

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia

EFEITO DOS COMPONENTES OBTIDOS DE *Qualea multiflora* SOBRE MODELO
TUMORAL MAMÁRIO MURINO E SUA INFLUÊNCIA NO SISTEMA
IMUNOLÓGICO

Bolsista: Camila Bernardes de Andrade Carli

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Imunologia Clínica e apresentada ao Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara, com auxílio de bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C282e Carli, Camila Bernardes de Andrade
Efeito dos componentes obtidos de *Qualea multiflora* sobre modelo tumoral mamário murino e sua influência no sistema imunológico / Camila Bernardes de Andrade Carli. – Araraquara, 2012
108 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

1. *Qualea multiflora*. 2. Inflamação. 3. Câncer de mama. 4. Citocinas. 5. Angiogênese. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Agradecimientos

*Agradeço aos meus pais, amigos, colegas de trabalho e ao meu
marido por todo apoio e dedicação em todas as etapas
deste meu trabalh.o.*

Agradeço a minha orientadora Iracilda Zeppone Carlos pelos anos de dedicação.

Agradeço à FAPESP pelo suporte financeiro

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLO.....	VIII
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
<i>CAPÍTULO I</i>	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Plantas no Tratamento do Câncer.....	9
2.2 Sistema Imunológico.....	12
3.OBJETIVO.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 Obtenção de FT de <i>Qualea multiflora</i>	17
4.2 Obtenção das soluções a serem utilizadas nos ensaios Biológicos.....	18
4.3 Animais.....	19
4.4 Obtenção de macrófagos do exsudato peritoneal.....	19
4.5 Obtenção dos linfócitos	20
4.6 Cultivo da linhagem LM3.....	20
4.7 Avaliação da Citotoxicidade em cultura de macrófagos.....	21
4.8 Avaliação da citotoxicidade em cultura de linfócitos.....	22
4.9 Avaliação da citotoxicidade em linhagem tumoral LM3.....	22
4.10 Inoculação das Células Tumorais e Tratamento.....	23

4.11 Grupos de Estudo.....	24
4.12 Avaliação do volume e inibição tumoral.....	24
4.13 Análise Histopatológica dos Tumores.....	25
4.14 Análise da Angiogênese.....	25
4.15 Determinação da presença de mitoses.....	26
4.16 Determinação de Bcl-2 por imunofluorescencia direta.....	27
4.17 Deteminação da inibição da produção de óxido nítrico (NO).....	27
4.18 Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	28
4.19 Determinação das citocinas IL-1, IL-12 e TNF- α	29
4.20 Análise dos Resultados.....	31

5. RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular de macrófagos, linfócitos e LM3.....	32
5.2 Determinação do volume e inibição tumoral.....	47
5.3 Análise macroscópica e microscópica do tumor.....	49
5.4 Determinação da presença de mitose.....	50
5.5 Grau de Angiogênese Tumoral.....	53
5.6 Determinação de Bcl-2.....	55
5.7 Determinação da inibição de NO.....	57
5.8 Determinação da inibição de TNF- α	59
5.9 Determinação da inibição de IL-1.....	61
5.10 Determinação da inibição de IL-12.....	63
5.11 Avaliação dos Parâmetros tumorais.....	65

6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÕES.....	75
8. REFERÊNCIAS.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à FT em diversas concentrações.

Tabela 2: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à AE em diversas concentrações.

Tabela 3: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à LP em diversas concentrações.

Tabela 4: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à FR em diversas concentrações.

Tabela 5: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à LN em diversas concentrações.

Tabela 6: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à TX em diversas concentrações.

Tabela 7: Parâmetros tumorais após tratamento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma das atividades desenvolvidas

Figura 2: Viabilidade de macrófagos, linfócitos e células LM3, frente à exposição à FT obtida a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*

Figura 3: Viabilidade de macrófagos, linfócitos e células LM3, frente à exposição à LP, um dos constituintes de FT.

Figura 4: Viabilidade de macrófagos, linfócitos e células LM3, frente à exposição à FR, um dos constituintes de FT.

Figura 5: Viabilidade de macrófagos, linfócitos e células LM3, frente à exposição à LN obtida a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*.

Figura 6: Viabilidade de macrófagos, linfócitos e células LM3, frente à exposição à TX obtida a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*.

Figura 7: Inibição do crescimento tumoral após o tratamento com FT, LP, LN, FR e TX.

Figura 8: Microscopia tumoral.

Figura 9: Mitose em células tumorais.

Figura 10: Quantidade de células em mitose nos tumores tratados com FT, LP, LN, FR TX e solução salina PBS.

Figura 11: Avaliação da angiogênese tumoral.

Figura 12: Grau de angiogênese tumoral dos tumores tratados com FT, LP, LP, FR, TX e solução salina PBS.

Figura 13: Bcl-2 por imunofluorescência do corte histológico de tumores tratados com derivados de *Q. multiflora*

Figura 14: Presença de Bcl-2 em corte histológico dos tumores tratados com FT, LP, LP, FR, TX e solução salina PBS

Figura 15: Inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos a TX e FT, LP, LN e FR obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*

Figura 16: Inibição da produção de TNF- α em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos a TX e FT, LP, LN, FR obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*.

Figura 17: Inibição da produção de IL-1 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos a TX e FT, LP, LN e FR obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*.

