol/L}$, mais de

quatro vezes superior à concentração utilizada, corroborando a ausência de efeito antineoplásico constatada. Os dados experimentais expostos nestes trabalhos não fornecem elementos suficientes para uma definição dos possíveis fatores influenciando essa divergência. A realização de novos experimentos, buscando a definição de IC_{50} nas condições laboratoriais do NRI podem contribuir para a elucidação desses fatores.

A ausência de efeito indutor de apoptose da PIP isolada, na concentração 40 $\mu\text{mol/L}$, foi confirmada, como esperado, considerando-se o relato de uma concentração de inibição mais de 3 vezes superior ao valor utilizado (Greenshields et al., 2015), assim como um valor de IC_{50} mais de 20 vezes superior (Fonseca et al., 2020). Conforme já descrito, as concentrações de aplicação da PIP como radiosensibilizador se situam na ordem de 30 a 80 $\mu\text{mol/L}$, e seu emprego como antineoplásico será realizado com concentrações fora desse escopo de aplicação.

Os dois fitoterápicos, quando em combinação, nas concentrações de CUR: 7 $\mu\text{mol/L}$ e PIP: 35 $\mu\text{mol/L}$, também não apresentaram qualquer efeito antineoplásico, não sendo constatadas propriedades sinérgicas das substâncias nesse contexto.

Novos ensaios, com concentrações variáveis, nos grupos *CUR-NIR* e *PIP-NIR* serão necessários para elucidar as concentrações mínimas de inibição nas condições laboratoriais do NRI. Uma vez definidos, esses valores poderão ser utilizados em um novo ensaio com o grupo *CUR+PIP-NIR*, levando a uma avaliação mais precisa quanto à sinergia antineoplásica das substâncias.

8.3. Dos grupos irradiados

O comportamento dos grupos estudados apresentou dois padrões de evolução distintos ao longo da cinética temporal. Um primeiro padrão, constatado do início do experimento até as 24 horas de evolução, apresenta potenciais de inibição do crescimento celular diferentes entre os grupos, sendo constatada significância estatística. Após 36h da cinética temporal, apesar de observarem-se tendências de maior inibição em alguns grupos, já não se constata relevância estatística nas observações.

A análise realizada em T1, 6h após a irradiação, demonstrou o efeito radiosensibilizador da CUR isolada, na concentração 8 $\mu\text{mol/L}$, da PIP isolada, na concentração 40 $\mu\text{mol/L}$ e da associação CUR+PIP, nas concentrações 7 $\mu\text{mol/L}$ e 35 $\mu\text{mol/L}$, todas em relação ao Controle Irradiado. A CUR apresenta o potencial radiosensibilizador mais pronunciado entre os três grupos, sendo capaz de induzir contagens celulares 35,6% inferiores ao controle. Já as amostras, PIP e CUR+PIP, apresentaram potenciais de inibição semelhantes entre si, com contagens celulares 10,3% e 10,4% inferiores ao controle.

No intervalo de tempo T2, 12h após a irradiação, constata-se uma elevação na dispersão das contagens celulares nos grupos PIP e CUR+PIP. Essa dispersão foi mais pronunciada neste, sendo evidenciado que o efeito radiosensibilizante da associação CUR+PIP deixa de ser observado. Uma tendência de efeito inibitório ainda é evidente, com as contagens celulares 7,4% inferiores ao controle, no entanto, a medida não apresenta relevância estatística. A CUR e PIP isoladas mantêm o efeito inicial, com persistência da maior intensidade radiosensibilizante por parte da CUR, com contagens 39,4% inferiores ao controle, enquanto se observam resultados 21,9% inferiores para a PIP.

Após 24h na cinética temporal, em T3, observa-se dispersão muito acentuada das contagens celulares do grupo PIP. O desvio padrão das medidas se eleva muito e, apesar de manter uma tendência de inibição, com contagens 8,9% inferiores ao controle, esse grupo já não demonstra atividade estatisticamente relevante. A CUR isolada mantém o efeito radiosensibilizador com contagens 39,7% inferiores ao controle, e o grupo CUR+PIP, diferentemente do constatado no intervalo de observação anterior, volta a demonstrar efeitos estatisticamente significativos, inclusive mais pronunciados que a CUR, com contagens 42,6% inferiores ao controle.

As observações realizadas a partir T4, 36h pós irradiação, demonstram a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. A dispersão das medidas apresenta elevação considerável em relação ao observado até as 24h. Após esse período, os efeitos da exposição à radiação ionizante já são capazes de inviabilizar todas as culturas celulares analisadas.

Conforme os dados levantados e as análises estatísticas procedidas, o efeito radiosensibilizante da CUR e da PIP, assim como de sua associação, pôde ser observado em células da linhagem MDA-MB-231. Tal efeito se apresenta de forma aguda, já sendo observados decréscimos nas populações das culturas celulares apenas 6h após a exposição à radiação ionizante.

No período de 12h após a irradiação, o grupo exposto à associação *CUR+PIP+5Gy* não demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo *CON+5Gy*. No entanto, sua relevância pôde ser novamente observada na análise de 24h pós irradiação. Neste mesmo período, o Grupo *PIP+5Gy* passa a não apresentar relevância estatística, apesar de demonstrar efeitos radiosensibilizantes nos dois períodos anteriores, em potência semelhante à *CUR+PIP+5Gy* em T1, e superior em T2. Tais resultados provavelmente demonstram fragilidades do processo proposto para estimativa do número de células por campo. Fatores como a luz ambiente na sala de microscopia, o reposicionamento diário do sistema de obtenção de imagens, assim como fragmentos celulares que se acumulam nas culturas com o avançar da cinética temporal, prejudicam parcialmente a qualidade das imagens obtidas, principalmente após 12h, aumentando consideravelmente a dispersão das medidas.

Propostas para minimizar tais fatores apontam no sentido de realizar as aquisições fotográficas em sala escura, utilizar sistema estático de captura digital, seja através da fixação e imobilização da câmera digital acoplada, ou do uso de sistemas diferentes do aplicado. Em relação aos fragmentos celulares que se acumulam nos frascos ao longo do tempo, pode-se considerar a lavagem dos frascos previamente a cada leitura, com posterior reposição do meio, associado às substâncias de interesse. Tal metodologia, no entanto, inviabilizaria a análise do sobrenadante coletado para observação do perfil de proteínas expressas no contexto.

Em nenhum momento da cinética temporal foi observada a sinergia entre CUR e PIP na radiosensibilização das células da linhagem MDA-MB-231. Nos campos expostos à associação foi observado efeito radiosensibilizante; no entanto, esse efeito foi menor que o demonstrado pela CUR e PIP ao serem empregadas isoladamente, nas primeiras 12 horas da cinética, sendo semelhante ao da CUR isolada em T3: 24h. Conforme relatado, as concentrações de ambas as substâncias foram menores

quando usadas em associação, com uma redução de aproximadamente 12,5% em relação aos grupos em que foram empregadas isoladas. Tal redução poderia explicar seu menor efeito mas, no entanto, não é possível descartar a hipótese de ocorrer um efeito inibitório duplo entre os fitoterápicos, em que um aumento de concentração acarretasse, inclusive, a redução ainda mais efetiva da radiosensibilização. Somente novos experimentos permitirão a elucidação dos dados observados.

8.4. Do protocolo computacional de contagem celular

O protocolo computacional de contagem celular, desenvolvido como parte do presente trabalho e adotado ao longo do experimento, se mostrou eficaz. Apesar das fragilidades constatadas, se apresenta como ferramenta promissora em análises de culturas celulares em cinética temporal, uma vez que permite a utilização de uma única cultura ao longo de todo o ensaio.

Ensaio de viabilidade celular, como o teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), apesar de amplamente utilizados, inviabilizam as culturas analisadas a cada observação, elevando os custos e aumentando a estrutura necessária para a condução de experimentos semelhantes. O presente trabalho, ao utilizar a técnica de análise não destrutiva, pôde ser conduzido com apenas 8 frascos T-25. Caso optássemos pela análise utilizando técnica MTT seriam necessários aproximadamente 64 frascos de cultura, sem considerar possíveis perdas e contaminações dos meios utilizados. Neste caso, a impossibilidade de iniciar com o mesmo número de células em cada um dos 64 frascos pode trazer grande incerteza.

Cabe ressaltar ainda, que o ensaio MTT realiza uma estimativa da população celular em uma cultura através do maior ou menor metabolismo de seu princípio ativo. Culturas mais populosas induzem a metabolização mais acentuada, levando a leituras mais elevadas. No entanto, culturas que apresentem células com atividade metabólica aumentada refletirão contagens mais elevadas, apesar de não ser constatada uma elevação real de sua população. O método proposto realiza a contagem direta das células, contornando ainda essa limitação do ensaio MTT.

A proposta inicial deste trabalho foi a realização de outros ensaios, aprimorando as técnicas de captura e tratamento das imagens, assim como analisando outras variações de concentração dos fitoterápicos de interesse. Essa meta não pôde ser cumprida ante o contexto pandêmico observado nos anos de 2020 e 2021, que impossibilitou a realização de novos experimentos que dependiam do estabelecimento de novas culturas celulares, autorização de visitantes externos ao CDTN para realização do processo de irradiação, e ainda acesso contínuo ao laboratório do Departamento de Engenharia Nuclear, inclusive em horário noturno, para seguimento das culturas na cinética de tempo pós irradiação.

9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A Curcumina e a Piperina, princípios ativos dos fitoterápicos *Curcuma longa* e *Piper nigrum*, não demonstraram sinergia como agentes radiosensibilizantes para células da linhagem MDA-MB-231, quando empregados nas concentrações de 7 $\mu\text{mol/L}$ e 35 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente. A associação das substâncias, em verdade, apesar de ser radiosensibilizante para a linhagem celular, se mostrou menos eficaz que a CUR e PIP empregadas isoladamente. Cabe ressaltar, no entanto, que concentrações aproximadamente 14,3% mais elevadas foram utilizadas nos grupos com os fitoterápicos isolados.

Uma vez que as concentrações utilizadas nas análises com a CUR e PIP isoladas diferiram das concentrações utilizadas na associação CUR+PIP, somente novos ensaios, utilizando um maior espectro concentrações, permitirão uma definição quanto à real inexistência desse potencial sinérgico, ou mesmo permitirão uma conclusão quanto a um possível efeito de dupla inibição entre os fitoterápicos.

O efeito radiosensibilizante da PIP, observado nas primeiras 24h após a irradiação, ainda não havia sido constatado para essa linhagem celular. Essa observação abre um novo campo de empregos para esse fitoterápico, seja associado ou não à CUR.

O método de contagem celular estimativo empregado no ensaio se mostrou eficaz, permitindo análises em cinética temporal de forma não destrutiva, o que pode trazer economia de recursos para outros trabalhos da mesma natureza. O método, no entanto, apresenta pontos de fragilidade, que só poderão ser corrigidos com novos empregos e ajustes futuros.

A coleta de sobrenadante dos grupos em estudo, ao longo da cinética temporal, permitirá a realização de ensaios futuros para a análise do perfil de citocinas e outras proteínas expressas no microambiente utilizado.

Em procedimentos de radioterapia, usualmente é empregado o regime de doses fracionadas diárias. Com isso, na prática clínica, as células cancerosas estão sujeitas a um período pós-irradiação de 24 h, após o qual recebem uma segunda dose. Esse

protocolo é seguido sucessivamente, até que se atinja a dose preconizada no tumor. Baseado nessa informação, os achados de potencialização radiosensibilizadora em células radiorresistentes de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 se mostram bastante promissores, tornando a *Curcuma longa* e a *Piper nigrum* possíveis candidatos como agentes sensibilizadores, para estudos in vivo, em procedimentos coadjuvantes ao tratamento convencional da radioterapia de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAMED, S. et al. Piperine Enhances the Efficacy of TRAIL-based Therapy for Triple-negative Breast Cancer Cells. v. 1900, p. 1893–1899, 2014.

ADIWIDJAJA, J.; MCLACHLAN, A. J.; BODDY, A. V. Curcumin as a clinically-promising anti-cancer agent: pharmacokinetics and drug interactions. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 13, n. 9, p. 953–972, 2017.

AGGARWAL, B. B. et al. Nuclear transcription factor NF-kappa B: Role in biology and medicine. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n. 4, p. 341–353, 2004.

