

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

KELLY GOULART LIMA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO NO TRATAMENTO DE
CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HEPG2**

Porto Alegre
2014

KELLY GOULART LIMA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO NO TRATAMENTO DE
CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HEPG2**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre
2014

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas”

Steve Jobs

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a toda minha família que sempre me incentivaram e motivaram na busca dos meus objetivos.

Ao meu orientador e co-orientadora que me ensinaram muito e são meus grandes exemplos de excelentes professores e pesquisadores.

Aos meus colegas, Gabriele Krause, Aline Schuster, Anderson Catarina, Bruno Basso, Fernanda Mesquita, Leonardo Pedrazza, Bianca Andrade, Gabriela Viegas e Eduardo Caberlon, que foram imprescindíveis para a realização desse trabalho, pois me ensinaram e ajudaram em várias etapas do estudo.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular que se tornaram grandes amigos e foram grandes incentivadores e motivadores, em especial a mestranda Giselle Funchal.

À Doutoranda Elisa Marczak que ajudou muito na realização e análise dos experimentos de citometria de fluxo.

À Farmacêutica Cristiane Giuriatti pelo auxílio referente aos quimioterápicos, sempre com grande boa vontade.

À Mestranda Bianca Abreu, que nos orientou sobre a manipulação e manutenção das células HepG2.

RESUMO

O Carcinoma Hepatocelular é o tumor hepático primário mais prevalente e está entre as dez principais neoplasias que afetam a população mundial. O seu desenvolvimento está relacionado, na maioria das vezes, a uma lesão hepática crônica, como ocorre na cirrose. As terapias consideradas curativas atualmente são somente a ressecção cirúrgica, o transplante e a ablação percutânea, ainda com possibilidade de recidiva. Nesse contexto, a busca por novas alternativas terapêuticas para a doença torna-se um campo de pesquisa em expansão. O conhecimento sobre a correlação entre a inflamação crônica e câncer tem impulsionado novas pesquisas com agentes anti-inflamatórios que apresentem potencial para o desenvolvimento de drogas antitumorais. O ácido gálico é um polifenol encontrado em vários produtos naturais, o qual tem apresentado atividade anti-inflamatória, antitumoral, antimutagênica e forte ação antioxidante. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do ácido gálico sobre a proliferação celular e parâmetros inflamatórios das células de carcinoma hepático (HepG2), assim como investigar os mecanismos envolvidos. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico MTT e contagem celular por exclusão com Azul de Trypan. Os resultados mostraram que o ácido gálico reduziu a proliferação celular de maneira dose e tempo dependente, sem causar necrose (ensaio LDH). Observamos indução significativa da apoptose através do ensaio PE Annexin V and 7-AAD e nenhuma interferência no ciclo celular utilizando o kit FITC BrdU Flow. Os níveis de mediadores inflamatórios foram medidos utilizando o kit Cytometric Bead Array Human Inflammation. Observamos redução significativa nos níveis da interleucina 8 (pró-inflamatória e relacionada à angiogênese, invasividade e metástases), aumento dos níveis de interleucina 10 (anti-inflamatória e relacionada à morte celular programada) e aumento dos níveis de interleucina 12 (antiangiogênica e antimetastática). Nós também avaliamos os níveis de TGF β por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e não observamos diferenças significativas. A partir desses resultados, acreditamos que o ácido gálico tem forte potencial como agente antitumoral.

Palavras-chave: Ácido gálico. Células HepG2. Carcinoma Hepatocelular.

ABSTRACT

Hepatocellular Carcinoma is the most prevalent primary liver tumor and is among the top ten cancers that affect the world population. Its development is related, in most cases, the existence of chronic liver injury, such as occurs in cirrhosis. Current curative therapies are only surgical resection, transplantation and percutaneous ablation, however with the possibility of recurrence. In this context, the search for new therapies for the disease becomes an interesting field for research. The knowledge about the correlation between chronic inflammation and cancer has driven new researches with anti-inflammatory agents that have potential for the development of antitumor drugs. Gallic acid is a polyphenol found in many natural products and have shown anti-inflammatory activity, anti-tumor, antimutagenic and strong antioxidant action. The purpose of this study was to investigate the effect of gallic acid on cell proliferation and inflammatory parameters of liver carcinoma cells (HepG2), as well as to investigated the mechanisms involved. Cell viability was evaluated through MTT colorimetric assay and Trypan blue exclusion. Results showed that the gallic acid decreased proliferation of HepG2 cells in a dose and time dependent manner, without causing necrosis (LDH assay). We observed significant induction of apoptosis by PE Annexin V and 7-AAD assay and no interference with the cell cycle using the FITC BrdU Flow Kit. The levels of inflammatory mediators were measured by Cytometric Bead Array Human Inflammation Assay and observed a significant reduction in the levels of interleukin-8 (pro-inflammatory and related to angiogenesis, invasiveness and metastasis) and increased levels of interleukin-10 (anti-inflammatory and related to the induction of programmed cell death) and interleukin-12 (antiangiogenic and antimetastatic). We also evaluated the levels of TGF by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and no significant differences. According to these results, we believe that gallic acid has a strong potential as an anti-tumor agent.

Key-words: Gallic acid. HepG2 cells. Hepatocellular Carcinoma.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM17 – Domínio 17 da Desintegrina e Metaloproteinase

AG – Ácido gálico

AP-1 – Proteína ativadora 1

ATCC – American Type Culture Collection

CHC – Carcinoma Hepatocelular

COX-2 – Ciclooxigenase 2

DANEs – Drogas anti-inflamatórias não esteroidais

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

HPV – Papiloma Vírus Humano

IFN- α – Interferon alfa

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-11 – Interleucina 11

IL-12p70 – Interleucina 12p70

IL-15 – Interleucina 15

IL-17 – Interleucina 17

IL-23 – Interleucina 23

NF- $\kappa\beta$ – Fator nuclear $\kappa\beta$

OMS – Organização Mundial da Saúde

PGE2 – Prostaglandina E2

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

STAT3 – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TNM – Tumor, Linfonodos e Metástases

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 HEPATOCARCINOMA.....	9
1.2 INFLAMAÇÃO E FORMAÇÃO DE TUMORES.....	13
1.3 INOVAÇÕES NA TERAPIA ANTINEOPLÁSICA.....	15
1.4 ÁCIDO GÁLICO.....	16
1.5 LINHAGEM CELULAR HEPG2.....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
CAPÍTULO 2 – Artigo Científico.....	22
CAPÍTULO 3 – Considerações Finais.....	47
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO A – Carta de submissão <i>European Journal of Cancer</i>.....	56

Capítulo 1

Introdução

Justificativa

Objetivos

1. INTRODUÇÃO

1.1 HEPATOCARCINOMA

Os tumores malignos que atingem o tecido hepático são classificados, de modo geral, em primários (originados no próprio fígado) ou secundários (originados em outros órgãos e desenvolvidos através de metástases). O Hepatocarcinoma, também denominado de Carcinoma Hepatocelular (CHC), é o tumor hepático primário mais prevalente, constituindo 90% desses tumores. Outros tipos mais raros de tumores hepáticos incluem o Colangiocarcinoma (acomete os ductos biliares), o Angiossarcoma (câncer raro que se origina dos vasos sanguíneos) e o Hepatoblastoma (câncer raro que atinge os recém-nascidos e crianças nos primeiros anos de vida)¹.

As neoplasias de um modo geral, assim como o CHC, são consideradas um problema de saúde pública, pois apresentam alto custo de tratamento, estão entre as dez principais causas de morte no mundo e podem apresentar poucas chances de cura quando diagnosticadas tardiamente. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer está em terceiro lugar como causa de morte nos países de maior renda, segundo última publicação referente ao ano de 2008². No Brasil, corresponde ao segundo lugar, sendo causa de 15,57% das mortes ocorridas em 2008, conforme os últimos dados publicados pelo Ministério da Saúde³.

Se pesquisarmos os tipos de neoplasias que afetam a população mundial, o Carcinoma Hepatocelular está entre os dez principais. Nos últimos anos, a incidência da doença ainda aumentou, principalmente nos países ocidentais, como Estados Unidos e Canadá. A infecção pelo vírus da Hepatite C tem sido um fator importante atribuído a essa tendência. Ao mesmo tempo, os custos com a saúde neste setor também aumentaram, demonstrando a necessidade de desenvolvimento de novas terapias mais acessíveis⁴.

O CHC surge geralmente na meia-idade, com maior incidência em homens. O diagnóstico ocorre geralmente em estágio avançado, o que reduz as chances de terapias curativas, como a ressecção cirúrgica, o transplante e a ablação percutânea (aplicação precisa de energia geradora de calor ou frio no interior da lesão)⁵. Além disso, esse tumor é considerado muito letal, pois somente 7% dos pacientes

diagnosticados tem sobrevida de 5 anos e raros casos sintomáticos tem sobrevida maior do que um ano⁶.

O desenvolvimento do CHC está relacionado, na maioria das vezes, a uma lesão hepática crônica, como ocorre na cirrose (caracterizada pela fibrose progressiva e a reorganização da microarquitetura vascular). No processo cirrótico, há uma inflamação crônica que associada à susceptibilidade genética contribui para o processo da tumorigênese¹, o que explica porque a cirrose está presente em 80% a 90% dos pacientes com Hepatocarcinoma⁷. A existência de algumas doenças de base, como Doença hepática alcoólica, Hepatites virais (B e C), Cirrose criptogênica, doenças biliares e Hemocromatose primária são algumas das principais causas desse tumor⁸. Outro fator de risco é o consumo de alimentos contaminados com a aflatoxina (toxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus* geralmente contaminante de grãos e cereais armazenados inadequadamente)¹.

O processo de Hepatocarcinogênese está relacionado a múltiplas alterações nos hepatócitos e no microambiente tecidual. A etapa inicial é um estímulo externo que leva a mudanças genéticas nos hepatócitos ou células tronco, causando proliferação, apoptose, displasia e neoplasia. Esse estímulo inicial na maioria das vezes é provocado pelo HBV (vírus da Hepatite B) ou HCV (vírus da Hepatite C). O primeiro induz instabilidade cromossômica e várias mutações que podem ativar vários oncogenes^{9; 10}. O segundo leva ao desenvolvimento do Hepatocarcinoma através da indução da apoptose ou proliferação celular ao interagir com o p53, ou ao aumentar o nível de transcrição do gene Wnt-1, que apresenta possível mecanismo anti-apoptótico^{11; 12}.

Dentre os vários tipos de terapias contra o câncer, as terapias tradicionais são a ressecção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia, sendo esta última a modalidade mais amplamente empregada. As terapias podem ser utilizadas isoladamente ou em associação¹³. Apesar das distintas opções de tratamento, a terapia do câncer apresenta grande dificuldade de manejo, principalmente devido à baixa especificidade de alguns fármacos e a estreita janela terapêutica, as quais estão intimamente relacionadas à toxicidade. Dessa forma, é evidente a necessidade do desenvolvimento de novas terapias mais específicas¹⁴.

A escolha do tratamento adequado do CHC depende do estadiamento do tumor, o qual também é muito importante para determinar o prognóstico do paciente.