Figura 18: Inibição da produção de IL-12 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos a TX e FT, LP, LN e FR obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µmols	Micromols
AE	Ácido Elágico
ANOVA	Análise de variância
CO ₂	Dióxido de carbono
Cnos	Óxido nítrico sintetase constitutiva
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FT	Fração Terpênica
LP	Lupeol
LN	Lupenona
FR	Friedelina
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
LM3	Linhagem de adenocarcinoma de mama
LP07	Linhagem de adenocarcinoma de pulmão
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	Mililitros

MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Nuclear Factor κB
ng/mL	Nanogramas por mililitro
Nm	Nanometro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura – série 1640)
TX	Taxol
Th1	Tipo de linfócito T <i>helper</i>
Th2	Tipo de linfócito T <i>helper</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta

RESUMO

Nos últimos vinte anos, os quimioterápicos naturais foram introduzidos no tratamento do câncer e com estas novas perspectivas, vem aumentando o interesse das indústrias farmacêuticas em produtos de origem natural. Além disso, existe um grande interesse na identificação de novos agentes antineoplásicos, que possuam ação citotóxica seletiva associada à atividade imunomodulatória. Neste contexto, o presente estudo investiga possíveis efeitos farmacológicos de *Qualea multiflora* Mart (Vochysiaceae), utilizada na medicina popular do cerrado para o tratamento de úlceras, gastrites, amebíase, diarreia com sangue, cólicas intestinais e inflamações. A partir de resultados *in vitro*, propôs-se avaliar um tratamento *in vivo* em modelo tumoral mamário murino empregando-se uma fração terpênica (FT) derivada de *Qualea multiflora* (*Q. multiflora*) e as substâncias isoladas presentes nesta fração, lupeol (LP), lupenona (LN) e friedelina (FR), concomitantemente à avaliação dos efeitos imunológicos das substâncias testadas nos animais portadores de tumor. Os resultados parciais do presente estudo mostraram que as substâncias isoladas LP, LN e FR e a fração FT, na maioria das concentrações testadas, não apresentaram efeito tóxico *in vitro* sobre as células imunes, macrófagos e linfócitos. No entanto, LP, LN, FR e FT apresentaram excelente atividade citotóxica contra a linhagem tumoral LM3. AE não mostrou efeito tóxico *in vitro* contra a linhagem LM3. Por outro lado, a droga padrão Taxol (TX), apresentou pouco efeito tóxico contra a linhagem tumoral LM3, e acentuado efeito citotóxico contra macrófagos, indispensáveis à contenção tumoral. A partir destes resultados foram selecionadas as concentrações ideais para tratamento *in vivo*. Os resultados mostraram expressiva inibição do volume tumoral quando os animais foram tratados. Em seguida, a análise histológica tumoral foi realizada, demonstrando grandes

áreas de necrose no centro dos tumores, com presença marcante de infiltrado neutrofílico. Foram também realizadas análises sobre a presença de mitoses por campo. Esta determinação mostrou grande diminuição no número de mitoses/campo após os tratamentos realizados quando comparado com o controle PBS. A determinação da angiogênese nos tumores mostrou que praticamente não houve diferença entre o controle PBS e os tratamentos com os derivados de *Q. multiflora*, no entanto os tumores tratados com a droga padrão TX apresentaram grande aumento de proliferação de vasos se comparados ao controle. Os resultados referentes à determinação de Bcl-2 indicaram que essa molécula anti-apoptótica está pouco presente nos cortes histológicos dos tumores tratados com FT, LP, LN, FR e TX, mas é mais frequente nos tumores tratados com solução salina (PBS). Em relação à atividade imunomoduladora dos compostos testados, observamos que todos os derivados de *Q. multiflora* apresentaram atividade inibitória sobre os macrófagos, importante para a contenção tumoral, através da inibição expressiva dos mediadores NO, TNF- α , IL-1 e IL-12. No entanto a droga padrão TX não apresentou esse efeito desejado. Contudo, estes resultados propõem uma importante atividade antitumoral *in vivo* e vantagem do uso dos derivados de *Q. multiflora* frente à droga padrão TX, mostrando-se claramente menos tóxicos e mais efetivos.

Palavras chave: *Qualea multiflora*, inflamação, câncer de mama, citocinas, angiogênese.

ABSTRACT

In the last twenty years, natural chemotherapeutic treatment were introduced into treatment of cancer and with these new perspectives, it has been increasing the interest of pharmaceutical products from natural origin. Moreover, there is great interest in identifying new anticancer agents that have selective cytotoxic activity associated with immunomodulatory activity. In this context, this study investigates possible pharmacological effects of *Qualea multiflora* (*Q. multiflora*) Vochysiaceae family, used in folk medicine of Brazilian cerrado in the treatment of ulcers, gastritis, amebiasis, bloody diarrhea, intestinal pain and inflammation. From *in vitro* results, this study proposed to evaluate an alternative form of treatment for breast cancer employing a terpenic fraction (FT) derived from the chloroform extract of *Q. multiflora* and the isolated compounds present in this fraction, Ellagic Acid (EA), lupeol (LP), Lupenona (LP) and friedelin (FR) in an *in vivo* model of murine breast cancer concurrently to assess the immunological effects of the substances tested in animals with tumor. Partial results of this study showed that the isolated compounds AE, LP, LN and FR and FT fraction, most of the concentrations tested, showed no toxic effect *in vitro* on immune cells, macrophages and lymphocytes. However, LP, LN, FR and FT showed excellent cytotoxic activity against tumor line LM3. AE showed no toxic effect *in vitro* against strain LM3. Moreover, the standard drug Taxol (TX) showed little toxic effect against LM3 type of tumor, and marked effect against cytotoxic macrophages necessary for the containment of the tumor. From these results we selected the optimal concentrations for *in vivo* treatment. The results showed significant inhibition of tumor volume when the animals were treated. Then the tumor histology was performed, showing large necrotic areas of tumors in the center, with a