AGGARWAL, B. B. et al. Curcumin: The Indian solid gold. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 1–75, 2007.

AJAZUDDIN et al. Role of herbal bioactives as a potential bioavailability enhancer for Active Pharmaceutical Ingredients. **Fitoterapia**, v. 97, p. 1–14, 2014.

AMALDI, U.; KRAFT, G. Radiotherapy with beams of carbon ions. **Reports on Progress in Physics**, v. 68, p. 1861–1882, 2005.

ANAND, P. et al. Bioavailability of Curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.

ANDERS, C. K.; CAREY, L. A. NIH Public Access. v. 9, n. Suppl 2, 2010.

ARAÚJO, L. P. DE; SÁ, N. M. DE; ATTY, A. T. DE M. Necessidades Atuais de Radioterapia no SUS e Estimativas para o Ano de 2030. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 62, n. 1, p. 35–42, 2016.

ARAVINDAN, N. et al. Curcumin inhibits NFkB mediated radioprotection and modulate apoptosis related genes in human neuroblastoma cells. **Cancer Biology and Therapy**, v. 7, n. 4, p. 569–576, 2008.

ARPIN, D. et al. Early variations of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels during thoracic radiotherapy are predictive for radiation pneumonitis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 34, p. 8748–8756, 2005.

ASSAD, D. X. et al. Additive cytotoxic effects of radiation and mTOR inhibitors in a cervical cancer cell line. **Pathology Research and Practice**, v. 214, n. 2, p. 259–262, 2018.

ATHUKURI, B. L.; NEERATI, P. Enhanced oral bioavailability of domperidone with piperine in male wistar rats: Involvement of CYP3A1 and P-gp inhibition. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 28–37, 2017.

AZAB, S. et al. Beneficial Effects of Piperine in global cerebral ischemia/reperfusion model in irradiated rats. **Egyptian Journal of Radiation Sciences and Applications**, v. 30, n. 1, p. 161–170, 2018.

BAE, G. S. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. **European Journal of Pharmacology**, v. 642, n. 1–3, p. 154–162, 2010.

BALDWIN, A. S. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 1, p. 3–6, 2001.

BALIGA, M. S. et al. Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: Preclinical and clinical observations. **Food and Function**, v. 3, n. 11, p. 1109–1117, 2012.

BALKWILL, F. TNF- α in promotion and progression of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 409–416, 2006.

BEDADA, S. K.; BOGA, P. K. The influence of piperine on the pharmacokinetics of fexofenadine, a P-glycoprotein substrate, in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 343–349, 2017.

BOWER, J. E. et al. Inflammatory biomarkers and fatigue during radiation therapy for breast and prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 17, p. 5534–5540, 2009.

BRADFORD, P. G. Curcumin and obesity. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p. 78–87, 2013.

BUTLER, M.; DAWSON, M. (EDS.). **Cell Culture Labfax**. San Diego, California: Academic Press, 1992.

CAI, Y.; SHENG, Z.; LIANG, S. Radiosensitization effects of curcumin plus cisplatin on non-small cell lung cancer A549 cells. **Oncology Letters**, v. 18, n. 1, p. 529–534, 2019.

CAILLEAU, R. et al. Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions 1,2. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 3, p. 661–674, 1974.

CALAF, G. M. et al. Effect of curcumin on irradiated and estrogen-transformed human breast cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 2, p. 436–442, 2012.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CATANZARO, M. et al. Immunomodulators inspired by nature: A review on curcumin and Echinacea. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 1–17, 2018.

CHAVARRIA, D. et al. Lessons from black pepper: Piperine and derivatives thereof. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 2, p. 245–264, 2016.

CHAVEZ, K. J.; GARIMELLA, S. V.; LIPKOWITZ, S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. **Breast Disease** v. 32, p. 35–48, 2011.

CHEN, Z. et al. Pharmacokinetic based study on “lagged stimulation” of Curcumae Longae Rhizoma - Piper nigrum couplet in their main active components’ metabolism using UPLC-MS-MS. **Phytomedicine**, v. 27, p. 15–22, 2017.

CHENG, A. L. et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**, v. 21, n. 4 B, p. 2895–2900, 2001.

CHIN, K. Y. The spice for joint inflammation: Anti-inflammatory role of curcumin in treating osteoarthritis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3029–3042, 2016.

CHIU, T.-L.; SU, C.-C. Curcumin inhibits proliferation and migration by increasing the Bax to Bcl-2 ratio and decreasing NF-kB expression in breast cancer MDA-MB-231 cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 23, p. 469–475, 2009.

CHO, Y. J. et al. Curcumin attenuates radiation-induced inflammation and fibrosis in rat lungs. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 17, n. 4, p. 267–274, 2013.

CINE, N. et al. Effects of curcumin on global gene expression profiles in the highly invasive human breast carcinoma cell line MDA-MB 231: A gene network-based microarray analysis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, n. 1, p. 23–27, 2013.

COSTA, I. T.; CAMPOS, T. P. R. **Prospects of the application of curcumin in radiation therapy**. Proceedings of the International Nuclear Atlantic Conference 2019. **Anais...Santos**: 2019

CROHNS, M. et al. Cytokines in bronchoalveolar lavage fluid and serum of lung cancer patients during radiotherapy - Association of interleukin-8 and VEGF with survival. **Cytokine**, v. 50, n. 1, p. 30–36, 1 abr. 2010.

DELAVARIAN, Z. et al. Oral administration of nanomicelle curcumin in the prevention of radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancers. **Special Care in Dentistry**, v. 39, n. 2, p. 166–172, 2019.

DI PIERRO, F. et al. Potential role of bioavailable curcumin in weight loss and omental adipose tissue decrease: preliminary data of a randomized, controlled trial in overweight people with metabolic syndrome. Preliminary study. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19, n. 21, p. 4195–4202, 2015.

DIVYA, R.; ASHOK, V.; RAJAJEYA KUMAR, M. Curcumin: The Golden Nutraceutical from The Most Powerful Herb in the Planet-Turmeric. **Chronicles of Complementary, Alternative & Integrative Medicine**, v. 2019, n. 01, p. 1–4, 2019.

DO, M. T. et al. Antitumor efficacy of Piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2591–2599, 2013.

ELKADY, A. A.; TAWFIK, S. S. Anti-inflammatory role of piperine against rat lung tissue damage induced by gamma-rays. **International Journal of Radiation Research**, v. 16, n. 1, p. 75–84, 2018.

ESMAILY, H. et al. An investigation of the effects of Curcumin on Serum Cytokines in Obese Individuals: A randomized controlled trial. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 5, p. 1–6, 2014.

Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil: Instituto Nacional de Câncer, 2019.

Estimativa 2020 - Brasil - estimativa dos casos novos | INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>>. Acesso em: 17 jun. 2021.

FALCÃO, P. L. et al. Aumento de viabilidade de clones radiosensível (PBMC) e resistente (MDA-MB-231) na cobaltoterapia em taxa de dose reduzida. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 158–165, 2015.

FALKE, J. et al. Curcumin as Treatment for Bladder Cancer: A Preclinical Study of Cyclodextrin-Curcumin Complex and BCG as Intravesical Treatment in an Orthotopic Bladder Cancer Rat Model. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

FAN, H. et al. Curcumin inhibits intracellular fatty acid synthase and induces apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Oncology Reports**, v. 35, n. 5, p. 2651–2656, 2016a.

FAN, H. et al. MiR-593 mediates curcumin-induced radiosensitization of nasopharyngeal carcinoma cells via MDR1. **Oncology Letters**, v. 11, n. 6, p. 3729–3734, 2016b.

FENG, X. et al. Effects of piperine on the intestinal permeability and pharmacokinetics of linarin in rats. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5624–5633, 2014.

FILHO, A. B. C. et al. Curcuma: Medicinal, Spice and of Other Potential Use Plant. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 171–175, 2000.

FILHO, G. B.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: **Bogliolo Patologia**, 8ed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 175–236, 2012.

FONSECA, L. M. DA et al. Piperine Inhibits TGF- β Signaling Pathways and Disrupts EMT-Related Events in Human Lung Cells. **Medicines**, v.7, n.4, p. 1–16, 2020.

FUKUDA, K. et al. A diarylpentanoid curcumin analog exhibits improved radioprotective potential in the intestinal mucosa. **International Journal of Radiation Biology**, v. 92, n. 7, p. 388–394, 2016.

GAIOLLA, R. D. et al. Serum levels of interleukins 6, 10, and 13 before and after treatment of classic Hodgkin lymphoma. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 135, n. 4, p. 483–489, 2011.

GHELESHLI, N.; GHASEMI, A.; HOSSEINIMEHR, S. J. The influence of piperine on radioprotective effect of curcumin in irradiated human lymphocytes. **The Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. August, 2018.

GIORDANO, A.; TOMMONARO, G. Curcumin and cancer. **Nutrients**, v. 11, n. 10, 2019.

GOEL, A.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 7, p. 919–930, 2010.

GREENSHIELDS, A. L. et al. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 129–140, 2015.

GUDKOV, S. V.; POPOVA, N. R.; BRUSKOV, V. I. Radioprotective substances: History, trends and prospects. **Biophysics (Russian Federation)**, v. 60, n. 4, p. 659–667, 2015.

GUL, P.; BAKHT, J. Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2272–2279, 2015.

GUNTHER, J. R. et al. A Phase 2 Randomized Double Blinded Study Evaluating the Efficacy of Curcumin With Pre-Operative Chemoradiation for Rectal Cancer. **International Journal of Radiation Oncology Biology & Physics**, v. 98, p. 1–46, 2017.

GUPTA, S. C. et al. Multitargeting by turmeric, the golden spice: From kitchen to clinic. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 9, p. 1510–1528, 2013.

HADI, A. et al. The effect of Curcumin/Turmeric on blood pressure modulation: A systematic review and meta-analysis. **Pharmacological Research**, v. 150, p. 104505, 2019.

HALL, S. et al. Protection against radiotherapy-induced toxicity. **Antioxidants**, v. 5, n. 3, p. 1–18, 2016.

HEJAZI, J. et al. Effect of curcumin supplementation during radiotherapy on oxidative status of patients with prostate cancer: A double blinded, randomized, placebo-controlled study. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 1, p. 77–85, 2016.

HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.

HU, Y. et al. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v. 220, p. 1–8, 2017.

JAGETIA, G. C. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 301–320, 2007.

JAGETIA, G. C.; AGGARWAL, B. B. “Spicing up” of the immune system by curcumin. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 1, p. 19–35, 2007.

JHA, N. S. et al. Antioxidant activity and electrochemical elucidation of the enigmatic redox behavior of curcumin and its structurally modified analogues. **Electrochimica Acta**, v. 151, p. 574–583, 2015.

JOSHI, D. R.; SHRESTHA, A. C.; ADHIKARI, N. A review on diversified use of the king of spices: Piper nigrum (Black pepper). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 10, p. 4089–4101, 2018.

KASSAB, C. et al. Immunomodulatory Methods. In: **Nervous System Drug Delivery: Principles and Practice**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 297–334.

KATASONOV, A. B. Curcumin as an adjuvant treatment of depression: mechanisms of action and application prospects. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**, v. 120, n. 2, p. 125–131, 2020.

KAUR, G.; INVALLY, M.; CHINTAMANENI, M. Influence of piperine and quercetin on antidiabetic potential of curcumin. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 13, n. 3, p. 247–255, 2016.

KAZI, H. A. et al. Pharmaceutical formulation of garlic and turmeric dried crude extract and their synergistic antifungal activity and safety. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 75–82, 2018.

KESARWANI, K.; GUPTA, R. Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 4, p. 253–266, 2013.

KOCAADAM, B.; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889–2895, 2017.

KOLIVAND, S. et al. Evaluating the Radioprotective Effect of Curcumin on Rat's Heart Tissues. **Current Radiopharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 23–28, 3 set. 2018.

KUMAR, S. et al. Piperine inhibits TNF- α induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF- κ B and I κ B kinase activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 575, n. 1–3, p. 177–186, 1 dez. 2007.

KUMARI, N. et al. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. **Tumor Biology**, v. 37, n. 9, p. 11553–11572, 2016.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways. **Clinical Science**, v. 131, n. 15, p. 1781–1799, 2017.