Entre as várias classificações disponíveis para estadiamento do câncer, a classificação TNM (tumor primário, linfonodos regionais, metástases), publicada pela União Internacional contra o Câncer, é uma das mais utilizadas¹⁵. Essa classificação tem por objetivo determinar a extensão da doença e tem por base a avaliação da extensão do tumor primário, a existência de metástases nos linfonodos regionais e/ou em órgãos distantes. Essas informações sobre o tumor são obtidas a partir do exame físico, exames de imagem e/ou exploração cirúrgica¹⁶.

A Tabela 1 apresenta as definições da classificação TNM¹⁷.

Tabela 1 – Classificação TNM

T – Tumor Primário

TX: O tumor primário não pode ser avaliado

T0: Não há evidência de tumor primário

Tis: Carcinoma in situ

T1, T2, T3 e T4: Tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário

N – Linfonodos Regionais

NX: Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

NO: Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1, N2, N3: Comprometimento crescente dos linfonodos regionais

M – Metástase à distância

MX: A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0: Ausência de metástase à distância

M1: Metástase à distância

Fonte: Sobin (2002)¹⁷.

Conforme mostrado na tabela 1, a avaliação dos linfonodos e metástases em órgãos distantes é muito importante para determinar a extensão do tumor antes de iniciar a terapia. No estágio inicial, no qual o tumor está localizado somente no fígado e não há metástases, a cirurgia de ressecção do tumor ou o transplante hepático é geralmente recomendado. Outras terapias como a embolização, a ablação percutânea (destruição das células tumorais por calor ou frio) e injeção com etanol têm sido utilizadas principalmente de forma paliativa. Estudos randomizados,

que compararam essas opções terapêuticas mostram que, com relação à sobrevida total, a ablação percutânea apresenta semelhança à ressecção cirúrgica e é considerada superior à injeção percutânea de etanol⁴.

A tabela TNM é útil para classificar o Hepatocarcinoma em estágios e direcionar a terapia adequada.

- Estágio I (tumor único sem metástases).
- Estágio II (tumor único com invasão vascular ou múltiplos tumores menores que 5cm).
- Estágio IIIA (Múltiplos tumores com mais de 5cm).
- Estágio IIIB (Múltiplos tumores com ou sem envolvimento da veia porta ou veia hepática).
- Estágio IIIC (Tumor com invasão direta de órgãos adjacentes).
- Estágio IVA (Metástase em linfonodo regional).
- Estágio IVB (Metástase distante).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, pacientes em estágio I e II são beneficiados pela ressecção cirúrgica associada à quimioterapia ou à quimioembolização (aplicação de microesferas que bloqueiam vasos sanguíneos que chegam ao tumor e liberaram quimioterápico no local da lesão de forma lenta). Já os pacientes em estágio III e IV, devem receber quimioterapia e após serem reavaliados sobre a possibilidade de ressecção cirúrgica. No caso de impossibilidade de retirada do tumor, as outras opções são: criocirurgia, injeção intratumoral de álcool, quimioembolização transarterial e terapia por radiação¹⁸.

Nos últimos anos têm sido realizadas inúmeras pesquisas com o objetivo de descobrir novos agentes antitumorais direcionados para alvos moleculares específicos¹⁹. Um dos quimioterápicos pertencentes a essa nova classe de medicamentos é o sorafenib, o qual foi aprovado como terapia sistêmica padrão do CHC em estágio avançado após estudos de fase III publicados em 2008²⁰. Seu mecanismo está relacionado à inibição das vias Raf kinase e via intracelular do VEGFR (receptor do fator de crescimento endotelial vascular). Como resultado da inibição dessas vias, esse quimioterápico suprime a proliferação das células tumorais e a angiogênese^{21; 22}.

1.2 INFLAMAÇÃO E FORMAÇÃO DE TUMORES

Existem várias evidências de que a inflamação apresenta um papel duplo em relação ao câncer, podendo apresentar efeito pró ou antitumoral. A inflamação crônica atua de forma pró-tumoral quando perdura por longo período. Isso pode ocorrer por falha na erradicação de um patógeno ou após exposição contínua a uma substância carcinogênica. Já, o efeito antineoplásico deve-se ao processo de imunovigilância, no qual células do sistema imune, como as células T citotóxicas destroem células tumorais²³.

A ação anticâncer do sistema imune infelizmente não persiste por muito tempo, pois conforme a teoria “Immunoediting”, após a primeira fase (eliminação) em que algumas populações de células tumorais são destruídas, segue-se a fase em que as células sobreviventes começam a desenvolver habilidades para escapar da imunovigilância. Na terceira e última fase, as células neoplásicas já possuem capacidade de evitar completamente os efeitos do sistema imune, resultando na proliferação descontrolada e progressão tumoral²⁴.

Vários tipos de tumores são reconhecidamente desenvolvidos após infecções virais. Em alguns casos o próprio vírus tem potencial oncogênico, como o Papiloma Vírus Humano (HPV) associado ao câncer cervical uterino. Em outros casos, como no Hepatocarcinoma, a infecção causada pelo vírus da Hepatite B ou C leva a uma reação imunológica excessiva do hospedeiro (mediada por inflamação). Além disso, há evidências de que quanto mais tempo persiste a inflamação em determinado órgão, maior será o risco de desenvolver neoplasia, como ocorre na relação entre a doença inflamatória intestinal e o câncer colorretal²⁵.

O mecanismo envolvido na indução da carcinogênese, a partir de uma inflamação crônica está relacionado à ação de vários mediadores inflamatórios, como as citocinas, os radicais livres, as prostaglandinas e os fatores de crescimento, os quais podem induzir alterações na homeostase celular, resultando no desenvolvimento e progressão do câncer. Um dos mecanismos mais importantes é a instabilidade genômica causada pela inflamação. A ativação de leucócitos, principalmente macrófagos e granulócitos, leva à síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (ERN) que podem provocar dano ao DNA, levando a possíveis mutações. As lesões por radicais livres também podem ser causadas por

uma enzima pró-inflamatória, a ciclooxigenase 2 (COX-2), a qual leva à produção de altos níveis de peróxidos no interior das células²⁶. A COX-2 é responsável pela produção de prostaglandinas, as quais podem aumentar a produção de tumores. Dessa forma, a elevação da COX 2 é frequentemente citada em uma variedade de tumores localizados em células epiteliais de estroma²⁷.

Além da produção aumentada dos radicais livres pelo processo inflamatório, outras situações podem alterar o meio ambiente celular e promover câncer:

- a. O aumento de citocinas inflamatórias pode aumentar o sinal proliferativo, que por sua vez pode potencialmente aumentar o número de células com risco de sofrerem mutação.
- b. Produtos da inflamação podem alterar eventos celulares e provocar expressão gênica inapropriada.
- c. Alterações em genes supressores de tumor e de células T regulatórias que podem contribuir para o bloqueio antitumoral da célula.

Os mediadores inflamatórios também participam da regulação do microambiente tumoral, no qual estão presentes células do sistema imune e células tumorais. Nesse contexto, podem atuar citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-6, IL-11, IL-15, IL-17, IL-23, TNF- α e IL-8) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13), TGF- β e IFN- α). Além disso, alguns fatores de transcrição também atuam como reguladores do microambiente são eles: NF- κ B (Fator nuclear κ B), STAT3 (Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) e AP-1 (Proteína Ativadora 1). O NF- κ B e STAT3 estão expressos na maioria dos tumores, pois ativam genes responsáveis pela sobrevivência celular, proliferação, angiogênese, invasividade e a produção de citocinas²⁸.

Além destes fatores, recentemente foi descoberto que tumores provocados por células-tronco mostram estrita relação com citocinas inflamatórias. A Interleucina 6 (IL-6) possui um papel preponderante no câncer de mama por sustentar a sobrevivência e a capacidade proliferativa das células-tronco. Outra citocina que tem sido alvo de vários estudos sobre o câncer é a interleucina 12. As suas principais atividades são: aumento da produção de interferon gama (envolvido na resposta natural do hospedeiro contra o tumor), estímulo do crescimento e citotoxicidade de células “natural killers”, linfócitos T CD4 e CD8 e ação antiangiogênica²⁹.

1.3 INOVAÇÕES NA TERAPIA ANTINEOPLÁSICA

A imunoprevenção e a imunoterapia pertencem a um novo campo de estudos contra o câncer. Por haver uma correlação estrita entre câncer e inflamação, terapias que diminuem a inflamação antes da imunização podem aumentar a eficácia da imunoterapia.

Estudos em humanos e em animais têm mostrado que drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DANEs) são quimioprotetoras para o câncer de cólon e adenoma^{27; 30}. Drogas que seletivamente inibem a COX 2, incluindo DANEs, estão sendo usadas em estudos para tratamento de câncer, avaliando o efeito da COX 2 sobre o desenvolvimento de câncer de mama e câncer colorretal³¹. Também tem sido observado que pessoas que fazem uso corrente de DANEs têm baixo risco de desenvolverem câncer. Terapêuticas que administraram células dendríticas pulsadas *in vitro* com a proteína de choque térmico Hsp 70, na presença de inibidor da COX 2, reduziram significativamente a progressão de melanoma em camundongos e aumentaram a sobrevivência através da indução de interferon gama³².

Apesar de não haver evidências em estudos de imunização, antagonistas do fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa) representam uma boa opção para potencializar vacinas contra o câncer. Antagonistas TNF (etanercept, infliximab, adalimumab) que foram licenciados para estudos epidemiológicos para Artrite Reumatóide e Doença de Crohn têm demonstrado várias ações que podem ser úteis para terapia contra o câncer, porque eles podem diminuir a produção de citocinas, reduzir a angiogênese, prevenir a infiltração de leucócitos e melhorar as funções da medula óssea. Atualmente, muitos inibidores da produção de TNF alfa têm sido usados no tratamento do câncer, incluindo numerosos produtos originados de frutas, vegetais e de plantas medicinais. Dentre os produtos naturais que podem ter impacto na imunização contra o câncer, destaca-se a vitamina E (tocoferol), que possui dois mecanismos distintos: efeito direto sobre as células e ação indireta através de suas propriedades anti-inflamatórias, principalmente relacionada com redução da produção de PGE 2³³.

Um recente estudo mostrou que tocotrienóis (da família da vitamina E) apresentam um efeito anti-inflamatório mais potente que alfa tocoferol por afetar a produção de IL-6, óxido nítrico e reduzir a liberação de PGE. A suplementação *in*

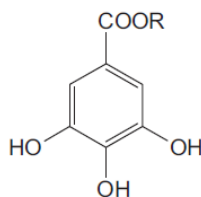
vivo de tocoferol mostrou contribuir com a imunorregulação, produção de anticorpos e resistência à implantação do tumor. Como os tocoferóis, os tocotrienóis são potentes antioxidantes³⁴.

Os flavonóides extraídos de plantas e seus derivados também tem atraído a atenção de vários pesquisadores, visto que estudos têm demonstrado seu efeito antitumoral, antialérgico, antioxidante e antiviral^{35; 36}.