marked presence of neutrophilic infiltration. We also performed analyzes on the presence of mitoses. This determination showed significant inhibition of mitosis with the treatments compared with the control PBS. The determination of angiogenesis in tumors showed no statistical difference between PBS control and treatment with the derivatives of *Q. multiflora*, however tumors treated with the drug TX pattern showed a large increase of the proliferation of blood vessels compared to control. The results concerning the determination of Bcl-2 indicated that this anti-apoptotic molecule is hardly present in histological sections of tumors treated with FT, LP, LN, RF and TX, but is more frequent in untreated tumors. For immunomodulatory activity of the tested compounds, we observed that all derivatives of *Q. multiflora* showed anti-inflammatory activity, important to contain tumor by significant inhibition of NO mediators, TNF- α , IL-1 and IL-12, however the drug did not show this pattern TX desired effect. However, these results suggest an important antitumor activity in vivo and advantage of using derivatives of *Q. multiflora* against the standard drug TX, showing clearly less toxic and more effective.

Key words: *Qualea multiflora*, inflammation, breast tumor, cytokines, angiogenesis.

1. INTRODUÇÃO

Sendo o segundo tipo mais freqüente no mundo, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 52.680 novos casos de câncer de mama são estimados para 2012 (INCA, 2012). No entanto, os tratamentos usualmente utilizados são agressivos e podem também provocar efeitos deletérios nas células imunológicas indispensáveis ao desenvolvimento de uma resposta imune efetiva (MALIK et al., 2009; FRAZIER et al., 2010). Assim, há um interesse crescente pela descoberta de novos medicamentos destinados ao combate seletivo às células tumorais associado à atividade moduladora do sistema imunológico. Este sistema é representado por uma vasta diversidade celular capaz de produzir centenas de mediadores responsáveis pelos diversos tipos de respostas imunológicas contra agentes agressores (CARLI et al., 2009; ZHANG et al., 2010, EVERS et al., 2010, CORTIS et al., 2010).

Dentro das respostas desencadeadas em conseqüência às agressões ao hospedeiro, o processo inflamatório se destaca dentro do contexto tumoral. Isto porque, embora a inflamação atue como uma defesa adaptativa do hospedeiro contra infecções ou lesões, a resolução inadequada de respostas inflamatórias freqüentemente conduz a doenças crônicas, incluindo câncer (MANTOVANI, 2009; WALDNER et al., 2010; ROJAS et AL., 2010; GRIVENNIKOV et al., 2010; TRINCHIERI, 2012). A busca incessante de respostas que comprovem a interligação entre os processos inflamatórios e os vários estágios do tumor, incluindo iniciação, promoção, conversão à malignidade, invasão e metastasis, tem revelado que a inflamação crônica é um fator predisponente a diversos tipos de câncer (GRIVENNIKOV et al., 2010). Assim, estudos mostram que mais de 20% de todos os

tipos de câncer estão ligados a infecção crônica e que em alguns casos, a inflamação pode diminuir o efeito da quimioterapia e induzir a progressão tumoral (AGGARWAL et al., 2009; AMMIRANTE et al., 2010).

Alguns componentes inflamatórios estão presentes no microambiente da maioria dos tecidos neoplásicos, incluindo aqueles tumores em que não é bem estabelecida a relação causal entre o desenvolvimento tumoral e condições inflamatórias. Com o objetivo de instituir uma analogia entre inflamação e o microambiente tumoral foram criados marcadores desta relação que são representados pela infiltração de células hematológicas da série branca, presença de citocinas e quimiocinas e ocorrência de remodelação tecidual e angiogênese (MANTOVANI et al., 2007; ALLAVENA et al., 2008; GRIVENNIKOV et al., 2010, ANDREU et al., 2010; PARADISI & MEHLEN, 2010; WAY and KUO, 2012)

Os macrófagos desempenham importantes funções na contenção de agentes agressores, sendo um dos principais constituintes do sistema imune inato envolvido na defesa do hospedeiro. Além disso, os macrófagos são imprescindíveis mediadores entre imunidade inata e adaptativa através do processamento e apresentação de antígeno às células T e liberação de moléculas moduladoras, direcionando desta maneira a imunidade adaptativa para uma resposta celular (Th_1) ou humoral (Th_2) (IONTCHEVA et al., 2004).

No entanto, estudos mostram que os macrófagos são as principais células leucocitárias encontradas no microambiente tumoral e que sua presença está relacionada ao crescimento do tumor. Nos casos de câncer de mama a infiltração de macrófagos fazem parte de uma característica molecular que compõem o mau prognóstico do desenvolvimento da doença (MANTOVANI et al., 2007; ALLAVENA et al., 2008; SICA et al., 2008; QIAN & POLLARD; 2010; SOLINAS et al., 2010; ZHANG et al., 2010, BROWN et al., 2012). Esta associação dos macrófagos ao ambiente tumoral auxilia no

comportamento maligno das células neoplásicas não apenas pela produção de citocinas, mas também através da liberação de fatores de crescimento e enzimas degradadoras de matrix, estimulando assim a neovascularização tumoral (MANTOVANI et al., 2007; WYCKOFF et al., 2007; YANG et al., 2008; PINA et al., 2010; U'REN et al., 2010; BROWN et al., 2012). Portanto, a dualidade de características positivas e negativas dos macrófagos sobre este microambiente nos instiga à busca de substâncias capazes de gerenciar e modular estas distintas características.