KUPTNIRATSAIKUL, V. et al. Efficacy and safety of *Curcuma domestica* extracts in patients with knee osteoarthritis. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 15, n. 8, p. 891–897, 2009.

LAI, L. H. et al. Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 4, p. 523–530, 2012.

LAMO, J. M.; RAO, S. R. Meiotic behaviour and its implication on species interrelationship in the genus *Curcuma* (Linnaeus, 1753) (Zingiberaceae). **Comparative Cytogenetics**, v. 11, n. 4, p. 691–702, 2017.

LEE, S. H. et al. Piperine-mediated drug interactions and formulation strategy for piperine: recent advances and future perspectives. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 43–57, 2018.

LI, G. et al. Curcumin enhances the radiosensitivity of renal cancer cells by suppressing NF- κ B signaling pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 974–981, 2017.

LI, S. et al. Piperine, a piperidine alkaloid from *Piper nigrum* re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 83–87, 2011.

LIN, Y. et al. Piperine induces apoptosis of lung cancer A549 cells via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. **Tumor Biology**, v. 35, n. 4, p. 3305–3310, 2014.

LIU, G.; WANG, Y.; LI, M. Curcumin sensitized the antitumour effects of irradiation in promoting apoptosis of oesophageal squamous-cell carcinoma through NF- κ B signalling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 10, p. 1340–1348, 2018.

LIU, Q. et al. Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by down-regulation of NF- κ B, cyclinD. **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 916–922, 2009.

LIU, W. et al. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 8, p. 694–702, 2016.

LONGO, D. L. Abordagem do paciente com câncer. In: **Medicina Interna de Harrison**. 18. ed. New York: McGraw-Hill, 2013. p. 646–654.

LOPRESTI, A. L. et al. Curcumin and major depression: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial investigating the potential of peripheral biomarkers to predict treatment response and antidepressant mechanisms of change. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 38–50, 2015.

LOPRESTI, A. L.; DRUMMOND, P. D. Efficacy of curcumin, and a saffron/curcumin combination for the treatment of major depression: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Affective Disorders**, v. 207, n. August 2016, p. 188–196, 2017.

LV, S.; HE, X.; AN, Y. Progress of curcumin on esophageal cancer radiotherapy sensitization. v. 19, p. 471–476, 2018.

MAIA, N. B. et al. Influência de tipos de rizomas de multiplicação no crescimento de curcuma. **Bragantia**, v. 54, n. 1, p. 33–37, 1995.

MAIER, P. et al. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, 2016.

MARTINS, C. A. et al. Curcumin in combination with piperine suppresses osteoclastogenesis in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 10, p. 1638–1645, 2015.

MEGHWAL, M.; GOSWAMI, T. K. Piper nigrum and piperine: An update. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1121–1130, 2013.

MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. **Antioxidant and anti-inflammatory properties of Curcumin**. 1. ed. [s.l.] Springer US, 2007.

MGBEAHURUIKE, E. E. et al. antibiotics Antimicrobial and Synergistic Effects of Commercial Piperine and Piperlongumine in Combination with. **Antibiotics**, v. 8, n. 55, p. 1–12, 2019.

MINAFRA, L. et al. Radiosensitizing effect of curcumin-loaded lipid nanoparticles in breast cancer cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 11134, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de Expansão da Radioterapia no SUS**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/plano-de-expansao-da-radioterapia-no-sus>>. Acesso em: 20 jun. 2021.

MIYAZAWA, T. et al. Curcumin and piperine supplementation of obese mice under caloric restriction modulates body fat and interleukin-1 β . **Nutrition and Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2018.

MOHAN, G. et al. Recent advances in radiotherapy and its associated side effects in cancer-a review. **JoBAZ**, v. 80, n. 14, p. 1–10, 2019.

MOMTAZI-BOROJENI, A. A. et al. Curcumin in Advancing Treatment for Gynecological Cancers with Developed Drug and Radiotherapy Associated Resistance. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 179, p. 107–130, 2019.

MOTAWI, T. K. et al. Potential therapeutic effects of antagonizing adenosine A2A receptor, curcumin and niacin in rotenone-induced Parkinson's disease mice model. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 465, n. 1–2, p. 89–102, 2020.

NABAVI, S. F. et al. Curcumin: a natural product for diabetes and its complications. **Curr Top Med Chem**, v. 15, n. 23, p. 2445–2455, 2015.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem: Curcumin**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>>. Acesso em: 1 maio. 2020a.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem: Piperine**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/638024>>. Acesso em: 1 maio. 2020b.

NORMANDO, A. G. C. et al. Effects of turmeric and curcumin on oral mucositis: A systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 5, p. 1318–1329, 2019.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85-97, 2011.

OUYANG, D. YUN et al. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and autophagy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 424–430, 2013.

OYAMA, A. K. et al. Cultivo da pimenteira-do-reino na Região Norte. **Embrapa Amazônia Oriental**, v. 1, p. 185 p., 2004.

PAARAKH, P. M. et al. In vitro cytotoxic and in silico activity of piperine isolated from *Piper nigrum* fruits Linn. **In Silico Pharmacology**, v. 3, n. 1, dez. 2015.

PAINULI, S.; KUMAR, N. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine Prospects in the development of natural radioprotective therapeutics with anti-cancer properties from the plants of Uttarakhand region of India. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, p. 1–7, 2016.

PALLADINO, M. A. et al. Anti-TNF- α therapies: The next generation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 9, p. 736–746, 2003.

PAN, M. H.; HUANG, T. M.; LIN, J. K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, n. 4, p. 486–494, 1999.

PANAHI, Y. et al. Lipid-modifying effects of adjunctive therapy with curcuminoids-piperine combination in patients with metabolic syndrome: Results of a randomized controlled trial. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 22, n. 5, p. 851–857, 2014.

PANAHI, Y. et al. Investigation of the efficacy of adjunctive therapy with bioavailability-boosted curcuminoids in major depressive disorder. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 1, p. 17–21, 2015a.

PANAHI, Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoid-piperine combination in subjects with metabolic syndrome: A randomized controlled trial and an updated meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 1101–1108, 2015b.

PATCHEN, M. L. et al. Administration of interleukin-6 stimulates multilineage hematopoiesis and accelerates recovery from radiation-induced hematopoietic depression. **Blood**, v. 77, n. 3, p. 472–480, 1991.

PATIAL, V. et al. Synergistic effect of curcumin and piperine in suppression of DENA-induced hepatocellular carcinoma in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 445–452, 2015.

PEREIRA, R.; MOREIRA, M. Cultivo de curcuma longa L.(Açafrão-da-índia ou Cúrcuma). **Embrapa Agroindústria Tropical**, n. Comunicado Técnico 142, p. 2–3, 2009.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of dietary spices or their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. **Nahrung**, v. 44, n.1, p. 42–46, 2000.

POU, S. A. et al. Burden of cancer mortality and differences attributable to demographic aging and risk factors in Argentina, 1986-2011. **Cadernos de Saude Publica**, v. 33, n. 2, p. 1–13, 2017.

PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. **Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor- κ B (NF- κ B), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells**. International Immunopharmacology. **Anais...Elsevier B.V.**, 20 dez. 2004

PRASAD, S. et al. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1053–1064, 2014.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.

QIAN, Y. et al. Curcumin enhances the radiosensitivity of U87 cells by inducing DUSP-2 Up-regulation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1381–1393, 2015.

QIN, S. et al. Efficacy and safety of turmeric and curcumin in lowering blood lipid levels in patients with cardiovascular risk factors: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2017.

RAUSCHER, F. M.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 329–334, 2000.

RAVINDRAM, P. N.; BABU, K. N.; SIVARAMAN, K. **Turmeric - The genus Curcuma**. 1 ed. ed. Boca Raton: CRC, 2007.

SAADIPOOR, A. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial of nanocurcumin in prostate cancer patients undergoing radiotherapy. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 2, p. 370–378, 2019.

SAMYKUTTY, A. et al. Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–11, 2013.

SCHAUE, D.; MCBRIDE, W. H. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 9, p. 527–540, 2015.

SEO, J. AH et al. Curcumin induces apoptosis by inhibiting sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase activity in ovarian cancer cells. **Cancer Letters**, v. 371, n. 1, p. 30–37, 2016.

SEUNG, S. K. et al. Phase 1 study of stereotactic body radiotherapy and interleukin-2: Tumor and immunological responses. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 137, p. 1–8, 2012.

SHAFIEE, M. et al. Current Status and Perspectives Regarding the Therapeutic Potential of Targeting EGFR Pathway by Curcumin in Lung Cancer. **Curr Pharm Des**, v. 23, n. 13, p. 2002–2008, 2017.

SHAHEER, K.; LAKSHMANAN, M. D. Effect of Piperine in Combination with Gamma Radiation on A549 Cells. **Journal of Health and Allied Sciences NU**, p. 1–7, 2021.

SHAHEER, K.; SOMASHEKARAPPA, H.; LAKSHMANAN, M. D. Piperine sensitizes radiation-resistant cancer cells towards radiation and promotes intrinsic pathway of apoptosis | Enhanced Reader. **Journal of Food Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020.

Share of deaths by cause, World, 2017. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/grapher/share-of-deaths-by-cause>>. Acesso em: 7 maio. 2020.

SHARIAT, S. F. et al. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. **Urology**, v. 58, n. 6, p. 1008–1015, 2001.

SHEHZAD, A.; REHMAN, G.; LEE, Y. S. Curcumin in inflammatory diseases. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p. 69–77, 2013.

SHEP, D. et al. Safety and efficacy of curcumin versus diclofenac in knee osteoarthritis: A randomized open-label parallel-arm study. **Trials**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2019.

SHI, H. SHAN et al. A systemic administration of liposomal curcumin inhibits radiation pneumonitis and sensitizes lung carcinoma to radiation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2601–2611, 2012.

SHIAO, S. L.; COUSSENS, L. M. The tumor-immune microenvironment and response to radiation therapy. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 4, p. 411–421, 2010.

SHOBA, G. et al. Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. **Planta Med.**, v. 64, p. 353–356, 1998.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.

SINGH, S.; AGGARWAL, B. B. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferulolylmethane). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24995–25000, 1995.

SINGH, S.; JAMWAL, S.; KUMAR, P. Piperine Enhances the Protective Effect of Curcumin Against 3-NP Induced Neurotoxicity: Possible Neurotransmitters Modulation Mechanism. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 8, p. 1758–1766, 2015.

SIVIERO, A. et al. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 57–70, 2015.

SONIS, S. T. et al. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncology**, v. 36, n. 4, p. 373–381, 1 jul. 2000.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 8, p. 735–748, 2007.

STANTON, G. J. et al. Interferon review. **Investigative Radiology**, v. 22, n. 3, p. 259–273, 2007

TAK, J. K.; LEE, J. H.; PARK, J. Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. **BMB Reports**, p. 242–246, 2011.

TANG, M.; TAGHIBIGLOU, C.; LIU, J. The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 58, n. 4, p. 1003–1016, 2017.

TEOW, S. Y. et al. Antibacterial Action of Curcumin against Staphylococcus aureus: A Brief Review. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2016, 2016.

THIEL, A. et al. Black pepper constituent piperine: Genotoxicity studies in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 350–357, 2014.

UMA, K.; HUANG, X.; KUMAR, B. A. Antifungal effect of plant extract and essential oil. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 23, n. 3, p. 233–239, 2017.

VALIZADEH, H. et al. Nano-curcumin therapy, a promising method in modulating inflammatory cytokines in COVID-19 patients. **International Immunopharmacology**, v. 89, n. October, p. 107088, 2020.

VAN DEN BERG, R. et al. Transcription factor NF- κ B as a potential biomarker for oxidative stress. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. S1, p. S121–S127, 2001.

VAN DIE, M. D. et al. A Placebo-Controlled Double-Blinded Randomized Pilot Study of Combination Phytotherapy in Biochemically Recurrent Prostate Cancer. **Prostate**, v. 77, n. 7, p. 765–775, 2017.

VARELLA, P. P. V; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, p. 146–154, 2001.

VERGINADIS, I. L. et al. A novel model to study image-guided radiation-induced intestinal injury and preclinical screening of radioprotectors. **Cancer Research**, v. 77, n. 4, p. 908–917, 2016.