1.4 ÁCIDO GÁLICO

O flavonóide ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) é um polifenol encontrado em chás, uvas, vinho tinto, castanha entre outros produtos naturais³⁷ e pode ser obtido a partir da hidrólise ácida de taninos³⁸. A solubilidade do ácido gálico em água é de 12g/L a 20°C. Vários derivados do ácido gálico (AG) já foram sintetizados com o objetivo de melhorar suas características físico-químicas, alterando especialmente sua lipofilicidade. Esses polifenóis derivados apresentam diferença somente no número de carbonos da cadeia lateral do ácido gálico. A estrutura do AG e os valores dos coeficientes de partição são apresentados na tabela 2³⁸.

Tabela 2 – Estruturas Químicas e Valores do Coeficiente de Partição (C log P) do Ácido gálico e derivados



Abreviação	Gallatos	-R	C log P
AG	Ácido gálico	-H	0,89
G1	Metil	-CH ₃	0,92
G2	Etil	-(CH ₂)-CH ₃	1,27
G3	Propil	-(CH ₂) ₂ -CH ₃	1,73
G4	Butil	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	2,13
G5	Pentil	-(CH ₂) ₄ -CH ₃	2,53
G6	Hexil	-(CH ₂) ₅ -CH ₃	2,92
G7	Heptil	-(CH ₂) ₆ -CH ₃	2,32
G8	Octil	-(CH ₂) ₇ -CH ₃	3,72

Continuação

Abreviação	Gallatos	-R	C log P
G10	Decil	-(CH ₂) ₉ -CH ₃	4,51
G11	Undecil	-(CH ₂) ₁₀ -CH ₃	4,90
G12	Docecil	-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃	5,30
G14	Tetradecil	-(CH ₂) ₁₃ -CH ₃	6,09
G16	Hexadecil	-(CH ₂) ₁₅ -CH ₃	6,89
G18	Octadecil	-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	7,68

Fonte: Locatelli et al. (2013)³⁸

Vários estudos demonstram que o AG apresenta forte ação antioxidante³⁹, antiinflamatória⁴⁰, antimutagênica⁴¹ e antitumoral³⁸. Com relação à atividade antitumoral, o ácido gálico tem demonstrado também atividade citotóxica seletiva, afetando principalmente células tumorais e não as linhagens celulares normais^{42; 43}. Alguns derivados do AG têm demonstrado efeitos ainda mais potentes que o seu precursor, provavelmente por apresentarem uma maior permeabilidade às membranas plasmáticas⁴⁴.

Um estudo que avaliou a atividade do ácido gálico em linhagem de células de câncer de próstata demonstrou que sua ação antitumoral está relacionada à indução da apoptose dependente da formação de espécies reativas de oxigênio, as quais seriam produzidas a partir da auto-oxidação do AG nessa linhagem celular. Essa pesquisa demonstrou que o AG leva a perda do potencial de membrana mitocondrial, liberação do citocromo c e ativação de caspases 3, 8 e 9⁴⁵.

O AG demonstrou também aumentar os níveis de Ca²⁺ intracelular, o qual está envolvido na produção de espécies reativas de oxigênio. Isuzugawa e colaboradores pesquisaram o efeito do AG e derivados em linhagem celular de leucemia pró-mielocítica e observaram que o AG aumenta o Ca²⁺ intracelular, induzindo indiretamente as células tumorais à apoptose. Além disso, demonstraram que a modulação do Ca²⁺ intracelular parece ativar a Caspase 3, a qual altera a permeabilidade da membrana mitocondrial, levando a apoptose pela via intrínseca⁴⁶.

O efeito antitumoral do AG também parece estar relacionado à inibição da atividade da ciclooxigenase 1 e 2. Essa enzima tem sido considerada pró-tumoral por induzir a divisão celular e inibir a apoptose⁴⁷. Outra pesquisa avaliou o efeito antineoplásico do AG em linhagem celular de glioma e verificou que o tratamento inibiu a proliferação celular de maneira dose e tempo dependente. Além disso,

também diminuiu a invasividade, por suprimir a enzima ADAM17, inativando as vias de sinalização PI3K/Akt e Ras/MAPK (superativadas em vários tumores, levando a proliferação descontrolada e inibição da apoptose)⁴⁸.

Recente revisão mostrou que a atividade antitumoral do ácido gálico está envolvida com múltiplos alvos moleculares, os quais algumas vezes diferem quando avaliadas linhagens tumorais distintas. Esse polifenol tem mostrado inibir vários genes relacionados ao ciclo celular, a produção de metástases, à angiogênese e apoptose. Além disso, foi demonstrada sua atividade inibitória ao fator de transcrição NF- κ B, sobre a via de sinalização Akt e a enzima ciclooxigenase 2. Outros efeitos observados foram a ativação da via de sinalização ATM kinase (responsável por fosforilar várias proteínas relacionadas a parada do ciclo celular) e a depleção da enzima antioxidante GSH (glutathiona reduzida)⁴⁹. A figura 1 representa o efeito do ácido gálico em várias vias de sinalização envolvidas na oncogênese.

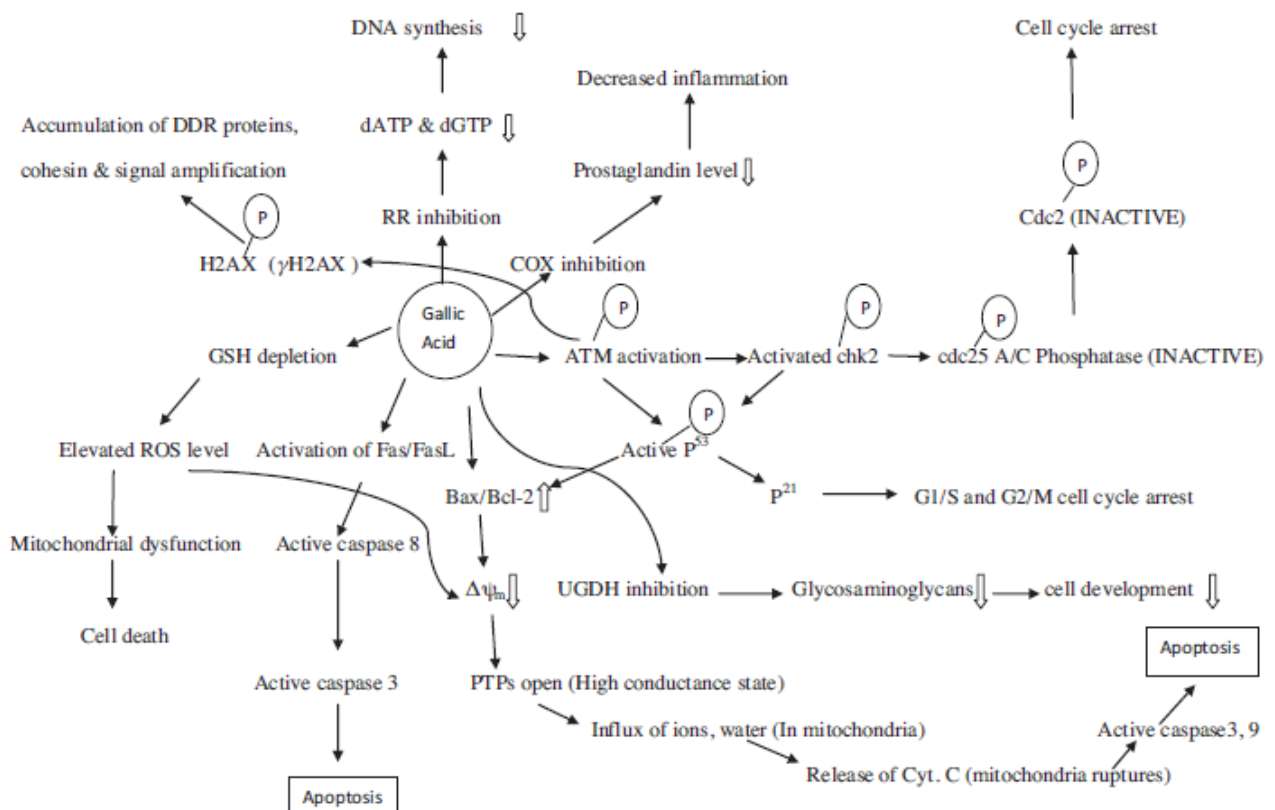


Figura 1 – Efeito do Ácido gálico nas vias de sinalização celular. Verma (2013)⁴⁹.

O Ácido Gálico foi utilizado no tratamento de Hepatocarcinoma experimental, utilizando um modelo *in vitro* de cultivo celular da linhagem HepG2.

1.5 LINHAGEM CELULAR HEPG2

A linhagem celular HepG2, derivada inicialmente de um hepatoblastoma humano, foi introduzida em estudos científicos em 1979. Desde então, foi utilizada em várias pesquisas como modelo de células hepáticas, visto que possui morfologia e funções metabólicas semelhantes às células do parênquima hepático⁵⁰.

Segundo dados do protocolo da linhagem celular HepG2, comercializada pela American Type Culture Collection (ATCC), a linhagem é derivada de carcinoma hepatocelular, apresenta morfologia epitelial, crescimento aderente e não é tumorigênica em camundongos imunossuprimidos. Dessa maneira, essa linhagem é utilizada apenas em estudos “in vitro”, não sendo recomendado para estudos “in vivo” com o objetivo de desenvolver tumores em animais. Os produtos celulares dessa linhagem são: alfa-fetoproteína, albumina, alfa-2-macroglobulina, alfa-1-antitripsina, transferrina, alfa-1-antiquimotripsina, hepatoglobina, ceruloplasmina, plasminogênio, complemento C4, ativador C3, fibrinogênio, alfa-1-ácido glicoproteína, alfa-2-HS-glicoproteína, beta lipoproteína e retinol ligado à proteína⁵¹.

2 JUSTIFICATIVA

As dificuldades apresentadas na terapia antineoplásica tradicional, como a resistência de células neoplásicas, alta toxicidade e consequentes efeitos adversos têm impulsionado as pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias antineoplásicas¹³. Ao mesmo tempo, tem aumentado o interesse na utilização de componentes obtidos de plantas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos⁵². Nesse contexto, vários componentes obtidos de produtos naturais têm sido testados quanto ao seu possível efeito antitumoral em modelos *in vitro* e *in vivo*, incluindo estudos com Hepatocarcinoma.

A busca de novas alternativas terapêuticas para esse tumor hepático apresenta grande relevância, pois os tratamentos disponíveis atualmente são em sua maioria paliativos, exceto a ressecção cirúrgica, o transplante e a ablação percutânea (terapias curativas), que ainda sim podem ser aplicadas somente quando o tumor está no estágio inicial.

Vários estudos têm utilizado o ácido gálico e derivados para avaliar atividade antitumoral em diversas linhagens celulares⁴⁹ e em animais³⁸. Porém, o efeito sobre a linhagem celular de Hepatocarcinoma (HepG2) tem sido pouco investigado e seu mecanismo de ação não está claro. A partir do conhecimento do potencial efeito como agente terapêutico na prevenção e tratamento de outros tumores, sua baixa toxicidade em células normais, boa tolerância e baixo custo, foi utilizado o ácido gálico nesse estudo para tratamento de Hepatocarcinoma (HepG2).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do ácido gálico sobre a proliferação celular e parâmetros inflamatórios das células de carcinoma hepático (HepG2).