Uma vez ativados no sítio tumoral, os macrófagos iniciam a produção de citocinas, espécies reativas do oxigênio e nitrogênio e eicosanóides. Tal estimulação resulta na síntese de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO). Estudos anteriores descrevem o envolvimento de níveis elevados de iNOS na carcinogênese, incluindo iniciação, promoção, progressão, metástase e angiogênese tumoral (CHEN e STONER, 2004; GOCHMAN et al., 2012). Em alguns tipos de tumores, incluindo o de mama, inibidores da iNOS vem sendo utilizados na prevenção da angiogênese e além disto, a terapia para prevenção de metástases no câncer pode ser acompanhada pela inativação da iNOS (XIE e FIDLER, 1998; JADESKI e LALA, 1999; RAO et al., 2002; KOHNO et al., 2007; GOCHMAN et al., 2012).

Além da produção de NO, os macrófagos tumorais disparam sinais moleculares citoplasmáticos capazes de estimular a expressão de citocinas. Estas moléculas são peptídeos endógenos de pequeno peso molecular, amplamente envolvidos na modulação da resposta imune, com funções essenciais na comunicação intercelular e em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos. As citocinas modulam a inflamação e a imunidade regulando o crescimento e a diferenciação de leucócitos e células não leucocitárias (OPPENHEIM et al., 1994, FEDERICO et al., 2007).

Algumas citocinas apresentam características moduladoras da progressão do tumor, principalmente através da indução do processo metastático das células tumorais, afetando diversas etapas da disseminação celular e de sua implantação em sítios secundários (GIAVAZZI et al., 1990; LUO et al., 2007; MANTOVANI et al., 2008; KULBE et al., 2012). Estudos mostram que o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), produzido por macrófagos está envolvido em características malignas de um tumor, uma vez que ratos nocautes para o gen TNF- α apresentam resistência a câncer de pele (HAGEMANN et al., 2004; KULBE et al., 2012). De maneira semelhante, a interleucina-1 (IL-1), produzida por macrófagos, pode ser capaz de aumentar a capacidade metastática de células de melanoma, de tumor mamário e prostático através da estimulação da angiogênese local (LIN et al., 2001; TRINCHIERI, 2012). A citocina IL-12, produzida por macrófagos, desempenha um papel crítico na determinação da natureza da resposta imune a antígenos endógenos ou exógenos, direcionando o sistema imunológico à resposta imune Th₁ (BARNES, 2003; MARKIEWICZ et al., 2009). Contudo, podemos notar que as citocinas interagem entre si, criando um ambiente favorável ou desfavorável ao crescimento tumoral, e por esta razão é desejado associar à uma droga antitumoral a capacidade imunomodulatória destas citocinas objetivando a contenção e regressão neoplásica.

Além da avaliação da atividade imunomoduladora, outro aspecto importante a ser analisado é o efeito de substâncias antitumorais sobre a angiogênese, uma vez que os endotélios linfáticos e vasculares são as principais rotas de disseminação metastática de células neoplásicas. A angiogênese tumoral é freqüentemente ativada nos estágios pré-neoplásicos e é controlada por diversos reguladores positivos e negativos, incluindo as citocinas, produzidos por células neoplásicas e leucócitos associados ao tumor. Dentre estes

leucócitos, os macrófagos podem exercer um papel pró ou anti-angiogênico na função e formação dos vasos sanguíneos. Em geral, as características pró-angiogênicas dos macrófagos prevalecem no microambiente tumoral, através principalmente da produção de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-20 (VOEST et al., 1995; PORTA et al., 2007). Assim, algumas plantas têm a capacidade de modular indiretamente a angiogênese através da inibição de citocinas pró-angiogênicas e/ou da produção de moléculas anti-angiogênicas (RAINA et al., 2008; LOPEZ, 2009; HE et al., 2009; PAK et al., 2009; LUQMAN et al., 2012).

Por outro lado, certas substâncias apresentam efeito direto na inibição da angiogênese através de certas vias moleculares. Micropartículas de curcumina apresentou potente atividade anti-angiogênica no ensaio da membrana corioalantóica (YADAV et al., 2009). Utilizando o mesmo ensaio, Liu e colaboradores (2008) concluíram que terpenóides da planta *Bletilla striata* apresentam atividade inibitória da angiogênese através da indução de apoptose em células endoteliais vasculares. Semelhantemente em outro estudo, pesquisadores demonstraram o efeito anti-angiogênico direto do extrato etanólico de *Saururus chinensis* (YOO et al., 2008).

Para compreender o mecanismo de ação antitumoral de uma droga é necessário investigar o processo molecular desencadeado a partir das características citotóxicas desta substância. Uma mudança em qualquer parâmetro vital, ocasionada por exemplo por uma substância antitumoral, pode desencadear o stress celular, que é uma adaptação essencial às condições anormais celulares. No entanto, se as mudanças nos parâmetros vitais são maiores do que o stress celular pode gerenciar, a célula sofre apoptose. A apoptose, ou morte celular programada, é caracterizada por uma série de eventos morfológicos, como

redução do tamanho da célula, condensação nuclear, segregação da cromatina, brotamento da membrana, fragmentação em corpos apoptóticos, seguida de rápida fagocitose pelas células vizinhas (SARASTE e PULKKI, 2000; KOSHKARYEV et al., 2012). Se o dano for ainda maior, a célula sofre uma morte necrótica em que ocorre a perda imediata da integridade da membrana e das organelas celulares, liberando o conteúdo intracelular, o que induz a uma reação inflamatória secundária em resposta aos restos celulares liberados (ZONG e THOMPSON, 2006; KOSHKARYEV et al., 2012).