VERMA, V. Relationship and interactions of curcumin with radiation therapy. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 3, p. 275–283, 2016.

VIJAYAKUMAR, R. S.; SURYA, D.; NALINI, N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. **Redox Report**, v. 9, n. 2, p. 105–110, 2004.

VOGEL JR., A. No Title. **Pharm Chemie**, p. 3–20, 1842.

VURMAZ, A. et al. Antioxidant effects of piperine in in-vivo chick embryo cataract model induced by steroids. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 182–189, 2019.

WANG-SHENG, C. et al. Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 44–48, 1 jan. 2017.

WANG, H. et al. Cancer Radiosensitizers. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 1, p. 24–48, 2018.

WANG, K. et al. Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–14, 2016.

WARDMAN, P. Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy. **Clinical Oncology**, v. 19, n. 6, p. 397–417, 2007.

WEN, C. et al. Enhanced Radiosensitization Effect of Curcumin Delivered by PVP-PCL Nanoparticle in Lung Cancer. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, 2017.

WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization, 2020.

WOLF, J. R. et al. Oral curcumin for radiation dermatitis: a URCC NCORP study of 686 breast cancer patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 26, n. 5, p. 1543–1552, 2018.

WONG, K. E. et al. Curcumin nanoformulations for colorectal cancer: A review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 152, p. 1–17, 2019.

XIA, Y. et al. Piperine inhibits IL-1 β -induced IL-6 expression by suppressing p38 MAPK and STAT3 activation in gastric cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 398, n. 1–2, p. 147–156, 2015.

XIAN, J. et al. Combination nonviral murine interleukin 2 and interleukin 12 gene therapy and radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 131, n. 12, p. 1079–1085, 2005.

YAFFE, P. B. et al. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 94, n. 1, p. 109–114, 2013.

YANG, J. Y.; ZHANG, J.; ZHOU, G. Black pepper and its bioactive constituent piperine: promising therapeutic strategies for oral lichen planus. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 5–13, 2019.

YANG, W. et al. Neuroprotective effects of piperine on the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease mouse model. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 36, n. 5, p. 1369–1376, 2015.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae - A Family Profile. **Brittonia**, v. 10, n. January 1958, p. 1–7, 1957.

ZARAI, Z. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 634–641, 2013.

ZENG, X. et al. Selective reduction in the expression of UGTs and SULTs, a novel mechanism by which piperine enhances the bioavailability of curcumin in rat. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 38, n. 1, p. 3–19, 2017.

ZHANG, L. et al. Composition and bioactivity assessment of essential oils of *Curcuma longa* L. collected in China. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n. July, p. 60–73, 2017.

ZHENG, J. et al. Spices for prevention and treatment of cancers. **Nutrients**, v. 8, n. 8, 2016.

ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, S. et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed Research International**, v. 2014, n. April, 2014.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo: Prospects of the application of curcumin in radiation therapy

PROSPECTS OF THE APPLICATION OF CURCUMIN IN RADIATION THERAPY

1. INTRODUCTION

The Turmeric, also known as Curcuma, has been used for more than 5.000 years in the Indian culture both as a spice and as treatment for various morbidities on the Ayurveda therapies [1]. Reports on the culinary use of the herb in China, as well as its therapeutic use in the Chinese Traditional Medicine, go back thousands of years [2]. The extract used on both ends is obtained from *Curcuma longa* rhizome, a plant that belongs to the ginger family, being also the main responsible for the yellow color of the worldwide known curry spice, which is used mainly in the Indian, Turkish and Southern Asian cultures [3].

Dozens of herb extracts, among them Turmeric, attract growing scientific attention, aiming at proving and elucidating the properties traditionally attributed to them. For instance, the traditional use of Curcuma spice as a natural food preservative has stimulated research on its possible antibacterial and antifungal properties. These effects have already been extensively proven and reported [4, 5, 6]. These results led to other studies that ended up showing benefits also on the treatment human fungal infections [7]. The active principle of Turmeric is the polyphenol Curcumin or Diferuloylmethane, with IUPAC definition (1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione). Its elucidation opened the way for the research of diverse medical applications. In the last few years, increasing evidence appears showing the beneficial properties of curcumin on the plasma lipid reduction [8], as immunomodulator [9], as antioxidant [10], as antineoplastic agent for a variety of tumors like prostate [11], lung [12], breast [13], bladder [14], ovary [15] among others [16]. Recent benefits have also been reported on the treatment of metabolic syndrome [17] and on inflammatory states [18]. The greatest amount of data gathered so far led to the publication of some reviews on the positive results obtained with curcumin. The most recent ones date back to 2017 [19,20]. The diversity of

applications, as well as the potential uses of *Curcuma longa*, have drawn the interest of our research group about the application of this phytotherapeutic on the nuclear sciences field.

Cancer continues being one of the main public health issues worldwide. According to the Brazilian National Cancer Institute (INCA) more than 14.1 million new cases were diagnosed in 2012. More than 8.2 million patients came to death in the same year as a consequence of the disease [21]. Radiotherapy is one of the most important cancer treatment modalities. Even though it already shows suitable results for many tumors, the search of new adjuvant drugs is extremely important [22].

The radiotherapy adjuvant drugs may be separated into two classes: the radiosensitizers and the radioprotectors. A radiosensitizing substance can be defined as the one that increases the radiation-induced damage both on the DNA level, as well as on a cellular level. A radioprotector compound is the one capable of minimizing the radio-induced toxicity in any tissue. Upon looking for adjuvant drugs for radiotherapy we could focus on the radiosensitization of tumoral cells [22,23], or on the radioprotection of the healthy tissues, that will be unavoidably irradiated during the treatment [24]. It is always desirable that the candidate substances show a favorable administration route, a low side effect profile, as well as an acceptable cost/benefit relation.

Curcuma longa has shown in numerous anti-inflammatory, immunomodulative and anti-neoplastic benefits, being also considered a secure phytotherapeutic in terms of side effects. These characteristics, allied to oral administration and low cost, put Curcumin as an exciting candidate as adjuvant to radiation therapy.

2. METODOLOGY

This research group performed a systematic review of the scientific production on the use of curcumin on radiotherapy, published to this day, using the Medline, SciELO, Science Direct databases. An additional grey literature search was performed using the Google Scholar engine. The key words used were Curcumin, Curcuminoids, Turmeric, *Curcuma longa*, radiotherapy, radiosensitization and radioprotection.

3. RESULTS

Reports evaluating the use of curcumin on radiotherapy are being produced for almost three decades. A review study by Goel and Aggarwal (2010) shows papers that date back to 1993. The authors were able to find demonstrations of the radiosensitization effect in vitro for cell

lines of glioma, neuroblastoma, prostate and cervical tumors, as well as in vivo studies for colorectal and prostate neoplasms. The use of curcumin as a radioprotective agent was reported on lymphocyte lines, acting also on the reductions of pulmonary toxicity, mucositis and DNA level damage in mice [25]. Before this first review, the radiosensitizing and radioprotector effect of curcumin had already been reported by Jagetia (2007). Benefits were observed in animal model, and the probable biochemical mechanisms of action were addressed [26].

Verma (2016) performed a new literature review about Turmeric. His main objectives were stimulating its use in patients undergoing radiotherapy as well as encouraging the production of new clinical essays. The article reinforces various observations on the applications of curcumin. The main mechanism of its radiosensitizing action is the inhibition of the transcription factor NF- κ B. This compound is already widely related to tumorigenesis and radioresistance. This metabolic mechanism is established for the curcumin radiosensitization of lymphomas, sarcomas, prostate, cervical, gastrointestinal, breast, lung and head tumors. The author emphasizes that almost all data found referred to in vitro studies and, so far, there were no clinical benefits reported. The radioprotection granted by curcumin is even more consistent, though it was analyzed on fewer tissues. This benefit was observed in the reduction of post-irradiation dermatitis on breast cancer patients, on the reduction of cataract occurrence after the treatment of central nervous system tumors, on the reduction of mucositis, as well as on the reduction of secondary tumors occurrence [27].

The present article will be limited to raising the recent outcomes and tendencies established after 2016. The three vast reviews already performed until that year made the analysis of previous publications expendable.

3.1. Head and Neck

The radiosensitizing activity of curcumin on nasopharyngeal carcinoma cells was confirmed by Fan et al [28], both in vitro and in vivo models. The action mechanism is related to the microRNA-593 that leads to a reduced expression of the multidrug resistance gene 1 (MDR-1). Curcumin's efficiency is also established on the radiosensitization of esophageal squamous-cell carcinoma as demonstrated by Liu et al [29]. The analyses of cell cultures showed the inhibition of the NF- κ B signaling pathway as the main target of the substance. The positive results were also found in animal models. In 2018, Lv et al [30] published a broad review on the mechanisms of curcumin radiosensitization in esophageal cancer cells, gathering data that can be very useful for researchers in this field.

3.2. Cardiopulmonary System

The curcumin's low oral bioavailability issue has been constantly addressed. One of the methods developed to overcome this matter is the use of nanoparticles as curcumin carriers. Wen et al [31] has demonstrated the ability of these compounds on radiosensitizing pulmonary cancerous cells of the A549 lineage. The results were achieved both on cell cultures and on xenograft tumors. The essay is an important step in establishing mechanisms, efficient enough to be applied clinically. Working with the same cell line, originated from non small cell pulmonary tumor, Cai et al [32] showed the synergic effect of curcumin and cisplatin on neoplasm radiosensitization. The analysis indicates that the epidermal growth factor signaling pathway may be associated with this property. Curcumin was also capable of attenuating the cardiac damage secondary to radiation exposure in mice, as shown by Kolivand et al [33]. The substance was able to reduce the expression of IL-4, IL4Ra1, IL13Ra2, Duox1 and Duox2, as well as reducing the lymphocyte and macrophages infiltrate.

3.3. Genitourinary System

The medical application of curcumin has been limited due to the lack of clinical data that corroborates the experimental findings. In the last few years, it has been possible to watch an important shift on this scenario. Curcumin was able to reduce the oxidative status of patients undergoing prostate cancer treatment. It was achieved by enhancing the plasma total antioxidant capacity and lowering the superoxide dismutase activity. The result was obtained by Hejazi et al [34] on a double blind, randomized, placebo controlled study with 40 patients. Another essay, conducted with the same dynamics, evaluated the viability of using phytotherapies, including curcumin, on clinical trials with patients with biochemical recurrence of prostatic tumors. Although there were no significant differences on PSA level between the treated and placebo groups, the study was successful in showing the feasibility of this type of trial [35]. Curcumin has also failed in reducing prostatitis and cystitis of patients under radiotherapy for prostatic cancer. The use of oral nanocurcumin was initiated three days prior to treatment, and maintained through the whole cycle. Even though no benefits were achieved, this was one more step taken on the translation from laboratory essays for clinical applications [36].

Curcumin and other mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitors were evaluated as radiosensitizers on cervical cancer cell lines. Assad et al [37] demonstrated not only the efficacy of curcumin, but also its selectivity to tumoral cells. The result reinforces the extremely low toxicity property of this substance, as already shown.

The recurrence of ovary and uterus tumors is frequently reported. Tumoral radioresistance frequently limits the therapeutic possibilities in such cases. Favorable results in tumoral re-sensitization were obtained by Momtazi-Borojeni et al [38]. The various metabolic pathways in which curcumin could perform this action are already elucidated and were reported by the authors.

The inhibition of the NF- κ B signaling pathway was approached one more time by Li et al [39]. The essay demonstrated the radiosensitization capacity of curcumin on renal carcinoma cells. Radioresistance is an important barrier for the efficacy of treatments for this type of tumor. The results were obtained both on in vitro model and on xenograft tumor in mice.

3.4. Gastrointestinal System

Radiotherapy for gastrointestinal tumors, despite its efficiency, shows frequent side effects. An animal model essay performed by Verginadis et al [40] demonstrated that curcumin is able to reduce the inflammatory cytokine levels and local intestinal fibrosis in mice exposed to radiation.