3.2 Específicos

- Verificar se o Ácido gálico possui efeito na proliferação celular da linhagem celular HepG2;
- Avaliar se o ácido gálico induz as células HepG2 à apoptose (Anexina V-PE/7AAD);
- Avaliar se o ácido gálico causa alterações morfológicas nas células HepG2;
- Verificar se o Ácido gálico interfere no ciclo celular da linhagem celular HepG2;
- Verificar se o Ácido gálico modifica a expressão de citocinas envolvidas no processo inflamatório (TGF β , IL-8, IL-6, IL-10, IL-12p70) da linhagem celular HepG2.

Capítulo 2

Antitumor effect and the inflammatory response of gallic acid treatment in HepG2 Cells

Artigo científico submetido ao periódico *European Journal of Cancer*.

Fator de impacto: 5.061

Classificação CAPES/Área: Qualis A1/Ciências Biológicas I

Essential title page information

Title: Antitumor effect and the inflammatory response of gallic acid treatment in

HepG2 Cells

Author names and affiliations

Kelly Goulart Lima^a, Gabriele Catyana Krause^a, Aline Daniele Schuster^a, Anderson Catarina Velasquez^a, Bruno Souza Basso^a, Fernanda Cristina Mesquita^a, Leonardo Pedrazza^a, Elisa Simon Marczak^b, Bianca Andrade Martha^a, Fernanda Bordignon Nunes^a, Márcio Vinícius Fagundes Donadio^a, Eduardo Cassel^a and Jarbas Rodrigues Oliveira^a.

^a Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, prédio 12, bloco C, CEP: 90619-900, Partenon, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail address: keglima@gmail.com, gabriele.krause@acad.pucrs.br, lineeshuster@gmail.com, anderson.catarina@acad.pucrs.br, bruno.basso.001@acad.pucrs.br, fecmesquita@gmail.com, leopedrazza@gmail.com, bianca.martha@acad.pucrs.br, fernanda.nunes@gmail.com, mdonadio@pucrs.br, cassel@pucrs.br, jarbas@pucrs.br.

^b Laboratório de Imunologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, CEP: 90619-900, Partenon, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail address: esbiomed@gmail.com.

Corresponding author

Jarbas Rodrigues Oliveira^a

Complete postal address: Av. Ipiranga, 6681, prédio 12, bloco c, Partenon, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 90619-900.

E-mail address: jarbas@pucrs.br

Phone numbers: +555133534147

Abstract

Hepatocellular Carcinoma is the most prevalent primary liver tumor and is among the top ten cancers that affect the world population. Its development is related, in most cases, to the existence of chronic liver injury, such as in cirrhosis. The knowledge about the correlation between chronic inflammation and cancer has driven new researches with anti-inflammatory agents that have potential for the development of antitumor drugs. Gallic acid is a polyphenol found in many natural products and have shown anti-inflammatory activity, anti-tumor, anti-mutagenic and strong antioxidant action. The purpose of this study was to investigate the effect of gallic acid on cell proliferation and inflammatory parameters of liver carcinoma cells (HepG2), as well as to investigate the mechanisms involved. Cell viability was evaluated through MTT colorimetric assay and Trypan blue exclusion. Results showed that the gallic acid decreased proliferation of HepG2 cells in a dose and time dependent manner, without causing necrosis (LDH assay). We observed significant induction of apoptosis by PE Annexin V and 7-AAD assay and no interference with the cell cycle using the FITC BrdU Flow Kit. The levels of inflammatory mediators were measured by Cytometric Bead Array Human Inflammation Assay and observed a significant reduction in the levels of interleukin-8 and increased levels of interleukin-10 and interleukin-12. We also evaluated the levels of TGF by ELISA and no significant differences. According to these results, we believe that gallic acid has a strong potential as an anti-tumor agent.

Keywords

Gallic acid. HepG2 cells. Hepatocellular Carcinoma. Apoptosis. Interleukin-8. Interleukin-10. Interleukin-12.

Acknowledgements

We thank funding sources CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Also thank all the researchers who supported this study and in particular the colleagues of Laboratory of Immunodiagnostic and Cell Culture Laboratory who contributed to the provision of equipment.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is among the top ten cancers that affect the world population. Treatment depends on the tumor stage and surgical resection, transplantation and percutaneous ablation are considered the only curative therapies. Other available therapies are palliative, including chemoembolization and ethanol injection¹. The development of HCC is related, in most cases, to chronic liver injury, such as in cirrhosis.

There are several evidences that chronic inflammation may induce carcinogenesis through several inflammatory mediators that can lead to genomic instability². The main factors involved are the increased expression of cytokines and products of inflammation, alteration of tumor suppressors and increased expression of transcription factors³. A recent review showed that inflammatory mediators can also contribute to the survival of tumors, mainly by increasing inflammation associated with cancer or protecting from immunological eradication⁴. The major interleukin involved in the survival of tumors is Interleukin 8 (IL-8). Its increased expression has been associated with increased tumor cell proliferation, tumor growth, tumor inflammation, angiogenesis and metastasis^{5; 6; 7}. This close relationship between inflammation and cancer shows that there is great potential in the development of anti-cancer treatments with anti-inflammatory action.

Considering the difficulties in conventional antineoplastic therapy and the possibility of recurrence, several studies have sought to develop more effective and specific therapies⁸. At the same time, it has increased the interest in the use of natural compounds as therapeutic agents⁹. Gallic acid (GA), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, is a polyphenol found in teas, grapes, red wine, nuts and other natural products¹⁰ that

can also be obtained from the acid hydrolysis of tannins¹¹. Several studies demonstrate that the GA has a strong antioxidant¹², anti-inflammatory¹³, antimutagenic¹⁴ and antitumor¹¹ actions. Regarding the anti-tumor activity, GA has also demonstrated selective cytotoxicity, mainly affecting tumor cells, but not normal cell lines^{15; 16}.

Studies with tumor cell lines have shown that GA induces apoptosis dependent formation of reactive oxygen species, leading to loss of mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c and caspases activation¹⁷. The GA also increases intracellular Ca²⁺, which is involved in inducing the formation of reactive oxygen species and activation of caspase 3¹⁸. The cyclooxygenases 1 and 2, considered pro-tumor by inducing cell division and apoptosis inhibition, has its activity inhibited by GA¹⁹.

The GA mechanisms of action also showed to involve modulation of inflammatory mediators in studies with other cell lines. GA induced a decrease in the expression of inflammatory cytokines, such as IL1 β and IL 6, in a study with fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis²⁰. Another study with oral epithelial cells described the inhibitory effect of GA in the expression of IL-6 and IL-8²¹. Thus, considering these evidences that the GA may also exert its antitumor effects via modulation of inflammatory mediators, new studies are necessary in order to investigate this hypothesis.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of gallic acid on cell proliferation and to determine whether its mechanism of action is related to the induction of apoptosis, cell cycle arrest or modulation of inflammatory parameters.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and treatment

Human hepatocarcinoma cell line (HepG2) was obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil). The cells were cultivated in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% streptomycin (100µg/mL) and penicillin (100 units/mL), 2 g/L HEPES buffer and 3,7 g/L NaHCO₃ in humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cells were grown to 70% confluence and treated with GA 300 µM, 450 µM, 550µM, 670 µM e 800 µM for 48 hours. Stock solutions and dilutions of GA were prepared in complete culture medium. For 96 well plates, cell were seeded at approximately 5 x 10⁴ cells per well. For 6 well plates, cells were seeded at approximately 1 x 10⁶ cells per well.

MTT assay

Cell viability was evaluated through MTT (Sigma-Aldrich, USA) colorimetric assay²². Cells were seeded and incubated in 96-well plates for 24 h at 37°C in a 5% CO₂ incubator. After, cells were treated and the plates were incubated. Control wells contained medium and FBS 10%. Three replicate wells were used at each concentration tested, including control. After 48 h of incubation, medium was discarded and MTT solution (5mg/mL in DMEM) was added and incubated for 3 h. Formazan crystals were dissolved by 100µL of DMSO and the amount of formazan was determined by measuring the absorbance (OD) at 562 nm with a 620 nm reference filter using ELISA microplate reader.

Trypan blue exclusion assay

This method was also used to measure cell viability. Cells were seeded and treated as described for the MTT assay. After 48 h incubation, the number of viable cells was determined by mixing 25 μ L of cell suspension and 25 μ L of 0,4% trypan blue stain solution (Sigma-Aldrich, USA), using a hemacytometer under a light microscope (Nikon Optiphot, Japan). Blue cells were counted as dead cells and the cells that did not absorb were counted as live cells.

Lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay

LDH assay was used to assess the cytotoxicity of treatments in HepG2 cells, since leakage of the LDH (cytoplasmic located enzyme) into the extracellular medium is evidence of membrane disruption. Enzyme activity was measured in both supernatants and the cell lysate using colorimetric assay Lactato Desidrogenase kit (Labtest, Minas Gerais, Brazil). For the control of cell lysis, a 5% Tween was used. LDH release was calculated by measuring the absorbance at 492 nm using ELISA microplate reader.

Morphological Analysis

Cell morphological changes analysis were evaluated after 48 h of treatment in 96-well plate. Cells were observed under phase contrast inverted microscope at 100 x and 400 x magnification and photographed.

Cell Cycle Analysis

To evaluate whether treatment with GA interferes with the cell cycle, HepG2 cells were first synchronized by 24 h serum starvation and then exposed to GA for 48

hours. Cell cycle phase analysis was performed using the FITC BrdU Flow Kit (BD Biosciences, San Jose, CA). In brief, after treatment and BrdU labeling, cells were harvested by trypsinization and adjusted to 1×10^6 cells/mL. Samples were fixed with BD Cytofix/Cytoperm Buffer (BD Biosciences). Following fixation, cells were treated with Dnase for 1 hour to expose incorporated BrdU. Later on, total DNA was stained using 7-AAD solution. The stained cells were analyzed by FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and results analyzed using the FlowJo 7.6.5 software (Tree Star Inc.).

Apoptosis Assay by PE Annexin V and 7-AAD Staining

PE Annexin V and 7AAD double staining assay was performed to quantify apoptosis using FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, USA). After 48 h of treatments, cells were harvested, washed with ice-cold PBS, resuspended in binding buffer with a cell density of 1×10^6 cells/mL, incubated with 5 μ L of PE Annexin V and 5 μ L of 7-AAD, mixed and incubated for 15 min at room temperature in the dark. After, samples were analyzed by flow cytometry to identify apoptotic cells. Cells without treatment were used as a negative control and cells treated with cisplatin 20 μ M were used as positive control. Data were analyzed using FlowJo 7.2.5 software (Tree Star Inc., Ashland OR). Analysis allows discrimination among necrotic cells (Annexin V-/7-AAD+), late apoptotic (Annexin V+/7-AAD+) and early apoptotic (Annexin V+/7-AAD).

TGF- β 1 quantitation

Transforming growth factor (TGF- β 1) is involved in the regulation of liver cell proliferation and apoptosis²³. Thus, we have measured in cell culture supernatants after 48 h of treatment with GA using commercially available ELISA kit (R & Systems,

USA). The absorbance was determined at 540nm with the correction wavelength set at 570 nm using ELISA microplate reader. TGF- β 1 levels were expressed as picograms per milliliter.