Aprofundando-se a estes conceitos, a família protéica Bcl-2 é composta por reguladores positivos e negativos de morte programada. Os membros desta família que apresentam características inibitórias da apoptose, tais como Bcl-2, são superexpressos em muitos tipos de cânceres contribuindo para a iniciação e progressão tumoral e resistência à terapia (DANIEL e KORSMEYER, 2004; YOULE e STRASSER, 2008; LAI et al., 2012). Desta maneira, A redução de Bcl-2 aumenta a sensibilidade à drogas antineoplásicas e a sobrevivência *in vivo* e por esta razão o desenvolvimento de substâncias inibitórias de Bcl-2 tem sido extensivamente explorado (LETAI et al., 2004; BECATTINI et al., 2004; LAI et al., 2012)

Entre os produtos naturais, o ácido betulínico apresenta atividade antitumoral relacionada a habilidade em disparar vias pró-apoptóticas nas células neoplásicas (GALLUZZI et al., 2006). Estudos recentes mostram uma indução da apoptose em células de carcinoma hepatocelular tratadas com a molécula triterpênica lupeol (ZHANG et al., 2009). De maneira semelhante, a planta *Withania somnifera* apresentou atividade estimulatória da apoptose em ambas vias moleculares intrínseca e extrínseca (MALIK et al., 2009).

No desenvolvimento de pesquisas que objetivam a investigação de novas terapias antitumorais, em modelo animal *in vivo*, é indispensável definir a via de administração da droga utilizada nestes estudos. Trabalhos recentes têm utilizado a via de inoculação intra-tumoral (i.t.) incluindo terapias gênicas no tratamento de adenocarcinoma de colon (células CT26) e carcinoma nasofaríngeo, terapias virais contra câncer renal, inoculação de inibidores de proteína quinases em câncer de fígado, terapia fotodinâmica em carcinoma de células escamosas (SCC), entre outras (HOANG-LE et al., 2009; LI et al., 2006; DHAR et al., 2009; HANAJIRI et al., 2009; OTA et al., 2008; LAMBIN et al., 2012). Idani e colaboradores (2000) trataram fibrossarcoma murino (linhagem celular Meth-A) tanto por via intravenosa (i.v.) como i.t. com doxorubicina e observaram que a inoculação i.t. teve significativa inibição do crescimento tumoral quando comparada à inoculação i.v. Além disso, os pesquisadores observaram que a inoculação i.t. da doxorubicina teve poucos efeitos colaterais nos animais portadores de tumor.

Sendo o grande alvo deste estudo, *Qualea multiflora* Mart (Vochysiaceae) é uma árvore do Cerrado de aproximadamente 10 metros que possui flores brancas e amarelas, conhecida popularmente como pau-terra-liso (www.pirenopolis.tur.br, acessado em 15/03/2012). Baseado em dados coletados entre a população rural do Cerrado a respeito do uso empírico desta planta como antiinflamatório foi possível inicialmente, direcionar o estudo para o provável potencial terapêutico, considerando a inexistência de relatos na literatura sobre seus efeitos farmacológicos.

Com base em promissores resultados a respeito da atividade antitumoral *in vitro* e antiinflamatória de *Q. multiflora* obtidos desde 2003 (IC e mestrado), em 2009 iniciou-se outra etapa do projeto (doutorado) com o objetivo de realizar ensaios antitumorais *in vivo*, utilizando modelo experimental de câncer de mama murino previamente estabelecido

(KINOUCI, 2006), administrando intratumoralmente a fração terpênica (FT), lupeol (LP), lupenona (LN) e friedelina (FR), uma vez que foi avaliado a atividade antitumoral *in situ* através de parâmetros relacionados ao desenvolvimento tumoral e à resposta imunológica dos animais expostos a estas substâncias.

Para tanto, antes de realizar testes como objetivo de avaliar a imunomodulação das substâncias testadas e principalmente antes de induzir os tumores nos animais para que os mesmo fossem tratados com as amostras estudadas, foi imprescindível avaliar a toxicidade destes componentes frente às células LM3, macrófagos e linfócitos. Para só então, poder escolher a melhor concentração de cada substância para o tratamento dos tumores. Com isso, garantimos que a concentração escolhida tenha citotoxicidade apenas às células tumorais e não às células imunológicas, indispensáveis à contenção tumoral.

Após a determinação da concentração ideal de tratamento de cada substância, foram realizados ensaios *in vivo* para avaliar se o tratamento dos tumores com as substâncias estudadas é eficaz na contenção tumoral. Além disso, as análises histológicas dos tumores foram realizadas considerando os parâmetros, mitose, angiogênese, Bcl-2 e características morfológicas em geral. Testes de avaliação do efeito dos derivados de *Q. multiflora* sobre o sistema imunológico de animais portadores de tumor foram também realizados para que fosse possível traçar um perfil imunológico de cada substância em estudo.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas no tratamento do câncer

A busca de drogas antitumorais obtidas a partir de plantas iniciou-se no início dos anos 50 com a descoberta e desenvolvimento dos alcalóides da vinca, vinblastina e vincristina. Como resultado, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) iniciou um extensivo programa de coleta de plantas em 1960, focado principalmente em regiões temperadas. Este fato levou a descoberta de diversas moléculas que mostravam uma amplitude de atividades citotóxicas, incluindo taxanos e camptotequinas. Este programa obteve término em 1982, porém o desenvolvimento de novas tecnologias para realização de triagens das atividades biológicas conduziu a reativação da coleta de plantas e outros organismos em 1986, com o foco em regiões sub-tropicais e tropicais de todo o mundo. (CASSADY and DOUROS, 1980).