The translation in clinical studies is also observed in this field. A randomized, double blind, phase II essay built by Gunther et al [41] evaluated the efficacy of curcumin in patients with locally advanced rectum tumors. No significant benefits were shown, but the authors were not able to achieve a definitive conclusion due to the considerable tissue bioavailability variation among patients. The absorption and bioavailability continue as key factors in the clinical application of curcumin. A number of ways to improve this matter have already been proposed. On colorectal tumors these attempts pass through the application of liposomes, micelles, polymeric nanoparticles, nanogels, cyclodextrin, lipid based nanoparticles and gold nanoparticles. The outcomes of these delivery mechanisms are positive, but a larger number of in vivo essays is necessary prior to the translation to clinical trials [42].

3.5. Radiotherapy Side Effects

On a large number of situations radiotherapy treatments are not limited by tumoral response, but rather by the deleterious effects in the health tissues induced by the procedures. For this reason, the development of radioprotective substances that minimize the damage of healthy tissues is mandatory.

Mucositis on the oral region is one of the most important side effects of head and neck cancer treatments. Curcumin shows beneficial effects on reducing mucositis, pain, erythema and ulcerated area, when applied to these patients, as reported on a review by Normando et al [43]. These results were confirmed by Delavarian et al [44]. In this essay only 32% of the patients treated with curcumin evolved with mucositis as radiotherapy side effect, while 100% of individuals were affected on the control group. A remarkable aspect was the diversity of administration routes among the trials. Curcumin was applied topically as a gel, as mouthwash and orally in nanomicelles, showing benefits on all routes. These trials succeeded not only on establishing other applications to turmeric, but also on expanding the possibilities of clinical uses.

Synthetic curcumin analogs also present favorable results on preventing intestinal mucosa damage in animal models. Fukuda et al [45] found positive outcomes upon using the compound GO-Y031, a curcumin like synthetic substance, in mice exposed to radiation. The search for this class of analogues is another possibility of compensating the low bioavailability frequently reported.

Another common side effect of radiotherapy is dermatitis. Opposing the results reported by Verma (2016) [27], Wolf et al [46] did not find benefits on the application of curcumin on breast cancer treatment. The essay included 686 patients, being the largest performed so far, and evaluated the improvement of dermatitis, pain, life quality and other symptoms in women under radiotherapy protocol. No statistical significance was achieved in any of the variables in comparison with the control group.

4. CONCLUSIONS

This review aims at raising the possibilities of applying curcumin as an adjuvant substance on radiotherapy treatments. A vast number of essays have been performed so far, evaluating the both the radiosensitizing and the radioprotective properties of the Turmeric active principle. There is multiple evidence for the beneficial effects of the substance, both on sensitizing

tumoral cells as on lowering the radiation damage of healthy tissues. Recent essays provide even more support for the use of curcumin on tumors of the nasopharynx, esophagus, lungs, heart, prostate, kidneys, cervix and intestines, among others. Radioprotective effects were established mainly for the prevention of mucositis of the gastrointestinal tract. Curcumin has shown positive laboratorial results for decades. However, the translation to clinical trials has faced barriers for years. A limiting factor, frequently reported, is the low bioavailability of the compound. Curcumin has a very low solubility in water, what leads to a low and sometimes erratic absorption. Recent studies have been seeking ways to surpass this blockage through the development of lipid substances and various nanocompounds, but it remains a broad field of research. This review demonstrated an important shift on curcumin essays, as a growing number of clinical trials are being published. The lack of clinical studies has been a point of concern in the last few years, as the laboratory results could not be corroborated on patients. Phase I and II trials have already been conducted, with beneficial results on the majority of them. At the present date 10 other studies relating curcumin and radiotherapy are registered on the “clinicaltrials.gov” database. The vast number of beneficial results already observed in the application of curcumin as an adjuvant in radiotherapy should encourage additional studies. The bioavailability of the substance is still one more issue to be addressed in future essays.

REFERENCES

1. B. B. Aggarwal, et. al. “Curcumin: The Indian solid gold,” *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **Vol. 595**, pp.1–75 (2007).
2. L. Zhang, et al. “Composition and bioactivity assessment of essential oils of *Curcuma longa* L. collected in China,” *Industrial Crops & Products*, **Vol. 109**, pp.60–73 (2017).
3. K. Priyadarsini, “The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent,” *Molecules*, **Vol. 19(12)**, pp.20091–20112 (2014).
4. P. Gul, J. Bakht, “Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry,” *J Food Sci Technol*, **November** (2013).
5. Y. Hu, et al, “Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*”, *Food Chemistry*, **Vol. 220**, pp.1–8 (2017).
6. H. A. Kazia, et al, “Pharmaceutical Formulation of Garlic and Turmeric Dried Crude Extract and Their Synergistic Antifungal Activity and Safety,” *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **Vol. 14(2)**, pp.75-82 (2018).
7. K. Uma, H. Xin, B. A. Kumar, “Antifungal Effect of Plant Extract and Essential Oil,” *Chin J Integr Med*, **April**, pp.1-7 (2014).
8. S. Qin, et al, “Efficacy and safety of turmeric and curcumin in lowering blood lipid levels in patients with cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials,” *Nutrition Journal*, pp.16:68 (2017).
9. M. Catanzaro, et al, “Immunomodulators Inspired by Nature: A Review on Curcumin and Echinacea,” *Molecules*, **Vol. 23**, pp.2778 (2018).

10. N. S. Jha, et al, "Antioxidant activity and electrochemical elucidation of the enigmatic redox behavior of curcumin and its structurally modified analogues," *Electrochimica Acta*, **Vol. 151**, pp.574–583 (2015).
11. J. Hejazi, et al, "Effect of Curcumin Supplementation During Radiotherapy on Oxidative Status of Patients with Prostate Cancer: A Double Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Study," *Nutrition and Cancer*, **Vol. 68(1)**, pp.77–85 (2016).
12. M. Shafiee, et al, "Current Status and Perspectives Regarding the Therapeutic Potential of Targeting EGFR Pathway by Curcumin in Lung Cancer," *Current Pharmaceutical Design*, **Vol. 23**, Number 13, pp.2002-2008 (2017).
13. K. Wang, et al, "Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death," *Scientific Reports*, **Vol. 6(1)**, (2016).
14. J. Falke, et al, "Curcumin as Treatment for Bladder Cancer: A Preclinical Study of Cyclodextrin-Curcumin Complex and BCG as Intravesical Treatment in an Orthotopic Bladder Cancer Rat Model," *BioMed Research International*, **June**, pp.1–7 (2018).
15. J. Seo, et al, "Curcumin induces apoptosis by inhibiting sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase activity in ovarian cancer cells," *Cancer Letters*, **Vol. 371(1)**, pp.30–37 (2016).
16. A. B. Kunnumakkara, et al, "Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways" *Clin. Sci.*, **Vol. 131**, pp.1781–1799, (2017).
17. F. Di Pierro, et al, "Potential role of bioavailable curcumin in weight loss and omental adipose tissue decrease: preliminary data of a randomized, controlled trial in overweight people with metabolic syndrome: Preliminary study," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **Vol. 19**, pp.4195-4202 (2015).
18. K.Y. Chin, "The spice for joint inflammation: anti-inflammatory role of curcumin in treating osteoarthritis," *Drug Design, Development and Therapy*, **Vol. 10**, pp.3029–3042 (2016).
19. S. Hewlings, D. Kalman, "Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health," *Foods*, **Vol. 6(10)**, pp.1–11 (2017).
20. B. Kocaadam, N. Şanlıer, "Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 57 n.13, pp.2889-2895 (2017).
21. *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro, Brazil (2017).
22. H. Wang, et al, "Cancer Radiosensitizers," *Trends in Pharmacological Sciences*, **Vol. 39**, Issue 1, pp.24-48 (2018).
23. P. Maier, et al, "Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization," *International Journal of Molecular Sciences*, **Vol. 17(1)**, n. 102, pp. 1–32 (2016).
24. S. V. Gudkov, N. R. Popova, V. I. Bruskov. "Radioprotective substances: History, trends and prospects," *Biophysics*, **Vol. 60(4)**, pp.659–667 (2015).
25. A. Goel, B. B. Aggarwal. "Curcumin, the Golden Spice From Indian Saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs," *Nutrition and Cancer*, **Vol. 62**, pp.919–930 (2010).
26. G. C. Jagetia. "Radioprotection And Radiosensitization By Curcumin," In: *The Molecular Targets And Therapeutic Uses Of Curcumin In Health And Disease. Advances In Experimental Medicine And Biology*, **Vol 595**, Springer, Boston, USA (2007).
27. V. Verma. "Relationship and interactions of curcumin with radiation therapy," *World Journal of Clinical Oncology*, **Vol. 7(3)**, p.275–283 (2016).
28. H. Fan, et al. "MiR-593 mediates curcumin-induced radiosensitization of nasopharyngeal carcinoma cells via MDR1," *Oncology Letters*, **Vol. 11(6)**, pp.3729–3734 (2016).

29. G. Liu, Y. Wang, M. Li. "Curcumin sensitized the antitumour effects of irradiation in promoting apoptosis of oesophageal squamous-cell carcinoma through NF- κ B signalling pathway," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **June**, pp.1–9, (2018).
30. S. Lv, X. He, Y. An. "Progress of curcumin on esophageal cancer radiotherapy sensitization," *Cancer Cell Research*, **Vol. 19**, pp.471–476 (2018).
31. C. Wen, et al. "Enhanced Radiosensitization Effect of Curcumin Delivered by PVP-PCL Nanoparticle in Lung Cancer," *Journal of Nanomaterials*, **Vol. 2017**, pp.1–8 (2017).
32. Y. Cai, Z. Sheng, S. Liang. "Radiosensitization effects of curcumin plus cisplatin on non-small cell lung cancer A549 cells," *Oncology Letters*, **Vol. 18**, pp.529–534 (2019).
33. S. Kolivand, et al. "Evaluating the Radioprotective Effect of Curcumin on Rat's Heart Tissues," *Curr Radiopharm*, **Vol. 12, n. 1**, pp.23–28 (2019).
34. J. Hejazi, et al. "Effect of Curcumin Supplementation During Radiotherapy on Oxidative Status of Patients with Prostate Cancer: A Double Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Study," *Nutrition and Cancer*, **Vol. 68, n.1**, pp.77–85 (2016).
35. M. D. Van Die, et al. "A Placebo-Controlled Double-Blinded Randomized Pilot Study of Combination Phytotherapy in Biochemically Recurrent Prostate Cancer," *The Prostate*, **Vol. 77, n.7**, pp.765–775 (2017).
36. Saadipoor, A., et al. "Randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial of nanocurcumin in prostate cancer patients undergoing radiotherapy," *Phytotherapy Research*, **Vol. 33, n. 2**, pp.1-9 (2018).
37. D. X. Assad, et al. "Additive cytotoxic effects of radiation and mTOR inhibitors in a cervical cancer cell line," *Pathology - Research and Practice*, **Vol. 214, n. 2**, pp.259–262 (2017).
38. A. A. Momtazi-Borojeni, et al. "Curcumin in Advancing Treatment for Gynecological Cancers with Developed Drug- and Radiotherapy-Associated Resistance," *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **Vol. 176**, pp.107–129 (2019).
39. G. Li, et al. "Curcumin enhances the radiosensitivity of renal cancer cells by suppressing NF- κ B signaling pathway," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **Vol. 94**, pp.974–981 (2017).
40. I. I. Verginadis, et al. "A Novel Mouse Model to Study Image-Guided, Radiation-Induced Intestinal Injury and Preclinical Screening of Radioprotectors," *Cancer Research*, **Vol. 77, n. 4**, pp.908–917 (2016).
41. J. R. Gunther, et al. "A Phase 2 Randomized Double Blinded Study Evaluating the Efficacy of Curcumin With Pre-Operative Chemoradiation for Rectal Cancer," *Proceedings of the American Radium Society 99th Annual Meeting*, Colorado Springs, CO, USA, 6-9 May, Vol. 98, pp.1-46 (2017).
42. K. E. Wong, et al. "Curcumin Nanoformulations for Colorectal Cancer: A Review," *Front. Pharmacol.* **Vol. 10, n. 152**, pp.1–17 (2019).
43. A. G. C. Normando, et al. "Effects of turmeric and curcumin on oral mucositis: A systematic review," *Phytother Res.* **Vol. 33, n. 5**, pp.1318–1329 (2019).
44. Z. Delavarian, et al. "Oral administration of nanomicelle curcumin in the prevention of radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancers," *Special Care in Dentistry*, **Vol. 39, n. 2**, pp. 166–172 (2019).
45. K. Fukuda, et al. "A diarylpentanoid curcumin analog exhibits improved radioprotective potential in the intestinal mucosa," *International Journal of Radiation Biology*, **Vol. 92, n. 7**, pp.388–394 (2016).
46. J. R. Wolf, et al. "Oral curcumin for radiation dermatitis: a URCC NCORP study of 686 breast cancer patients," *Support Care Cancer*, **Vol. 26, n. 5**, pp.1543-1552 (2018).