Quantitation of inflammatory markers

The modulation of the synthesis of proteins involved in inflammation was assessed after 48 h of treatment with GA using the cytometric bead array (CBA) Human Inflammation Kit (BD Biosciences). The supernatants were collected and stored at -20°C for later analysis. Multiple soluble cytokines (IL-8 IL-6, IL-10 and IL-12p70) were simultaneously measured by flow cytometry. Acquisition was performed with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). Data analysis was performed using FCAP Array v1.0.1 software (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary). The detection limit was 20–5000 pg/mL.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and data expressed as mean \pm SEM. Comparisons between groups were done using the Student's t test or the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison post-test, as appropriated. A *P* value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

Gallic Acid decreases proliferation of HepG2 cells

The treatment of HepG2 cells with different concentrations of GA induced a decrease in the percentage of viable cells in a dose and time dependent manner, as shown in figure 1. After this initial experiment of cellular viability, we selected the 550 μ M GA concentration, as it presented an inhibitory effect in the cell proliferation after 24 hours of treatment, and an even more pronounced effect after 48 hours. Cell viability was also significantly reduced when analyzed by the MTT assay, as shown in figure 2.

Effect of Gallic Acid on the morphology of HepG2 cells

The morphological changes in HepG2 cells treated with GA were compared to untreated cells, as shown in figure 3. The main findings observed in HepG2 cells after treatment were: reduction of confluence and cell volume, loss of contact with neighboring cells (a), shrinkage (b) and rounding (c). These cellular changes demonstrate probable inhibition of cell proliferation, as well as induction of programmed cell death.

Cytotoxicity by release of lactate dehydrogenase

In order to assess the possible death by necrosis, the LDH release by cells treated with GA was evaluated. There was no significant difference compared to the untreated control (Figure 4).

Gallic acid induces HepG2 cells apoptosis

According to the results shown in Figure 5, GA significantly increased the percentage

of cells in early apoptosis compared to untreated control.

Effect of gallic acid on the cell cycle

Assessment of the percentage of cells in each phase of the cell cycle (Sub G0-G1, G0-G1, G2-M e S) showed no significant difference between cells treated with GA and control. This indicates that the GA possible mechanism of action in this cell line does not involve the cell cycle arrest. Results are shown in figures 6 and 7.

Effect of gallic acid on the production of TGF β

To verify the hypothesis that treatment with GA would influence the modulation of the production of TGF β , we quantified this cytokine in cell culture supernatants using Elisa kit. However, no significant difference was observed between cells treated with GA and the untreated control (Figure 8).

Gallic acid modulates inflammatory markers

The results showed a significant increase in the levels of interleukin-10 and interleukin-12 and reduced levels of interleukin-8. Levels of interleukin-6 showed no significant difference compared to untreated cells. Results are shown in figure 9.

DISCUSSION

Treatment of HepG2 cells with 550 μ M of GA was shown to reduce cell viability by 29% after 24 hours and by 56% after 48 hours compared to control. When the lactate dehydrogenase test was performed, it was possible to reject the hypothesis of a GA-induced necrosis, as there was no significant increase compared to control. A previous study using the same cell line showed that the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of GA in 24 hours is 670 μ M²⁴, but did not determine its mechanism. Our findings, although similar, were slightly different, since we obtained a 40% reduction in the number of cells using the same concentration (670 μ M) in 24 hours. Also, the inhibitory effect of GA and its derivatives in tumor cell proliferation and in the reduction of cell viability has been reported in previous studies using glioma cell lines (U87 and U251n)²⁵, leukemia (L1210)²⁶ and oral carcinoma (HSC-2)²⁷.

Treatment with GA caused morphological changes in HepG2 cells. These changes are indicative of a reduction in cell proliferation and possible induction of apoptosis. Previous study with the same cell treated with an apoptosis-inducing agent showed similar morphological changes, as the reduction of confluence and cell volume, rounding, loss of contact with neighboring cells and shrinkage²⁸. Since these morphological changes were findings of apoptosis induction, the apoptosis assay was performed. We observed a significant increase in the percentage of cells undergoing apoptosis after treatment with GA. This finding is in agreement with previous studies, which have reported the induction of apoptosis as a mechanism of GA^{16; 17}. Based on these results, we have also evaluated whether or not GA interferes in the cell cycle.

The assessment of the percentage of cells in each phase of the cell cycle showed no

significant difference compared to untreated controls. If GA were inducing HepG2 cells to a cell cycle arrest, one would expect an increase in the percentage of cells in G0-G1 phase, which was not observed. However, previous studies with cell lines of prostate cancer and leukemia showed cell cycle arrest after treatment with GA, unlike our findings^{29; 30}.

On the other hand, knowing the anti-inflammatory action of GA, we have investigated whether this effect could be related to a modulation of inflammatory mediators¹³. Thus, we observed a significant reduction in the levels of IL-8. This cytokine is considered to be pro-inflammatory and has strong angiogenic activity in patients with HCC. Its increase is correlated with cell proliferation, tumor growth, tumor inflammation, invasiveness and metastasis formation^{5; 6; 7; 31}. Its mechanism of action is related to activation of multiple signaling pathways, interfering with gene expression. Moreover, it modulates the cellular proteome at a translational level, as well as it affects the organization of the cytoskeleton^{5; 6; 7}. Also, we have demonstrated a significant increase in the levels of anti-inflammatory cytokine IL-10. Studies have revealed that its action is directly related to programmed cell death of tumor cells by blocking the activation of the transcription factor NF- κ B^{32; 33}.

Another interleukin that increased after treatment with GA was Interleukin-12, measured by its subunit IL12p70. Previous study showed that this cytokine has potent antitumor and antimetastatic activity in the HCC^{34; 35}. Also, it has antiangiogenic effects and its activity is mediated by IFN-gamma-inducible genes³⁶, which can potentiate the antitumor effect of the GA in vivo. There was no significant difference in the levels of interleukin 6, which has both pro and anti-inflammatory activity. This cytokine promotes the antitumor activity of macrophages, helps produce lymphokine-activated killer cells, protects neutrophils from apoptosis and activates

the complement system, which may lead to tumor cell lysis. On the other hand, it may promote tumor by stimulating the production of growth factors³⁷. No difference was observed in the modulation of TGF β , which is involved in the regulation of liver cell proliferation and apoptosis by influencing transcriptional factors²³.

In conclusion, the results show that in addition to induction of apoptosis, gallic acid can also act modulating inflammatory mediators, without interfering in the cell cycle. Considering that these mechanisms are strongly correlated with antitumor effects in HepG2 cells, as well as its low toxicity, high antiproliferative and anti-inflammatory ability, gallic acid may be considered as a promising therapy and further investigated.

REFERENCES

- 1 SALHAB, M.; CANELO, R. An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. **J Cancer Res Ther**, v. 7, n. 4, p. 463-75, 2011 Oct-Dec 2011. ISSN 1998-4138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22269411> >.
- 2 AIVALIOTIS, I. L. et al. How do cytokines trigger genomic instability? **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 536761, 2012. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22754280> >.
- 3 GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303878> >.
- 4 LIPPITZ, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 6, p. e218-28, May 2013. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23639322> >.
- 5 WAUGH, D. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 21, p. 6735-41, Nov 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18980965> >.
- 6 SPARMANN, A.; BAR-SAGI, D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 6, n. 5, p. 447-58, Nov 2004. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542429> >.
- 7 CHAVEY, C. et al. Interleukin-8 expression is regulated by histone deacetylases through the nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer. **Mol Pharmacol**, v. 74, n. 5, p. 1359-66, Nov 2008. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669446> >.
- 8 ALMEIDA, J. R. C. D. **Farmacêuticos em Oncologia: uma nova realidade**. 1. São Paulo: 2004. 358
- 9 KHAN, N.; MUKHTAR, H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. **Cancer Lett**, v. 269, n. 2, p. 269-80, Oct 2008. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501505> >.
- 10 MA, J. et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of Manilkara zapota (Sapodilla). **J Nat Prod**, v. 66, n. 7, p. 983-6, Jul 2003. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880319> >.
- 11 LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **Eur J Med Chem**, v. 60, p. 233-9, Feb 2013. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291333> >.

- 12 KIM, D. O. et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 13, p. 3713-7, Jun 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12059148> >.
- 13 KROES, B. H., VAN DEN BERGER, A.J.J. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Med**, v. 58, p. 499-504, 1992.
- 14 GICHNER, T. et al. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 32, n. 1, p. 55-62, 1987. ISSN 0015-5632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3546027> >.
- 15 SERRANO, A. et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Arch Biochem Biophys**, v. 350, n. 1, p. 49-54, Feb 1998. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466819> >.
- 16 YOSHIOKA, K. et al. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. **Oncol Rep**, v. 7, n. 6, p. 1221-3, 2000 Nov-Dec 2000. ISSN 1021-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11032918> >.
- 17 RUSSELL, L. H. et al. Autoxidation of gallic acid induces ROS-dependent death in human prostate cancer LNCaP cells. **Anticancer Res**, v. 32, n. 5, p. 1595-602, May 2012. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593437> >.
- 18 ISUZUGAWA, K.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. Ca²⁺-Dependent caspase activation by gallic acid derivatives. **Biol Pharm Bull**, v. 24, n. 7, p. 844-7, Jul 2001. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11456129> >.
- 19 TANG, X. et al. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. **Cancer Res**, v. 62, n. 17, p. 4903-8, Sep 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208739> >.
- 20 YOON, C. H. et al. Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 3, p. 274-9, May 2013. ISSN 1778-7254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23058179> >.
- 21 KANG, M. S. et al. Effects of methyl gallate and gallic acid on the production of inflammatory mediators interleukin-6 and interleukin-8 by oral epithelial cells stimulated with *Fusobacterium nucleatum*. **J Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 760-7, Dec 2009. ISSN 1976-3794. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20127471> >.
- 22 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application

- to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.
- 23 BUENEMANN, C. L. et al. Transforming growth factor-beta1-induced Smad signaling, cell-cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 3, p. 447-52, Mar 2001. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238185> >.
- 24 OKAMURA, M. et al. Apoptosis-inducing activity of cisplatin (CDDP) against human hepatoma and oral squamous cell carcinoma cell lines. **Anticancer Res**, v. 24, n. 2B, p. 655-61, 2004 Mar-Apr 2004. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161008> >.
- 25 LU, Y. et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. **Eur J Pharmacol**, v. 641, n. 2-3, p. 102-7, Sep 2010. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553913> >.
- 26 LOCATELLI, C. et al. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 7, p. 3791-9, Apr 2008. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295493> >.
- 27 FURUYA, S. et al. Cytotoxic activity of steroidal saponins against human oral tumor cell lines. **Anticancer Res**, v. 20, n. 6B, p. 4189-94, 2000 Nov-Dec 2000. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205247> >.
- 28 MONGA, J. et al. Growth inhibition and apoptosis induction by (+)-Cyanidan-3-ol in hepatocellular carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68710, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23894334> >.
- 29 AGARWAL, C.; TYAGI, A.; AGARWAL, R. Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 12, p. 3294-302, Dec 2006. ISSN 1535-7163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172433> >.
- 30 YEH, R. D. et al. Gallic acid induces G₀/G₁ phase arrest and apoptosis in human leukemia HL-60 cells through inhibiting cyclin D and E, and activating mitochondria-dependent pathway. **Anticancer Res**, v. 31, n. 9, p. 2821-32, Sep 2011. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868525> >.
- 31 GUERRIERO, E. et al. Effects of lipoic acid, caffeic acid and a synthesized lipoyl-caffeic conjugate on human hepatoma cell lines. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6365-77, 2011. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21796075> >.
- 32 SANTIAGO-LOMELÍ, M. et al. Differential effect of interleukin-10 on hepatocyte apoptosis. **Life Sci**, v. 76, n. 22, p. 2569-79, Apr 2005. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769481> >.