Algumas plantas possuem atividade antitumoral não apenas relacionadas a atividade citotóxica contra as células tumorais, mas também possui ação moduladora do sistema imunológico. Para compreender este contexto é necessário aprofundar os conhecimentos que relacionam o câncer com algumas situações patológicas inflamatórias. Para tanto é importante conhecer a dinâmica entre condições inflamatórias, reparo tecidual e proliferação celular.

Em condições patológicas onde há uma grande migração de células inflamatórias para o local de agressão tecidual, a proliferação celular é potencializada enquanto o tecido se regenera. Neste microambiente rico em células antiinflamatórias e fatores de crescimento, algumas células podem sofrer dano em seu DNA e dependendo da região de dano molecular podem desenvolver um descontrole no processo de divisão celular. Portanto, a relação causal entre inflamação, imunidade inata e câncer é largamente

aceita, contudo muitos mecanismos moleculares e celulares que mediam esta relação permanecem não esclarecidos (COUSSENS e WERB, 2002; TRINCHIERI, 2012).

Acredita-se que a inflamação contribui com o desenvolvimento de pelo menos 15% de todos os cânceres (MARX, 2004; WAY and KUO, 2012). Portanto, os medicamentos antiinflamatórios possuem uma utilização emergente como quimioterápicos na prevenção e no tratamento de cânceres humanos, além de estarem associados a diminuição dos riscos de surgimento de câncer de mama, pulmão e cólon (DUPERRON e CASTONGUAY, 1997; MARNETT, 1992; SHARPE et al., 2000; POUDYAL et al., 2012).

Contudo, as plantas possuem características atrativas para o uso na prevenção do câncer, pois possuem uma margem de segurança em termos de toxicidade aparentemente grande quando comparadas aos antiinflamatórios não-esteroidais. Plantas têm sido usadas há muito tempo e, ainda assim, poucos relatos de efeitos adversos em seus usuários são conhecidos. Se um antiinflamatório não-esteroide natural é seguro para o uso comum, futuros protocolos de prevenção do câncer podem envolver a combinação desses antiinflamatórios naturais com os quimicamente desenvolvidos, permitindo o uso de doses reduzidas dos medicamentos químicos (WARGOVICH et al., 2001).

O resveratrol, encontrado no vinho tinto, pôde inibir a atividade do NF- κ B e induzir a apoptose das células transformadas, reduzindo a mortalidade nas doenças coronarianas e em certos tipos de câncer. Esse componente quimiopreventivo atua bloqueando o início da inflamação e da oncogênese (HOLMES-McNARY e BALDWIN JR, 2000). Essa substância também mostrou forte efeito inibitório na geração de NO por macrófagos ativados (TSAI et al., 1999). Além disso, compostos presentes no chá verde

(*Camellia sinensis*), *milk thistle* (*Silybum marianum*) e *Curcuma longa* L foram avaliados em modelos animais de carcinogênese e mostraram bons resultados. Essas plantas além de possuírem atividade antiinflamatória possuem compostos anticarcinogênicos e antimutagênicos (WEISBURGER et al., 1998; MANNA et al., 1999). Estudos sobre efeito de uma fração hexânica de Ginseng sobre cancer intestinal foram realizados recentemente; neste, foi concluído que esta fração possui importante atividade antiinflamatória além de ter efeitos antiapoptóticos sobre as células tumorais.

2.2 Sistema imunológico

A atividade protetora contra microorganismos ou partículas estranhas é essencial para a manutenção da vida de humanos e animais. Esta proteção é realizada através do sistema imunológico, que se apresenta sempre em vigília contra agentes agressores. Para que este objetivo seja alcançado, milhares de substâncias são lançadas no organismo, na tentativa de conter o processo inflamatório e/ou infeccioso. As células imunológicas são responsáveis pela liberação destas moléculas efetoras e dentre estas células os macrófagos possuem importante papel na contenção do agente agressor, sendo uma das principais células do sistema imune inato, envolvidas na defesa do hospedeiro. Além de possuir papel de destaque na imunidade inata, estas células se comportam como importantes intermediadores da imunidade inata e adaptativa. Em particular, os macrófagos são responsáveis pelo processamento e apresentação de antígeno às células T antígeno específicas. (IONTCHEVA et al., 2004; JOKE and KRAAL et al., 2012)

Uma vez ativadas, estas células iniciam a produção de citocinas, espécies reativas do oxigênio e nitrogênio e eicosanóides. Nos macrófagos, o LPS é o estímulo melhor caracterizado para a indução de genes transcricionais codificadores de proteínas pró-inflamatórias. Tal estimulação resulta em síntese de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO). O radical NO, produzido pela iNOS através da conversão de L-Arginina em L-citrulina, desempenha um papel central nas reações inflamatórias. (MACMICKING et al., 1997). Estudos anteriores descrevem o envolvimento de níveis elevados de iNOS na carcinogênese, incluindo iniciação, promoção, progressão, metástase e angiogênese tumoral (GOCHMAN et al., 2012). Além disto, este mediador tem sido reconhecido como importante mensageiro em

diversas funções patofisiológicas, incluindo transmissão neuronal, relaxamento vascular e modulação imune (LOWENSTEIN et al., 1996; NATAN, 1987).