ANEXO B – Artigo: A curcumina e a piperina na modulação de citocinas e seu papel na radioterapia – uma revisão

A CURCUMINA E A PIPERINA NA MODULAÇÃO DE CITOCINAS E SEU PAPEL NA RADIOTERAPIA – UMA REVISÃO

1. INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos, produtos de origem natural com propriedades farmacológicas, recebem cada vez mais atenção mundialmente, apresentando uma ampla gama de efeitos terapêuticos, custo geralmente favorável, quando comparados com medicamentos alopáticos, assim como um bom perfil de segurança, uma vez que geralmente também são utilizados como alimentos [1]. A *Curcuma longa*, referenciada como Cúrcuma ou Turmérico, espécie vegetal que apresenta como princípio ativo a Curcumina (CUR), e a *Piper nigrum*, popularmente conhecida como Pimenta-Preta, tendo a Piperina (PIP) como princípio ativo, são dois fitoterápicos utilizados há milênios, inicialmente nas culturas do Sudeste Asiático, já sendo amplamente difundidos em todos os continentes. Os dois nutracêuticos apresentam baixíssimo perfil de toxicidade, baixo custo final, amplo perfil de eficácia e emprego em vários campos da medicina [2].

As citocinas são alguns dos principais sinalizadores celulares, tendo papel fundamental na resposta inflamatória e imunológica. São amplamente usadas como marcadores dessas classes de respostas orgânicas. Esse emprego é observado em estudos de adequabilidade de tratamentos de radioterapia, uma vez que essa modalidade terapêutica induz respostas inflamatórias importantes.

As propriedades radioprotetoras e radiosensibilizantes da CUR e da PIP já são estudadas há décadas. Uma vez que alguns dos principais mecanismos de ação dessas substâncias envolvem propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, a avaliação da atividade desses fitoterápicos através da monitorização da supressão ou estimulação de citocinas apresenta ampla aplicabilidade. O presente trabalho busca levantar a bibliografia disponível sobre o emprego das citocinas como marcadores da resposta orgânica à radiação, assim como marcadores da efetividade da CUR e PIP como radioprotetores ou radiosensibilizadores em procedimentos de radioterapia.

2. AS CITOCINAS E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA

As citocinas são um grupo heterogêneo de glicoproteínas importantes na sinalização imunológica, sendo produzidas por diversos tipos celulares. São peptídeos de ~5-30 kDa que não atravessam a bicamada lipídica celular, sendo internalizadas a partir de receptores de membrana. Essas moléculas são responsáveis por sincronizar as respostas do sistema imunológico tanto em duração quanto em intensidade. Seus efeitos podem ocorrer na própria célula produtora, conhecido como efeito autócrino; em células vizinhas, dito efeito parácrino, ou em células de tecidos distantes, sendo esse o efeito endócrino, semelhante ao dos hormônios. Algumas das citocinas podem produzir efeitos tanto pró, quanto anti-inflamatórios, de acordo com o estímulo recebido, no entanto, a maior parte das substâncias da família das citocinas inflamatórias apresenta efeitos somente em um dos extremos, com suas concentrações plasmáticas variando muito durante o curso de uma doença ou processo inflamatório [3].

2.1. Classificação das citocinas

Não existe atualmente um sistema de classificação unificado para as citocinas, sendo aceitável sua divisão em Interleucinas, Fatores de Necrose Tumoral (TNF – Tumoral Necrosis Factors), Interferons e Adipocinas.

2.1.1. Interferons e Adipocinas

As citocinas dos tipos Interferons e Adipocinas, diferentemente dos demais grupos, são pouco empregadas em estudos radioterapêuticos. As primeiras estão principalmente relacionadas à resposta imunológica contra infecções virais. Foi demonstrado, no entanto, que os Interferons podem ter papel na resposta a estímulos provocados por bactérias, compostos de baixo peso molecular e alguns antígenos. Além disso, observa-se que tratamentos com Interferons associados à quimioterapia podem ampliar a atividade antitumoral [4].

Já as Adipocinas são entendidas como o grupo de fatores secretados pelo tecido adiposo. Suas funções ainda não são completamente compreendidas, sendo de grande importância sua ação pró inflamatória, associada a grande parte dos efeitos deletérios relacionados com a obesidade e adiposidade central, principalmente na elevação do risco cardiovascular e na síndrome metabólica [5].

2.1.2. Interleucinas

As Interleucinas são um amplo grupo de proteínas imunomoduladoras podendo atuar no crescimento, diferenciação e ativação celulares. Alguns elementos desse grupo, como as IL-1, IL-2, IL-6, IL-9, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 e IL-20, estão mais frequentemente relacionados à ampliação da resposta imunológica, sendo consideradas como pró-inflamatórias na maior parte dos contextos. Um outro grupo, composto pelas IL-3, IL-7, IL-9 e IL-11, está mais frequentemente relacionado à maturação celular. As interleucinas IL-4, IL-5 e IL-6 atuam nos processos imunológicos em infecções parasitárias, assim como nos processos alérgicos. Já as IL-2, IL-10, IL-13 e IL-19 apresentam conhecida ação imunomoduladora, com os três últimos exemplares sendo imunossupressores [6].

2.1.3. Fatores de necrose tumoral

Dentro da família dos Fatores de Necrose Tumoral, temos o TNF- α como membro mais referenciado. O fator é uma proteína transmembrana, que pode funcionar tanto como uma proteína integrada à membrana, quanto como uma citocina solúvel no meio, após ser clivado de sua posição original. Uma vez liberado da membrana, o TNF- α se liga a seu receptor, o TNFR1, ativando várias vias de transdução de sinal. A ativação dessas vias pode levar à fosforilação do I κ B, ativando o NF- κ B e induzindo vários mediadores inflamatórios. Nos casos de comprometimento celular, em que as vias de ativação e proteção mediadas pelo NF- κ B estejam comprometidas, o TNF- α ativa a proteína Caspase 8 iniciando o processo de apoptose celular [7]. Apesar de ter papel fundamental na resposta inflamatória de defesa do organismo, a atividade desregulada do TNF- α está associada a diversas doenças autoimunes, sendo as terapias de inibição do fator um importante campo de estudos científicos [8].

2.2. O Papel do Fator de Transcrição NF- κ B e do Inibidor I κ B

No contexto das Ciências das Radiações, a relação entre o fator de transcrição (TF), denominado Fator Nuclear κ B (NF- κ B), e a produção de algumas citocinas, demonstra especial importância. Fatores de transcrição são proteínas que iniciam ou estimulam o aumento da transcrição de determinados genes do DNA para o RNA mensageiro, se ligando a uma sequência de DNA específica. Assim conseguem “ligar” ou “desligar” um gene determinado. O NF- κ B pode ser ativado por uma grande variedade de estímulos e pode controlar diversos genes e respostas biológicas, estando envolvido em várias doenças humanas. Por este motivo, o NF- κ B é alvo de diversas drogas anti-inflamatórias e anticâncer [9]. O NF- κ B fica localizado

no citoplasma celular, como um dímero protéico, ligado a um inibidor denominado I κ B. Várias substâncias como a IL-1, TNF- α , lipopolissacárides e, em alguns casos, o peróxido de hidrogênio produzido por estresse oxidativo, podem ativar enzimas que fosforilam o I κ B, ativando assim o NF- κ B, que se desloca para o núcleo onde se liga aos genes alvo [10].

Alguns dos genes regulados pelo NF- κ B são responsáveis pela transcrição de diversas citocinas, como a IL-2, IL-6, IL-8, IL12, TNF- α , entre outras. A ativação de citocinas pró-inflamatórias potentes, como a IL-6 e o TNF- α , faz com que o bloqueio desse fator de transcrição seja amplamente pesquisado, tanto visando o manejo de doenças inflamatórias diretamente, quanto no controle de respostas inflamatórias iniciadas por agressões exógenas, como exposição à radiação ionizante, por exemplo [9]. Cabe esclarecer, no entanto, que proteínas da família NF- κ B são essenciais para o desenvolvimento de vários tecidos e na proteção de células contra a apoptose. Seu papel na patogênese de diversas morbidades está ligado à sua ativação anormal, observada no contexto de doenças genéticas, infecções virais, proliferação celular desregulada e inflamações [11].

Uma vez ativados pelo Fator Nuclear κ B, ou por outras vias imunológicas, os vários tipos de citocinas passam a desempenhar seus papéis locais ou sistêmicos.

3. O PAPEL DAS CITOCINAS NA CANCEROLOGIA E RADIOTERAPIA

O uso de citocinas como marcadores na evolução do tratamento de neoplasias já é feito há décadas. A literatura apresenta ensaios estabelecendo a relação entre tipos de neoplasias e citocinas específicas, os mecanismos de modulação destas, assim como sua relação com o tratamento de vários tipos de câncer.

3.1. IL-6 e IL-10 plasmático e Linfoma de Hodgkin

Um exemplo da aplicação das interleucinas na cancerologia pode ser observado na estreita relação em os níveis de IL-6 e IL-10 no plasma de pacientes com Linfoma de Hodgkin. Os níveis dessas interleucinas se apresentam muito elevados nos indivíduos diagnosticados com a doença, apresentando um declínio e quase normalização após o tratamento com quimioterapia convencional. Somado a isso, níveis muito elevados de IL-6 pré-tratamento podem estar relacionados à maior ocorrência de falha terapêutica [12].

3.2. Expressão de Interleucinas pós procedimentos de radioterapia

Os procedimentos de radioterapia estão historicamente relacionados à imunossupressão. Tal constatação foi baseada em estudos de irradiação de corpo inteiro (TBI - Total body irradiation), que levavam à redução dos níveis de linfócitos, ante à grande radiosensibilidade da medula óssea, onde estão as células progenitoras destas linhagens. No entanto, enquanto a irradiação de corpo inteiro pode ser considerada “imunossupressora”, procedimentos focais, empregados no tratamento de tumores sólidos, causam alterações no microambiente tumoral, levando a uma ativação de múltiplas células do sistema imune, que podem suprimir ou mesmo estimular o crescimento tumoral. A maior parte dos processos de ativação dos fatores pró-inflamatórios é iniciada com a ativação da via de dano do DNA (DNA damage pathway). Os danos ao DNA causados pela radiação levam à ativação de uma enzima de correção denominada ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). A ATM, por sua vez, ativa os fatores de transcrição p53 e NF- κ B, que promovem uma resposta imune pró-inflamatória com a expressão de interleucinas, TNF- α , quimiocinas, entre outros [13].

3.3. IL-6, IL-10 e TNF preditores dos efeitos deletérios da radioterapia

As citocinas do tipo IL e TNF são importantes marcadores da resposta orgânica às radiações ionizantes em diversos contextos. Elevações precoces nos níveis de IL-6 e IL-10 em pacientes submetidos a procedimentos de radioterapia torácica são preditores independentes de complicações por pneumonite [14]. A ativação do conjunto de interleucinas pró-inflamatórias, assim como as elevações nos biomarcadores que indicam atividade dessas interleucinas, podem estar associadas à sintomas de fadiga observados em pacientes submetidos a radioterapia para neoplasias de mama e próstata [15].

Ainda considerando as neoplasias prostáticas, os níveis plasmáticos de IL-6, assim como de seu receptor solúvel IL-6sR (IL-6 “s” *soluble* “R” *Receptor*) estão associados tanto com a progressão dos tumores quanto com a presença de metástases. Shariat et al (2001) observaram que os níveis dos marcadores se elevam dramaticamente em pacientes com metástases prostáticas ósseas, sendo também preditores de progressão bioquímica das neoplasias após cirurgias de prostatectomia total, provavelmente sendo indicadores de doença metastática oculta pré-cirurgia [16].