- 33 HSIA, C. Y. et al. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma. **Eur J Surg Oncol**, v. 33, n. 2, p. 208-12, Mar 2007. ISSN 0748-7983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140760> >.
- 34 YAMASHITA, Y. I. et al. Electroporation-mediated interleukin-12 gene therapy for hepatocellular carcinoma in the mice model. **Cancer Res**, v. 61, n. 3, p. 1005-12, Feb 2001. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11221826> >.
- 35 BARAJAS, M. et al. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. **Hepatology**, v. 33, n. 1, p. 52-61, Jan 2001. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124820> >.
- 36 DEL VECCHIO, M. et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 16, p. 4677-85, Aug 2007. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699845> >.
- 37 TRIKHA, M. et al. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 13, p. 4653-65, Oct 2003. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581334> >.

FIGURES

Figure 1

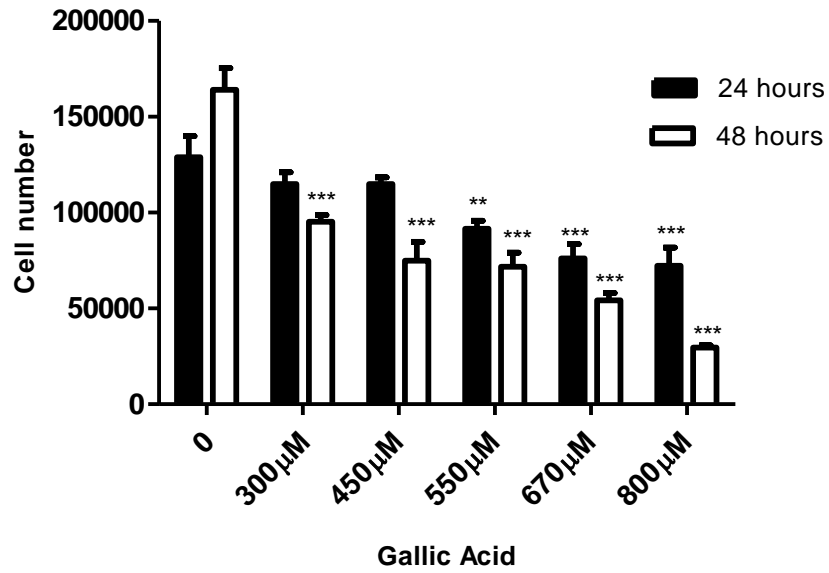


Figure 2

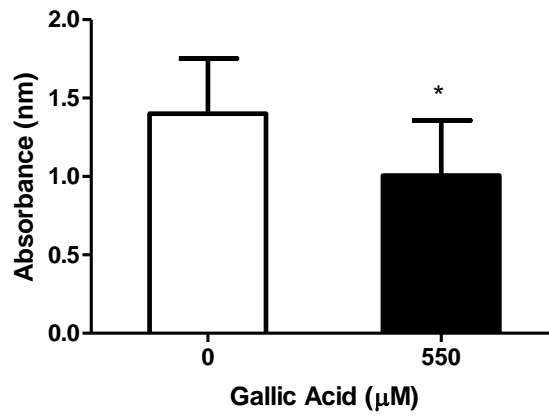


Figure 3

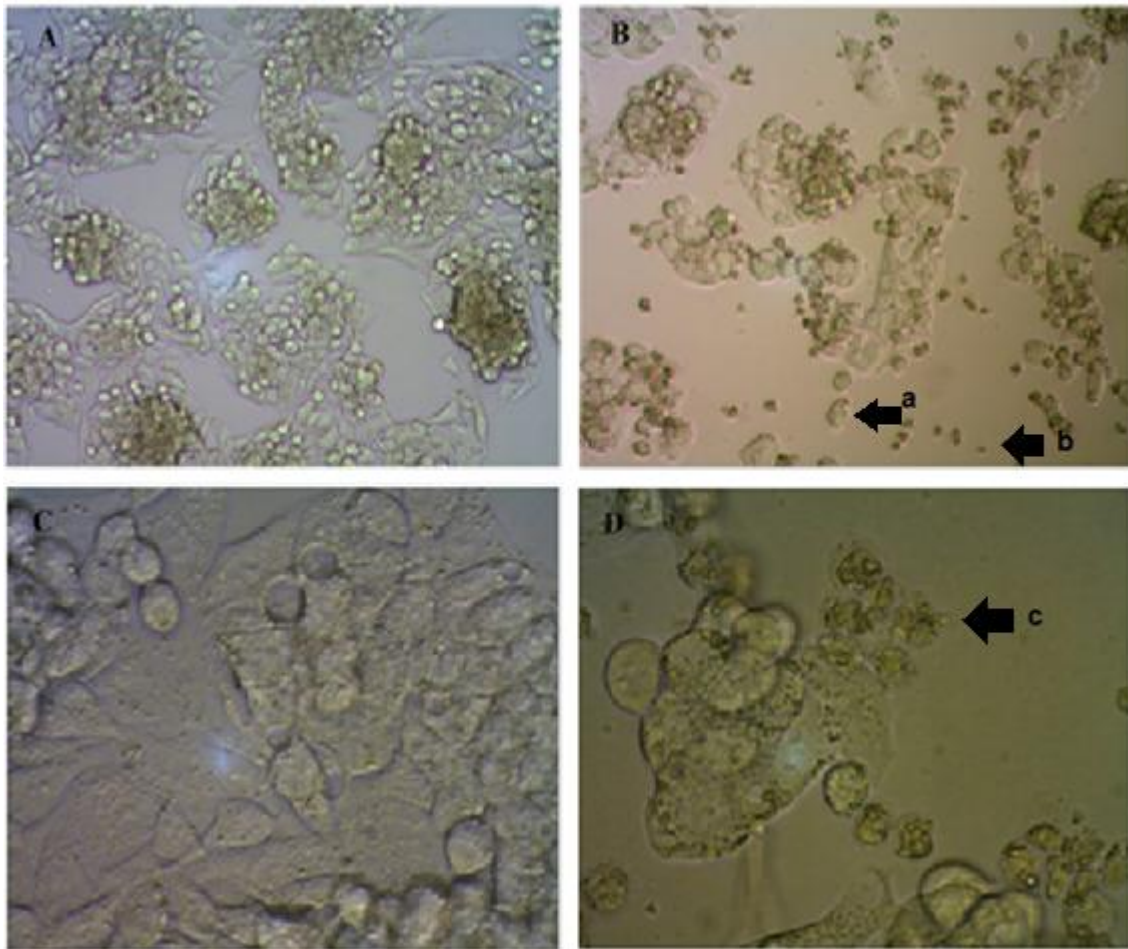


Figure 4

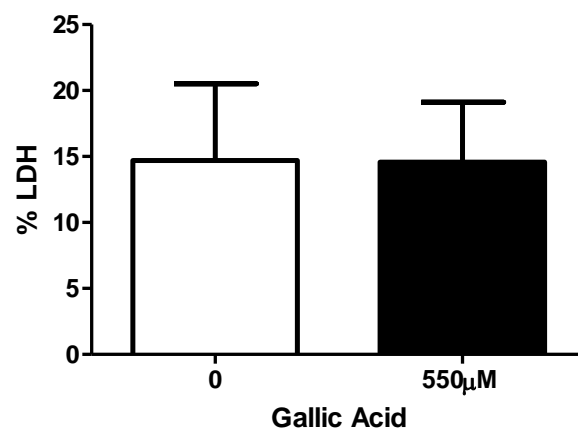


Figure 5

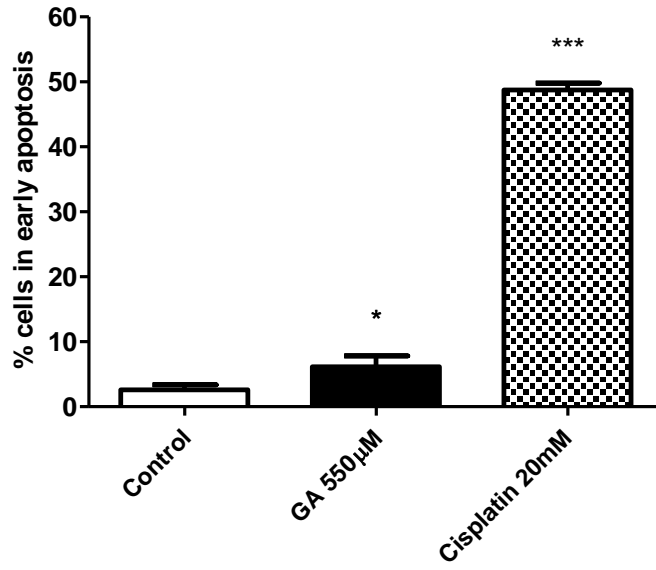


Figure 6

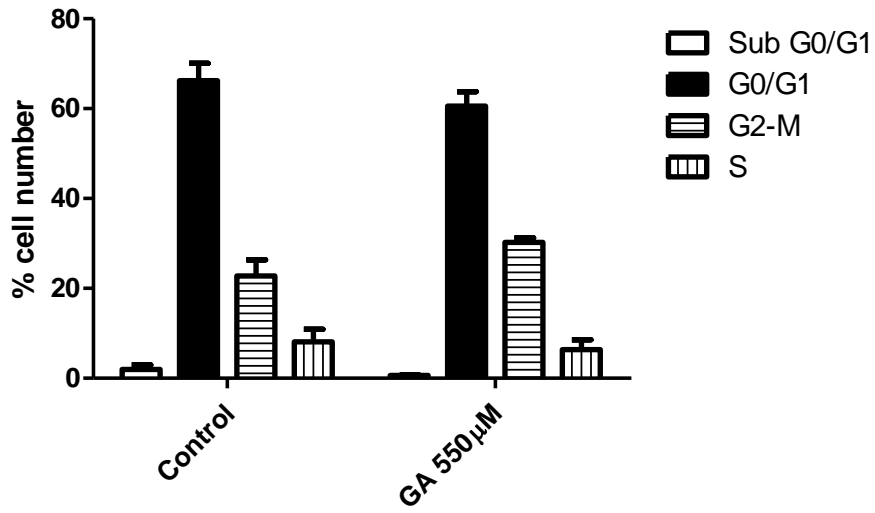


Figure 7

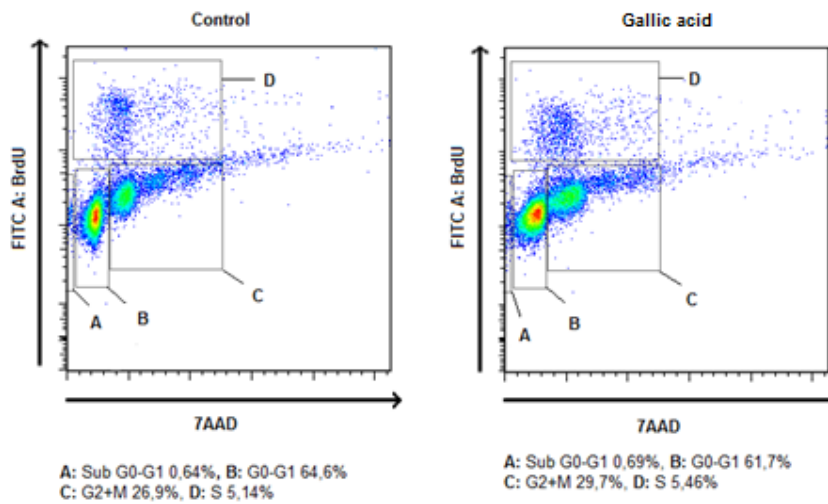


Figure 8

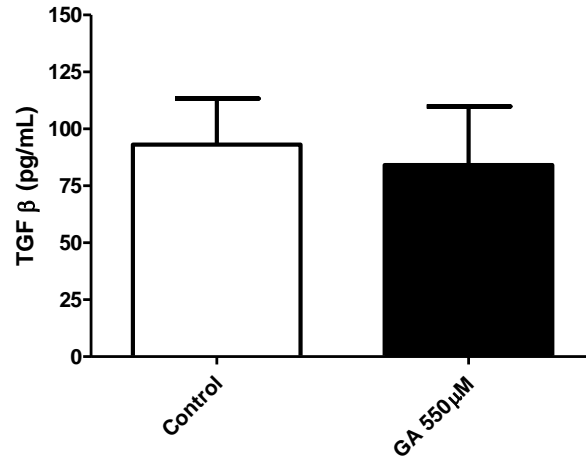


Figure 9

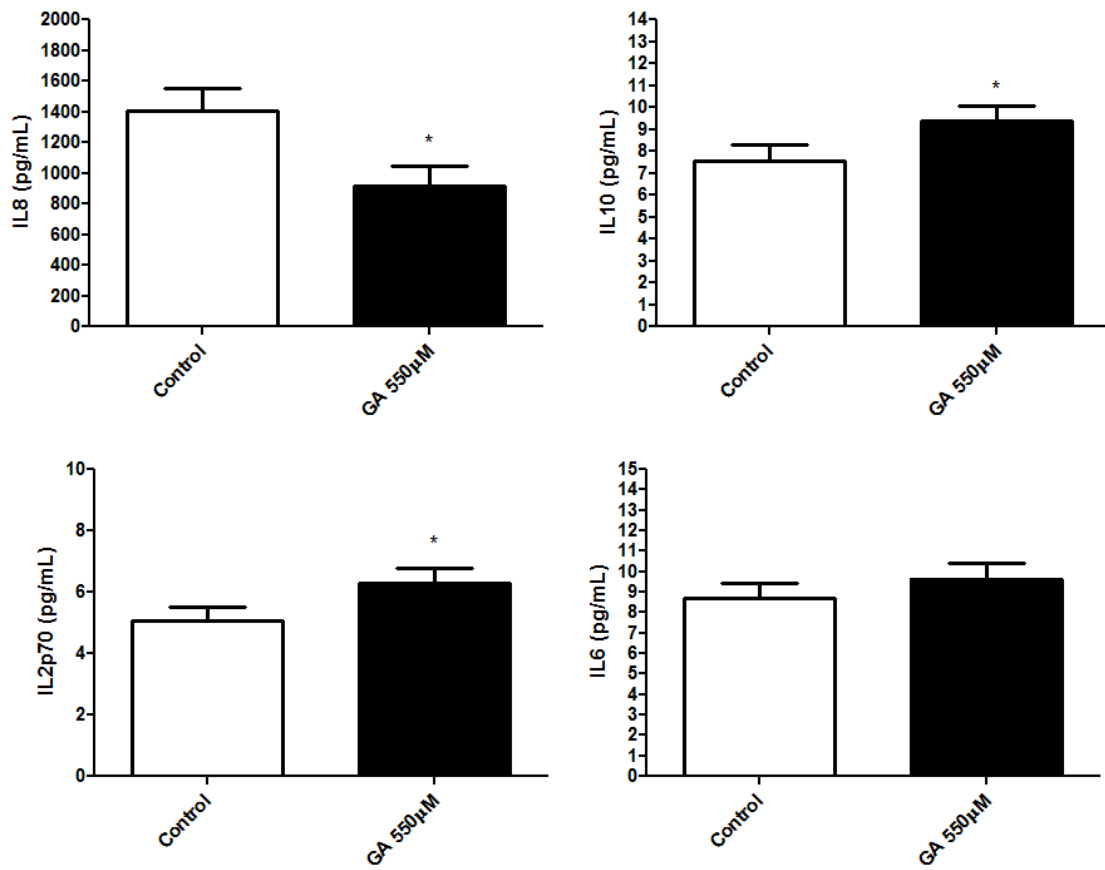


FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Effect of Gallic Acid on HepG2 proliferation for 24 and 48h. Cell viability was assessed by direct cell counting. Results are expressed as cell number. Data represent the mean \pm SEM (n = 3). Significant differences (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) using one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

Fig. 2 Effect of Gallic Acid on HepG2 proliferation after 48h. Cell viability was assessed by MTT assay. Results are expressed as the absorbance reading. Data represent the mean \pm SD (n = 3). *Significant difference ($p < 0.05$) using Student's t-test.

Fig. 3 Effect of Gallic Acid on the morphology of HepG2 cells. Images were obtained by phase-contrast inverted microscope. A: untreated cells (100X), B: Gallic acid 550 μ M after 48h (100X), C: untreated cells (400X), D: Gallic acid 550 μ M after 48h (400X). a: loss of contact with neighboring cells, b: shrinkage, c: rounding.

Fig. 4 Percent of release of lactate dehydrogenase of HepG2 cells after treatment with gallic acid. Results are expressed as mean \pm SD (n=3). Control vs. treated cells. No significant difference ($p < 0.05$) using Student's t-test.

Fig. 5 Effect of gallic acid treatment on the induction of early apoptosis after 48h on the HepG2 cell measured by flow cytometry. Results are expressed as percentage of cell number. Data represent mean \pm SEM (n=3). Significant differences (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) using one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

Fig.6 Effect of gallic acid treatment after 48h on the HepG2 cell cycle measured by flow cytometry. Results are expressed as percentage of cell number in each cell cycle phase compared to control. No significant difference ($p < 0.05$) using Student's t-test.

Fig.7 Effect of gallic acid treatment after 48h on the HepG2 cell cycle measured by flow cytometry. Flow cytometric density plot of FITC A- BrdU/7AAD stained HepG2

control and gallic acid-treated cells for 48 h. No significant difference ($p < 0.05$) using Student's t-test.

Fig.8 Elisa assay of TGF- β in the supernatant of HepG2 cells after 48 h of treatment with gallic acid compared to control. Data represent the mean \pm SEM ($n=3$). TGF- β levels were expressed as picograms per milliliter. No significant difference ($p < 0.05$) using Student's t-test.