As citocinas são peptídeos endógenos de pequeno peso molecular amplamente envolvidos na resposta imune. Estas moléculas solúveis liberadas por linfócitos e células do sistema fagocitário, são essenciais na comunicação intercelular e em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Elas também modulam a inflamação e a imunidade regulando o crescimento e a diferenciação de leucócitos e células não leucocitárias (OPPENHEIM et al., 1994; DUBIN et al., 2012). Além disso, possuem um importante papel na patogênese de uma variedade de doenças inflamatórias e auto-imunes (DINARELLO et al., 1993; FELDMANN et al., 1996; GIBSON, 2004; SCHACHNA, 2004; DUBIN et al., 2012).

O TNF- α é uma citocina que possui importantes efeitos biológicos em uma variedade de células, efeitos na maioria relacionados a processos imunomodulatórios e inflamatórios (CASALE et al., 1996; KULBE et al., 2012). Atua na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções. Essa molécula ainda tem a capacidade de induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e várias quimiocinas (PALLADINO et al., 2003; TRINCHIERI, 2012).

A IL-1 é produzida principalmente por monócitos e macrófagos e possui uma ampla gama de atividades biológicas, entre elas, o aumento da quimiotaxia de linfócitos T e B, estimulação da síntese de tromboxanos por neutrófilos e macrófagos, indução de proteínas de fase aguda, ativação de linfócito T e aumento da produção de anticorpos pelas células B. (BIRD et al., 2002; DINARELLO, 1988; MIZEL, 1982; FALKOFF et al., 1983; TRINCHIERI, 2012).

A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina produzida por macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno em resposta a estimulação por uma série de microorganismos e seus produtos. Possui atividades biológicas múltiplas principalmente através de linfócitos T e células NK, induzindo a produção de interferon- γ (IFN- γ). Evidências sugerem um papel importante da IL-12 em modelos roedores de patogênese de doenças autoimunes mediadas por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1), como esclerose múltipla, artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais e na forma aguda da doença do enxerto versus hospedeiro (TRINCHIERI e SCOTT, 1999; CHEN et al., 2012). Durante a inflamação ou resposta imune, a capacidade da IL-12 em modular a expressão de receptores de citocinas nos linfócitos provavelmente afeta a sensibilidade dessas células a cascata de citocinas (TRINCHIERI, 1994; CHEN et al., 2012).

Ainda dentro do contexto do sistema imunológico, é importante destacar a importância do mediador NO e de todas as citocinas já descritas em processos patológicos como a inflamação. A inflamação é o resultado da resposta do hospedeiro a patógenos ou danos teciduais e geralmente resulta em restauração das funções e estruturação do tecido normal. As respostas inflamatórias normalmente são auto-limitadas por um processo que envolve a regulação negativa de mediadores e citocinas pró-inflamatórias e regulação positiva de citocinas antiinflamatórias (LAWRENCE et al., 2002; TRINCHIERI, 2012). Portanto, a inflamação aguda é um processo limitado e benéfico, enquanto que a inflamação crônica é um fenômeno persistente que pode desencadear o desenvolvimento de doenças inflamatórias tais como, bronquite, gastrite, esclerose múltipla e artrite reumatóide (VERNOOY et al., 2002; SAKAGAMI et al., 1997; FICHTNER-FEIGL et al., 2005; KLOTZ et al., 2005; PONCHEL et al., 2002; KAPLANSKI et al., 2003). Desta maneira, vem crescendo a busca de substâncias capazes de modular a resposta inflamatória sem

causar os efeitos tóxicos indesejados pelas drogas antiinflamatórias atualmente utilizadas (POUDYAL et al., 2012).

3.OBJETIVOS

3.1 Gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos tratamentos tumorais sobre os animais portadores de tumor mama. Para tanto, um modelo tumoral mamário murino foi induzido nos camundongos através da inoculação de células tumorais LM3 e estes foram então tratados, utilizando FT e seus constituintes isolados LP, LN e FR presentes na planta *Q. multiflora* Mart (Vochysiaceae), além do controle positivo (TX) e negativo (PBS). Após os tratamentos os animais foram sacrificados e os tumores retirados. Estes tumores foram então avaliados considerando a taxa de inibição tumoral, análise histopatológica, mitose, angiogênese e presença de Bcl-2. Além disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito destes tratamentos sobre o sistema imunológico dos animais portadores de tumor através da determinação da inibição da produção de NO, TNF- α , IL-1 e IL-12 pelos macrófagos peritoneais murinos.

3.2 Específicos

- Determinar a concentração de tratamento intratumoral *in vivo* de cada substância através da avaliação da citotoxicidade *in vitro* de FT, LP, LN, FR e TX frente aos macrófagos, linfócitos e células LM3.
- Avaliar a taxa de inibição do crescimento dos tumores tratados com as substâncias FT, LP, LN, FR e TX quando comparados ao tratamento com salina (PBS).