3.4. Elevação da IL-6 no microambiente tumoral

A desregulação da secreção de citocinas pelas neoplasias é notória, sendo a IL-6 um dos principais marcadores do microambiente tumoral, apresentando níveis elevados em praticamente todos os cânceres. Essa elevação reflete o potencial inflamatório dos tumores, trazendo ainda um outro desafio, uma vez que os níveis elevados da própria IL-6 conferem proteção às células cancerosas, dificultando os danos em seu DNA, aumentando sua resistência ao estresse oxidativo e à apoptose radioinduzida. Com isso, a associação dos tratamentos oncológicos convencionais com o bloqueio ou inibição da IL-6 pode ser uma estratégia terapêutica promissora [17].

3.5. Paradoxo da IL-6

O papel da IL-6, no entanto, pode, por vezes, parecer paradoxal. A supressão de células hematopoiéticas pós radioterapia é um efeito adverso potencialmente grave, uma vez que expõe o organismo a infecções oportunistas. Nesse contexto, já foi relatado o potencial da IL-6 no aumento da velocidade de regeneração das linhagens de células sanguíneas após procedimentos de radioterapia [18]. Com isso observa-se o grau de complexidade das respostas clínicas às citocinas, podendo ser benéficas ou deletérias, dependendo do contexto e emprego analisados.

3.6. Potencial das IL-2 e IL-12 na radioterapia

Não só as IL-6 e IL-10 apresentam interesse científico para as ciências das radiações. Foi demonstrado que a associação de IL-2 e IL-12 pode potencializar os efeitos da radioterapia. Estudo em camundongos com carcinoma de células escamosas em cabeça e pescoço, demonstrou que a terapia com os genes da IL-2 e IL-12 gerou uma resposta imune potente com aumento dos efeitos antitumorais da radioterapia, elevação da infiltração linfocitária e da necrose tumoral, quando comparado com a monoterapia [19].

O potencial da associação entre a IL-2 e a radioterapia também foi observada em humanos. Estudo de fase 1 constatou que a combinação da radioterapia estereotáctica e de corpo inteiro com a aplicação de IL-2 pode ser mais eficaz que as terapias atuais no tratamento de melanoma metastático e no carcinoma de células renais, duas das neoplasias de pior prognóstico e com maiores restrições de tratamento [20].

3.7. Correlação da IL-8 com o prognóstico em radioterapia de pulmão

Os níveis séricos de IL-8 estão associados com a taxa de sobrevivência de pacientes com câncer de pulmão submetidos à radioterapia. Crohns et al (2010) demonstraram que níveis séricos de IL-8 mais elevados pré-radioterapia estão associados a piores respostas ao tratamento. Constataram ainda que os níveis de IL-6 no lavado bronco-alveolar aumentaram após o procedimento, indicando a resposta inflamatória local, mas sem repercussões no desfecho terapêutico [21].

3.8. Interleucinas e mucosite

A resposta inflamatória local pode ter repercussões muito negativas durante os tratamentos radioterapêuticos, como, por exemplo, na mucosite induzida por radiação. Nesse contexto, a presença de interleucinas anti-inflamatórias pode ser benéfica, como demonstrado por Sonis et al (2000). O estudo demonstrou o potencial da IL-11 na modulação da mucosite aguda induzida pela radiação em modelo animal, através da atenuação da expressão de citocinas pró inflamatórias [22].

Como demonstrado, o papel das citocinas tanto na resposta aos tratamentos radioterapêuticos, quanto na limitação das reações adversas a essas intervenções, é um vasto campo de pesquisas.

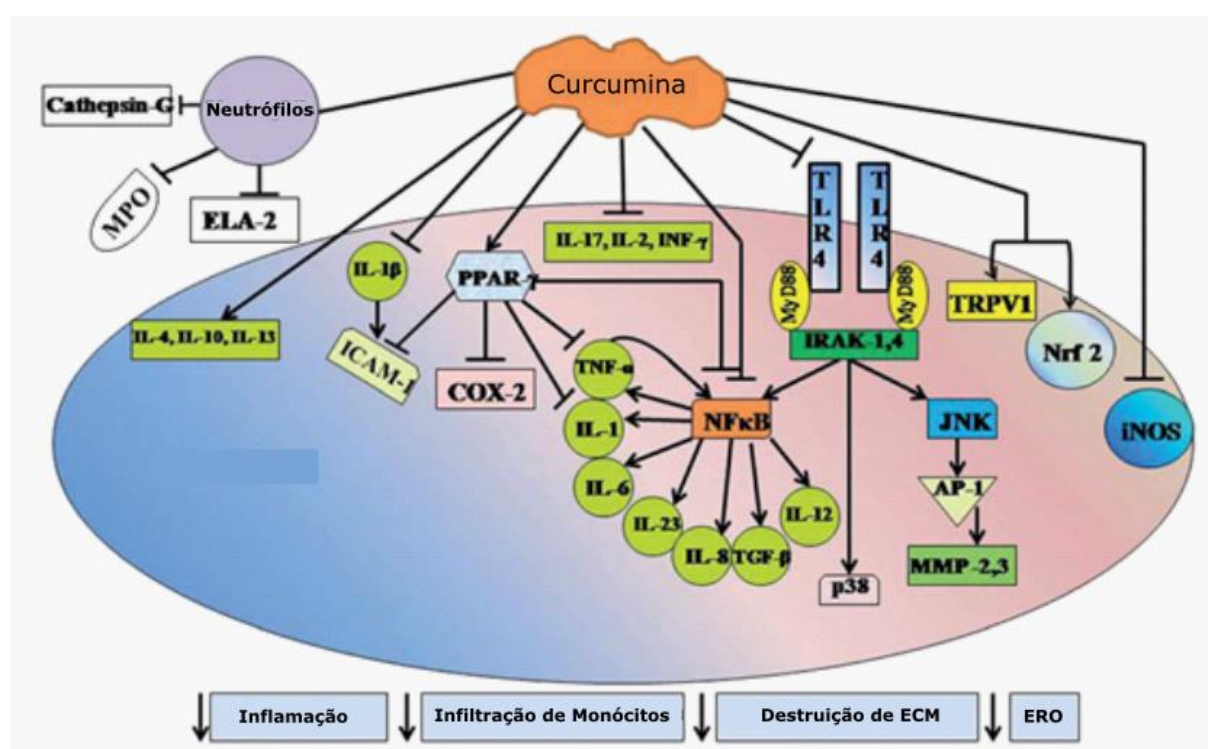
4. FITOTERÁPICOS COMO AGENTES MODULADORES DE CITOCINAS

A modulação da produção de citocinas pode ser feita por diversos patógenos exógenos, por substâncias endógenas nas doenças autoimunes, pela aplicação de proteínas sintéticas, ou mesmo pelo uso de fitoterápicos. A elucidação dos mecanismos de ação dos fitoterápicos na modulação das citocinas pode trazer à luz a melhor forma de emprego desses nutracêuticos. As citocinas podem ser usadas então como biomarcadores, avaliando, por exemplo, a resposta imune do microambiente tumoral, após o emprego de um fitoterápico radiosensibilizador ou radioprotetor em coadjuvância com a radioterapia.

4.1. Efeitos da Curcumina na expressão de citocinas

A Curcumina (CUR) apresenta um perfil de segurança muito favorável, não apresentando toxicidade em humanos, mesmo em consumo diário contínuo de 8 g/dia [23]. Esse composto tem sido investigado como antioxidante, hepatoprotetor, anti-inflamatório, anticarcinogênico, e antimicrobial, sendo empregado ainda em doenças cardiovasculares e gastrointestinais [24]. Uma revisão publicada por este grupo de pesquisa demonstrou um apanhado das propriedades radioprotetoras e radiosensibilizadoras da CUR [25]. Os principais alvos moleculares modulados pela Curcumina podem ser observados na Figura 1.

Figura 1: Alvos moleculares modulados pela Curcumina.



Fonte: Baliga et al, 2012 [26] (Adaptada).

4.1.1. A Curcumina como imunomodulador

A CUR é um potente agente imunomodulador, com potencial de ação estabelecido para vários tipos celulares. Provavelmente através da inativação do fator de transcrição NF-κB, a CUR é capaz de reduzir a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, assim como algumas quimiocinas [27]. O bloqueio da ativação do NF-κB pela CUR é obtida mesmo quando a expressão do fator de transcrição é estimulada por várias

substâncias, como ésteres, peróxido de hidrogênio e pelo próprio TNF- α . A CUR tem uma ação inibitória tão potente que é capaz de sobrepujar a ação desses vários ativadores [28].

4.1.2. A Curcumina reduz o stress oxidativo celular

A CUR é capaz de reduzir o status oxidativo celular, inibir enzimas promotoras da inflamação, suprimir a atividade da óxido nítrico sintase (iNOX), da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e da lipoxigenase (LOX), sendo eficaz ainda na inibição a secreção de IL-6 e IL-8 induzidas pelo TNF α , além da inibição direta dessas interleucinas, como já descrito [29].

4.1.3. A Curcumina em ação na regulação de IL-6 e IL-1 na COVID-19

A COVID-19, morbidade que tem assolado todo o mundo na atual pandemia de 2019-2021, tem demonstrado potencial de causar sérias complicações, algumas dessas relacionadas à tempestade de citocinas observada nos quadros mais graves. Foi demonstrado que a CUR, administrada em pacientes infectados pelo SARS-COV-2, foi capaz de reduzir a expressão de IL-6 e IL-1, não demonstrando efeitos sobre os níveis de TNF- α e IL-18 [30].

4.1.4. A Curcumina na redução da IL-1, IL-4 e VEGF na obesidade

Além das doenças infecciosas, a obesidade também tem sido utilizada como modelo de inflamação sistêmica, ante a capacidade do tecido adiposo em produzir agentes pró-inflamatórios como as adipocinas, estimulando direta ou indiretamente a secreção de outras citocinas. Essa inflamação crônica sistêmica é apontada como um dos grandes fatores deletérios da obesidade. Em um ensaio randomizado com 30 indivíduos, a CUR demonstrou capacidade de reduzir os níveis séricos de IL-1, IL-4 e de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-2, IL-6, IL-8 e IL-10 [31].

4.1.5. Curcumina inibindo TNF- α , IL-6, IL-8, TGF β induzidos por irradiação torácica

Os benefícios do fitoterápico também foram demonstrados na prevenção da pneumonite induzida pela radiação, um importante fator limitante na radioterapia torácica. A CUR foi capaz de inibir o fator de transcrição NF- κ B em camundongos, inibindo fatores inflamatórios como TNF- α , IL-6, IL-8, TGF β induzidos por irradiação torácica. Os resultados indicam que a CUR pode mitigar a pneumonite induzida por radiação, reduzindo a fibrose pulmonar [32].

4.1.6. CUR na inibição do TNF- α e COX-2 inibindo NF κ B na radiação

O potencial na redução da fibrose e inflamação pulmonar induzidas pela radiação foi novamente demonstrada em ratos por Cho et al (2013), que relatou a eficácia da CUR na inibição do TNF- α e COX-2 inibindo ainda o NF- κ B, como já previamente demonstrado [33]. A inibição desse fator de transcrição provavelmente apresenta mais benefícios que apenas a redução do status inflamatório de indivíduos expostos à radiação. A CUR, através do mesmo mecanismo, levou à supressão dos genes dos fatores de necrose tumoral em células de neuroblastoma humano, o que aumentou a apoptose celular induzida pela radiação, demonstrando que as propriedades radiosensibilizantes da CUR provavelmente também ocorrem pela modulação de citocinas [34].

4.2. Efeitos da Piperina na expressão de citocinas

Assim como observado para a Curcumina, o potencial da Piperina na ativação do sistema imunológico e, principalmente, sua capacidade na modulação da expressão de citocinas já foram demonstrados em vários estudos.

4.2.1. A PIP com via de ação no NF κ B indução da IL-1B e inibição da IL-6

A PIP é um potente anti-inflamatório e antioxidante, sendo que a inibição da expressão do fator de transcrição NF- κ B também parece ser uma de suas principais vias de atuação, assim como observado para a CUR [36,37,38]. Essa, no entanto, não é a única via de ação do fitoterápico, uma vez que a PIP inibe a expressão de IL-6 induzida pela IL-1 β , de forma dose dependente, aparentemente através da supressão da via de sinalização p38 MAPK, conforme demonstrado em estudo realizado com células de câncer de estômago [39].