Fig.9 CBA Human Inflammatory assay in the supernatant of HepG2 cells after 48 h of treatment with gallic acid compared to control. Data represent the mean \pm SEM ($n=3$). Cytokine levels were expressed as picograms per milliliter. *Significant difference ($p < 0.05$) using Student's t-test.

Capítulo 3

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta de agentes terapêuticos para o tratamento do câncer que possuam alvos moleculares específicos é de extrema importância para o avanço da clínica oncológica. O tratamento convencional para neoplasias apresenta baixa especificidade e uma estreita janela terapêutica. Esses dois fatores estão diretamente correlacionados com a alta toxicidade para os tecidos saudáveis e grande quantidade de efeitos adversos¹⁴. Além disso, a resistência a esses fármacos tem sido outro desafio no tratamento do câncer, fazendo com que muitas vezes a escolha seja a combinação de várias terapias para o mesmo paciente¹³.

Ao avaliar as opções disponíveis para o tratamento do Hepatocarcinoma o quadro torna-se ainda mais complexo, pois as poucas opções de terapias curativas (ressecção cirúrgica, transplante e ablação percutânea) são indicadas somente para pacientes em estágio inicial do tumor, os quais correspondem menos de 40% dos casos diagnosticados⁵. Ao mesmo tempo, o Hepatocarcinoma ocupa o décimo lugar nas neoplasias que afetam a população mundial⁴ e tem apresentado aumento na sua incidência, principalmente em países ocidentais. A infecção pelo vírus da Hepatite C tem sido um fator importante atribuído a essa tendência⁴.

Nesse contexto, a pesquisa de alternativas terapêuticas alvo específicas torna-se essencial para o tratamento do CHC. O ácido gálico, um polifenol obtido de produtos naturais, é considerado um potencial agente antitumoral, pois vários estudos mostram sua atividade antioxidante³⁹, antiinflamatória⁴⁰, antimutagênica⁴¹ e anti-tumoral³⁸. Pesquisas com outras linhagens tumorais têm mostrado que os derivados do ácido gálico apresentam ação antitumoral ainda mais potente que o seu precursor. A principal hipótese é de que os derivados por serem mais hidrofóbicos que o ácido gálico, têm maior afinidade e permeabilidade pela membrana plasmática. Estudos “in vitro” com linhagens de leucemia, melanoma, câncer de pulmão e câncer de mama mostram que a atividade antitumoral desses derivados está diretamente ligada à indução da apoptose, porém poucos exploram a possível modulação de mediadores inflamatórios como um mecanismo também envolvido³⁸.

Nosso estudo avaliou o efeito do ácido gálico sobre a proliferação celular e parâmetros inflamatórios das células de carcinoma hepático (HepG2) e possível

identificação do seu mecanismo de ação. Além disso, pesquisamos se o ácido gálico interferia no ciclo celular, na morfologia celular e se induzia as células à apoptose. Os resultados mostraram que o ácido gálico reduziu a proliferação celular de maneira dose e tempo dependente, alterando a morfologia celular. As células HepG2 após o tratamento adquiriram características semelhantes às de células em apoptose, a qual foi confirmada pelo ensaio da Anexina-V/7AAD, por citometria de fluxo.

Realizamos análise do ciclo celular e não observamos diferença significativa entre as células tratadas com ácido gálico e as células não tratadas. O mesmo ocorreu com as análises de lactato desidrogenase, TGF β e interleucina 6. Ao avaliar o nível de alguns mediadores inflamatórios, observamos redução significativa dos níveis da interleucina 8 (pró-inflamatória e relacionada à angiogênese, invasividade e à formação de metástases)^{53; 54; 55}, aumento dos níveis de interleucina 10 (anti-inflamatória e relacionada à indução da morte celular programada)^{56; 57} e aumento dos níveis da interleucina 12 (antiangiogênica). Esses resultados mostraram que o efeito do ácido gálico na linhagem celular HepG2 está relacionado não só à indução da apoptose, mas também à modulação dessas interleucinas.