4.2.2. PIP reduz ação de citocinas pró-inflamatórias IL-1B IL-6 TNF α GMCSF

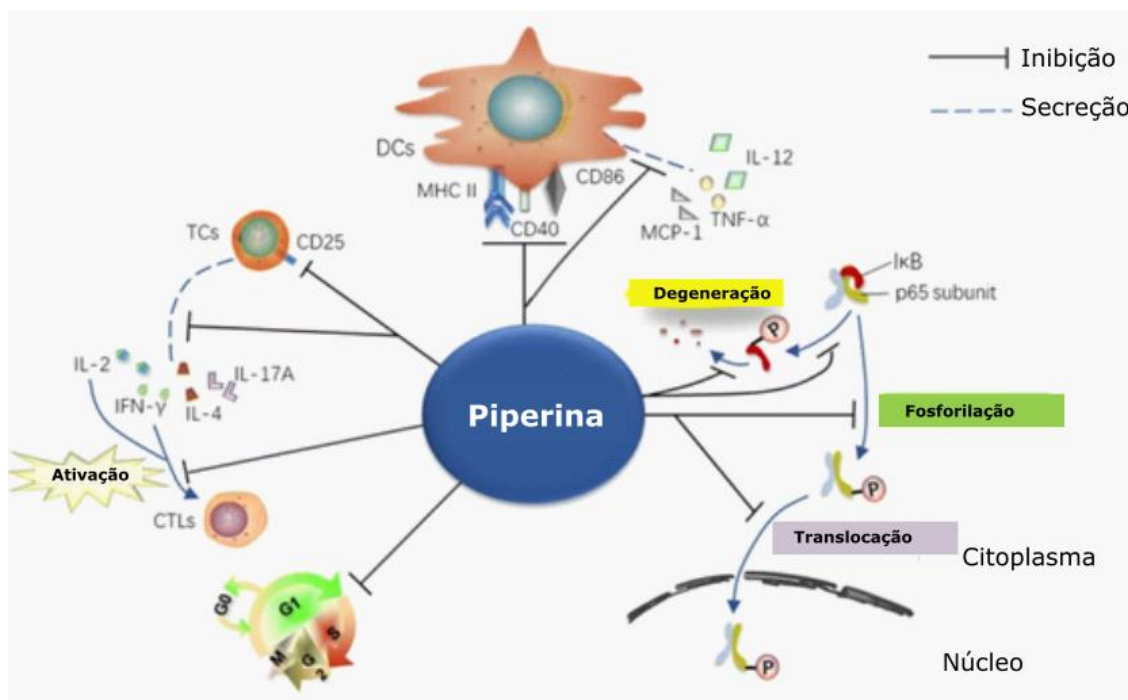
Sabe-se ainda que a PIP é capaz de reduzir a expressão de das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF α e GM-CSF (Fator estimulador de colônias granulócitos-macrófagos), tanto através da inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B, quanto pela inibição da transcrição dos genes das citocinas diretamente, como constatado em experimento realizado com células de melanoma [38]. O mesmo achado foi obtido quando a PIP foi empregada em linhagem celular do tipo BV2 de micróglia. A inibição da expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi mais uma vez constatada, demonstrando tanto o potencial da PIP no tratamento de doenças neurodegenerativas, como em outras aplicações que envolvam o status inflamatório

[40]. Apesar de uma ação anti-inflamatória bem estabelecida, os mecanismos de ação da PIP talvez não sejam tão simples e diretos, ou nem mesmo únicos. Quando administrada conjuntamente com lipopolissacarídeo (LPS), um potente estimulador de resposta inflamatória, a PIP foi capaz de inibir a expressão de $TNF\alpha$, não tendo, no entanto, nenhuma ação sobre a produção de $IL-1\beta$ e $IL-6$, potencial que já havia sido confirmado por outros grupos em modelos experimentais distintos [41](BAE et al., 2010)(BAE et al., 2010)(BAE et al., 2010)(BAE et al., 2010)(BAE et al., 2010)(BAE et al., 2010)(BAE et al., 2010)(BAE et al., 2010)(BAE et al., 2010).

4.2.3. *A PIP como depurador de radicais livres*

O potencial da PIP na inibição de citocinas pró-inflamatórias também já foi demonstrada no contexto das ciências das radiações. A substância é capaz de agir como um potente depurador de radicais livres, prevenindo os efeitos danosos dos raios gama, quando empregados na irradiação em modelo animal. A administração da PIP em ratos limitou a elevação de $IL-1$, $IL-6$ e $TNF\alpha$, após irradiação com 12Gy de raios gama, propiciando o controle da resposta inflamatória e a preservação do tecido pulmonar das cobaias [42]. Alguns dos processos de sinalização modulados pela PIP podem ser observados na Figura 2.

Figura 2: Processos de sinalização de citocinas pela piperina.



Fonte: Yang et al, 2019 [35] (Adaptada).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial de imunomodulação da CUR já está bem estabelecido, assim como seu papel na ativação de diversas citocinas. Com isso, a avaliação da expressão de algumas interleucinas e do TNF- α , pode ser um importante marcador da atividade da CUR em novos contextos, como em sua aplicação na radioterapia para redução dos efeitos deletérios no tecido sadio e na intensificação dos efeitos radio tóxicos tumorais.

Os achados já obtidos no emprego das citocinas como marcadores da bioatividade da PIP, demonstram, mais uma vez, que essa diversa e complexa classe de substâncias pode ser empregada na proposta de ensaios combinados com radiação.

O potencial de sinergia entre a CUR e PIP pode ser observado não somente pela avaliação direta da resposta celular à irradiação *in vitro*, mas também através de modulação da resposta inflamatória radio induzida *in vivo* com a maior ou menor expressão de citocinas.

REFERÊNCIAS

1. CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
2. ZHENG, J., et al. Spices for prevention and treatment of cancers. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 1-35, 2016.
3. KASSAB, C., et al. Immunomodulatory Methods. In: LONSER, R., SARTINORANONT, M., BANKIEWICZ, K. **Nervous System Drug Delivery: Principles and Practice**. Elsevier, 2019, p. 297-334.
4. STANTON, G. J., et al. Interferon review. **Investigative Radiology**, v. 22, n. 3, p. 259-273, 1987.
5. OUCHI, N., et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, 2011.
6. VARELLA, P. P. V, FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, p. 146-154, 2001.
7. BALKWILL, F. TNF- α in promotion and progression of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 409-416, 2006.
8. PALLADINO, M. A., et al. Anti-TNF- α therapies: The next generation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 9, p. 736-746, 2003.
9. BALDWIN, A. S. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 1, p. 3-6, 2001.
10. VAN DEN BERG, R., et al. Transcription factor NF- κ B as a potential biomarker for oxidative stress. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. S1, p. 121-127, 2001.
11. AGGARWAL, B. B., et al. Nuclear transcription factor NF-kappa B: Role in biology and medicine. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n. 4, p. 341-353, 2004.

12. GAIOLLA, R. D., et al. Serum levels of interleukins 6, 10, and 13 before and after treatment of classic Hodgkin lymphoma. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 135, n. 4, p. 483-489, 2011.
13. SHIAO, S. L., COUSSENS, L. M. The tumor-immune microenvironment and response to radiation therapy. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 4, p. 411-421, 2010.
14. ARPIN, D., PEROL, D., et al. Early variations of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels during thoracic radiotherapy are predictive for radiation pneumonitis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 34, p. 8748-8756, 2005.
15. BOWER, J. E., et al. Inflammatory biomarkers and fatigue during radiation therapy for breast and prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 17, p. 5534-5540, 2009.
16. SHARIAT, S. F., et al. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. **Urology**, v. 58, n. 6, p. 1008-1015, 2001.
17. KUMARI, N., et al. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. **Tumor Biology**, v. 37, n. 9, p. 11553-11572, 2016.
18. PATCHEN, M. L., et al. Administration of interleukin-6 stimulates multilineage hematopoiesis and accelerates recovery from radiation-induced hematopoietic depression. **Blood**, v. 77, n. 3, p. 472-480, 1991.
19. XIAN, J., et al. Combination nonviral murine interleukin 2 and interleukin 12 gene therapy and radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 131, n. 12, p. 1079-1085, 2005.
20. SEUNG, S. K., et al. Phase 1 study of stereotactic body radiotherapy and interleukin-2: Tumor and immunological responses. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 137, p. 1-8, 2012.
21. CROHNS, M., et al. Cytokines in bronchoalveolar lavage fluid and serum of lung cancer patients during radiotherapy - Association of interleukin-8 and VEGF with survival. **Cytokine**, v. 50, n. 1, p. 30-36, 2010.
22. SONIS, S. T., et al. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncology**, v. 36, n. 4, p. 373-381, 2000.
23. CHENG, A. L. et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**, v. 21, n. 4 B, p. 2895-2900, 2001.
24. RAVINDRAM, P. N., BABU, K. N., SIVARAMAN, K. **Turmeric – The genus Curcuma**. Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles, Book 45. 1. ed. Boca Raton: Editora CRC, 2007.
25. COSTA, I.T., CAMPOS, T.R. Prospects of the application of curcumin in radiation therapy. In: INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE, 2019, Santos. **Proceedings of the International Nuclear Atlantic Conference 2019**. Santos, v.51, n.6, 2019.
26. BALIGA, M. S., et al. Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations. **Food & Function**, v.3, n.11, p. 1109-1117, 2012.
27. JAGETIA, G. C., AGGARWAL, B. B. Spicing up of the immune system by curcumin. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 1, p. 19-35, 2007.
28. SINGH, S., AGGARWAL, B. B. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferulolylmethane). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24995-25000, 1995.
29. SHEHZAD, A., REHMAN, G., LEE, Y. S. Curcumin in inflammatory diseases. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p. 69-77, 2013.

30. VALIZADEH, H., et al. Nano-curcumin therapy, a promising method in modulating inflammatory cytokines in COVID-19 patients. **International Immunopharmacology**, v. 89, p. 1-12, 2020.
31. ESMAILY, H., et al. An investigation of the effects of Curcumin on serum cytokines in obese individuals: A randomized controlled trial. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 5, p. 1-6, 2014.
32. SHI, H., et al. A systemic administration of liposomal curcumin inhibits radiation pneumonitis and sensitizes lung carcinoma to radiation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2601-2611, 2012.
33. CHO, Y. J., et al. Curcumin attenuates radiation-induced inflammation and fibrosis in rat lungs. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 17, n. 4, p. 267-274, 2013.
34. ARAVINDAN, N., et al. Curcumin inhibits NF- κ B mediated radioprotection and modulate apoptosis related genes in human neuroblastoma cells. **Cancer Biology and Therapy**, v. 7, n. 4, p. 569-576, 2008.
35. YANG, J. Y., ZHANG, J. ZHOU, G. Black pepper and its bioactive constituent piperine: promising therapeutic strategies for oral lichen planus. **Inflammopharmacol**, v.27, p. 5-13, 2019.
36. AZAB, S., et al. Beneficial Effects of Piperine in global cerebral ischemia/reperfusion model in irradiated rats. **Egyptian Journal of Radiation Sciences and Applications**, v. 30, n. 1, p. 161-170, 2017.
37. KUMAR, S., et al. Piperine inhibits TNF- α induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF- κ B and I κ B kinase activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 575, n. 1-3, p. 177-186, 2007.
38. PRADEEP, C. R., KUTTAN, G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor- κ B (NF- κ B), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. **International Immunopharmacology**, v. 4, n.14, p. 1795-1803, 2004
39. XIA, Y., et al. Piperine inhibits IL-1 β -induced IL-6 expression by suppressing p38 MAPK and STAT3 activation in gastric cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 398, n. 1-2, p. 147-156, 2015.
40. WANG-SHENG, C., et al. Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 44-48, 2017.
41. BAE, G. S., et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. **European Journal of Pharmacology**, v. 642, n. 1-3, p. 154-162, 2010.
42. ELKADY, A. A., TAWFIK, S. S. Anti-inflammatory role of piperine against rat lung tissue damage induced by gamma-rays. **International Journal of Radiation Research**, v. 16, n. 1, p. 75-84, 2018.