A ação do ácido gálico relacionada à modulação de mediadores inflamatórios em células tumorais ainda tem sido pouco explorada, apesar de seu grande potencial. Consideramos que a pesquisa desses sinalizadores e sua relação com o câncer é muito importante, visto que existem várias evidências de que a inflamação apresenta um papel duplo em relação às neoplasias, podendo apresentar efeito pró ou antitumoral²³. A inibição de sinalizadores pró-tumorais como a interleucina-8, assim como o estímulo de mediadores anti-inflamatórios pode ser um novo alvo terapêutico para o tratamento do câncer. Possivelmente, a modulação desses mediadores poderia ser inserida como uma terapia auxiliar, visto que o sucesso no tratamento do câncer tem sido alcançado quando vários alvos moleculares estão envolvidos, evitando assim a resistência terapêutica.

Ainda há um número limitado de estudos que avaliam o efeito dos derivados do ácido gálico no Hepatocarcinoma, sendo necessário estudos posteriores que possam aprofundar os conhecimentos sobre o efeito antitumoral desses compostos e do seu precursor, principalmente no que diz respeito às vias de sinalização que possam levar à modulação de mediadores inflamatórios.

REFERÊNCIAS

- 1 MITCHELL, R. et al. **Robbins & Contran - Fundamentos de Patologia**. 7. Rio de Janeiro: 2006. 829
- 2 ORGANIZATION, W. H. Cause-specific mortality, 2008: WHO region by country. 2008. Disponível em: < <http://apps.who.int/gho/data/node.main.887?lang=en> >. Acesso em: 14/12/2013.
- 3 CÂNCER, I. N. D. ABC do Câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2011. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf >. Acesso em: 14/12/13.
- 4 SALHAB, M.; CANELO, R. An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. **J Cancer Res Ther**, v. 7, n. 4, p. 463-75, 2011 Oct-Dec 2011. ISSN 1998-4138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22269411> >.
- 5 LLOVET, J. M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1907-17, Dec 2003. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14667750> >.
- 6 BOSCH, F. X. et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5 Suppl 1, p. S5-S16, Nov 2004. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15508102> >.
- 7 HASHEM, B. E. **Current Concepts Hepatocellular Carcinoma**. The New England Journal of Medicine. 365: 1118-1127 p. 2011.
- 8 INCA. Câncer de Fígado. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/figado> >. Acesso em: 03/04/2012.
- 9 BRECHOT, C. et al. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. **Nature**, v. 286, n. 5772, p. 533-5, Jul 1980. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6250074> >.
- 10 MINAMI, M. et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. **Oncogene**, v. 24, n. 27, p. 4340-8, Jun 2005. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806150> >.
- 11 YAMANAKA, T.; KODAMA, T.; DOI, T. Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 294, n. 3, p. 528-34, Jun 2002. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12056798> >.
- 12 FUKUTOMI, T. et al. Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth:

- correlation with upregulation of wnt-1 expression. **Hepatology**, v. 41, n. 5, p. 1096-105, May 2005. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15841445> >.
- 13 ALMEIDA, J. R. C. D. **Farmacêuticos em Oncologia: uma nova realidade**. 1. São Paulo: 2004. 358
- 14 REIS, M. **Farmacogenética Aplicada ao Câncer. Quimioterapia Individualizada e Especificidade Molecular**. Simpósio Farmacogenética. Ribeirão Preto. 39: 577-586 p. 2006.
- 15 GREENE, F. L. **AJCC Câncer Staging Manual**. PAGE, D. L. Nova York: Springer 2002.
- 16 PIMENTA, J. R., MASSABKI, P.S. Carcinoma hepatocelular: um panorama clínico. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 8, p. 59-67, 2010. Disponível em: < <http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2010/v8n1/a012.pdf> >.
- 17 SOBIN, L. H. **TNM Classification of Malignant Tumours**. WITTEKIND, C. Washington: John Wilen & Sons 2002.
- 18 INSTITUTE, N. C. Treatment of Hepatocellular Carcinoma. Bethesda, 2013. Disponível em: < <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/childliver/HealthProfessional/page6> >.
- 19 SHIN, J. W.; CHUNG, Y. H. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: current and future. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 37, p. 6144-55, Oct 2013. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24115810> >.
- 20 LLOVET, J. M. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. **N Engl J Med**, v. 359, n. 4, p. 378-90, Jul 2008. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650514> >.
- 21 HUYNH, H. Molecularly targeted therapy in hepatocellular carcinoma. **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 5, p. 550-60, Sep 2010. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371362> >.
- 22 LIU, L. et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. **Cancer Res**, v. 66, n. 24, p. 11851-8, Dec 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17178882> >.
- 23 AIVALIOTIS, I. L. et al. How do cytokines trigger genomic instability? **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 536761, 2012. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22754280> >.
- 24 DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 329-60, 2004. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032581> >.

- 25 ANDERSEN, N. N.; JESS, T. Has the risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease decreased? **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 43, p. 7561-8, Nov 2013. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24282346> >.
- 26 RAZA, H.; JOHN, A.; BENEDICT, S. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. **Eur J Pharmacol**, v. 668, n. 1-2, p. 15-24, Oct 2011. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722632> >.
- 27 WILLIAMS, C. S.; MANN, M.; DUBOIS, R. N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. **Oncogene**, v. 18, n. 55, p. 7908-16, Dec 1999. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10630643> >.
- 28 GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303878> >.
- 29 LASEK, W.; ZAGOŹDŹON, R.; JAKOBISIAK, M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? **Cancer Immunol Immunother**, v. 63, n. 5, p. 419-35, May 2014. ISSN 1432-0851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24514955> >.
- 30 THUN, M. J.; NAMBOODIRI, M. M.; HEATH, C. W. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. **N Engl J Med**, v. 325, n. 23, p. 1593-6, Dec 1991. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1669840> >.
- 31 CALLEJAS, N. A. et al. Absence of nuclear factor kappaB inhibition by NSAIDs in hepatocytes. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 341-8, Feb 2002. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11826407> >.
- 32 CONTRACTOR, N. et al. Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. **J Immunol**, v. 179, n. 5, p. 2690-4, Sep 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709480> >.
- 33 MACDONALD, C. J. et al. Modulation of carcinogen metabolism by nitric oxide-aspirin 2 is associated with suppression of DNA damage and DNA adduct formation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 33, p. 22099-107, Aug 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19542225> >.
- 34 HONG, S. et al. Connection between inflammation and carcinogenesis in gastrointestinal tract: focus on TGF-beta signaling. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 17, p. 2080-93, May 2010. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20440848> >.
- 35 BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity.

- J Agric Food Chem**, v. 56, n. 15, p. 6185-205, Aug 2008. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593176> >.
- 36 GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 3, p. 287-303, Aug 2004. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15223063> >.
- 37 MA, J. et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of Manilkara zapota (Sapodilla). **J Nat Prod**, v. 66, n. 7, p. 983-6, Jul 2003. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880319> >.
- 38 LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **Eur J Med Chem**, v. 60, p. 233-9, Feb 2013. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291333> >.
- 39 KIM, D. O. et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 13, p. 3713-7, Jun 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12059148> >.
- 40 KROES, B. H., VAN DEN BERGER, A.J.J. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Med**, v. 58, p. 499-504, 1992.
- 41 GICHNER, T. et al. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 32, n. 1, p. 55-62, 1987. ISSN 0015-5632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3546027> >.
- 42 SERRANO, A. et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Arch Biochem Biophys**, v. 350, n. 1, p. 49-54, Feb 1998. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466819> >.
- 43 YOSHIOKA, K. et al. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. **Oncol Rep**, v. 7, n. 6, p. 1221-3, 2000 Nov-Dec 2000. ISSN 1021-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11032918> >.
- 44 SAEKI, K. et al. Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. **Biol Pharm Bull**, v. 23, n. 11, p. 1391-4, Nov 2000. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085375> >.
- 45 RUSSELL, L. H. et al. Autoxidation of gallic acid induces ROS-dependent death in human prostate cancer LNCaP cells. **Anticancer Res**, v. 32, n. 5, p. 1595-602, May 2012. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593437> >.
- 46 ISUZUGAWA, K.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. Ca²⁺-Dependent caspase activation by gallic acid derivatives. **Biol Pharm Bull**, v. 24, n. 7, p. 844-7, Jul 2001. ISSN

- 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11456129> >.
- 47 TANG, X. et al. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. **Cancer Res**, v. 62, n. 17, p. 4903-8, Sep 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208739> >.
- 48 LU, Y. et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. **Eur J Pharmacol**, v. 641, n. 2-3, p. 102-7, Sep 2010. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553913> >.
- 49 VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: molecular rival of cancer. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 35, n. 3, p. 473-85, May 2013. ISSN 1872-7077. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23501608> >.
- 50 SILVA, T. C. **Efeitos Antineoplásicos da raiz de Pfaffia paniculata (Ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano**. 2008. 178 (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia., Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 51 (ATCC), A. T. C. C. **Product Information Sheet for ATCC HB-8065**. Manassas - USA 2012.
- 52 KHAN, N.; MUKHTAR, H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. **Cancer Lett**, v. 269, n. 2, p. 269-80, Oct 2008. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501505> >.
- 53 WAUGH, D. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 21, p. 6735-41, Nov 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18980965> >.
- 54 SPARMANN, A.; BAR-SAGI, D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 6, n. 5, p. 447-58, Nov 2004. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542429> >.
- 55 CHAVEY, C. et al. Interleukin-8 expression is regulated by histone deacetylases through the nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer. **Mol Pharmacol**, v. 74, n. 5, p. 1359-66, Nov 2008. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669446> >.
- 56 SANTIAGO-LOMELÍ, M. et al. Differential effect of interleukin-10 on hepatocyte apoptosis. **Life Sci**, v. 76, n. 22, p. 2569-79, Apr 2005. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769481> >.
- 57 HSIA, C. Y. et al. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma. **Eur J Surg Oncol**, v. 33, n. 2, p. 208-12, Mar 2007. ISSN 0748-7983. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140760> >.

ANEXO A - Carta de submissão *European Journal of Cancer*.

De: ees.ejc.0.2965e2.3fff46f4@eesmail.elsevier.com [mailto:ees.ejc.0.2965e2.3fff46f4@eesmail.elsevier.com] Em nome de European Journal of Cancer

Enviada em: quinta-feira, 22 de maio de 2014 11:23

Para: Jarbas Rodrigues de Oliveira

Assunto: European Journal of Cancer: Submission Confirmation for Antitumor effect and the inflammatory response of gallic acid treatment in HepG2 Cells

Dear Mr. Oliveira

Thank you for your submission entitled "Antitumor effect and the inflammatory response of gallic acid treatment in HepG2 Cells" has been received by the European Journal Of Cancer

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ejc/>.

Your username is: jarbas.oliveira

If you need to retrieve password details please go to: http://ees.elsevier.com/ejc/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Regards

Yours sincerely

EJC Editorial Office
European Journal Of Cancer