- Verificar a presença de mitose nos tumores tratados com as substâncias FT, LP, LN, FR, TX e PBS através da análise microscópica de cortes histológicos corados com hematoxilina/eosina.
- Verificar a presença de angiogênese através da análise microscópica de cortes histológicos corados com hematoxilina/eosina.
- Verificar a presença de células marcadas com Bcl-2 em corte histológico tumoral, através da técnica de imunofluorescência.
- Determinar a produção de NO e das citocinas IL-1 β , IL-12, TNF- α , em sobrenadantes de culturas de células do exsudato peritoneal de camundongos.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção de FT de *Qualea multiflora*.

As cascas da planta *Q. multiflora* foram coletadas na região do cerrado, no estado de Tocantins pela Dr. Clélia Akiko Hiruma-Lima. A identificação da espécie foi realizada pela Dr. Solange de Fátima Lolis, catalogadas com o número de exsicata 4158 e depositada no herbário de Universidade de Tocantins (HTINS)

O preparo de FT obtida de *Q. multiflora* foi realizado, no Instituto de Química (IQ) da UNESP. A espécie vegetal foi seca em estufa a 40 °C, triturada em moinho de facas, e extraída sucessivamente com clorofórmio (3L) através de maceração sucessiva e sequencial por 28 dias, com 4 ciclos de 7 dias, quando a mesma deixou de apresentar

coloração. Em evaporador rotatório obteve-se o extrato bruto seco após a evaporação completa do solvente.

O extrato bruto clorofórmico foi fracionado em coluna sílica gel utilizando-se gradiente crescente de polaridade (hexano→clorofórmico→metanol), fornecendo a fração terpênica estudada neste projeto. Após esta etapa, para confirmar a presença das substâncias presentes em FT, foi realizada cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). Desta maneira, na fração terpênica (FT) foram identificadas as substâncias lupeol, lupenona e friedelina. Considerando o baixo rendimento do isolamento destas substâncias a partir da fração terpênica (FT), as substâncias isoladas LP, LN e FR foram compradas da Sigma-Aldrich[®].

4.2 Obtenção das soluções a serem utilizadas nos ensaios biológicos

FT, LP, LN, FR foram primeiramente diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) para a realização dos testes. Foram preparadas soluções-mãe para todos os compostos testados. A partir da solução-mãe foram feitas diluições seriadas em meio de cultura (RPMI-1640). No máximo, 4% de DMSO foram utilizados (concentração anteriormente testada em ensaio de citotoxicidade).

4.3 Animais

Fêmeas de camundongo Balb/c, pesando entre 18-25g, foram adquiridas do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP, São Paulo. Estes animais foram mantidos em gaiolas em grupos de 5, com condições estáveis de ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar) e ciclos de 12 horas com e sem luz. Os animais receberam água e ração (Purina) esterilizadas, *ad libitum*. Os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 . Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo ao Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (17/2009).

4.4 Obtenção de macrófagos do exsudato peritoneal

Os camundongos foram previamente estimulados através da inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3% (Difco), três a quatro dias antes da coleta das células. Após esse período, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 . A coleta do exsudato peritoneal foi realizada em fluxo laminar classe 100 (Veco). O líquido peritoneal foi coletado com tampão fosfato PBS pH 7,2 em seringa e agulha e transferido para tubo estéril (Corning, Inc) para lavagem das células, centrifugando-se três vezes a 200 xg durante 5 minutos em centrífuga (Fanem), a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e as células sedimentadas foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI-1640-C (Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 μL de estreptomicina, 100 μL de penicilina e 2 mM de L – glutamina e assim designado como meio completo (RPMI-1640-C). O número de células foi

determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany), sendo ajustado à concentração desejada para cada ensaio em meio RPMI-1640-C.

4.5 Obtenção dos linfócitos

Os animais foram eutanasiados em estufa de CO₂ e em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco) tiveram a pele da região abdominal retirada e o peritônio aberto para a extração dos linfonodos axiais, mesentérico e periaórtico, com auxílio de pinça de metal. Os linfonodos foram retirados e macerados em malha de nylon em uma placa de Petri estéril (Corning, Inc.) contendo 3,0 mL de RPMI-1640-C, gelado, para liberação das células. Após este procedimento as células foram transferidas para tubo cônico estéril (Corning, Inc.) de 15,0 mL e centrifugadas em RPMI-1640-C três vezes a 2000 rpm por 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). As células sedimentadas foram novamente ressuspendidas em 1,0 mL de meio RPMI-1640-C e a contagem do número de células foi feita em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) através da técnica de exclusão com Azul de Trypan a 0,04%.

3.6 Cultivo da linhagem LM3

A linhagem tumoral de adenocarcinoma murino LM3, foi cedida pela Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, do Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina. Esta linhagem celular foi obtida a partir de subculturas primárias de adenocarcinoma murino de células mamárias. A linhagem tumoral de adenocarcinoma murino LM3 foi mantida em

cultura através de repiques três vezes por semana em meio MEM (Minimum Essential Medium, Gibco), acrescentando-se 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma).

4.7 Avaliação da citotoxicidade em cultura de macrófagos

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMAN, 1983).

A uma placa de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 μ L por cavidade das suspensões de célula do exsudato peritoneal de camundongos, ajustadas à concentração de $5 \cdot 10^6$ células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C em presença de 100 μ L de FT, LP, FR e TX, além de 100 μ L de LPS a 0,5 μ g/mL (controle positivo) ou somente 100 μ L meio de cultura RPMI-1640-C, em triplicata. As placas foram incubadas por 48h a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após essa incubação, o sobrenadante foi descartado e as células aderentes lavadas com PBS e depois tratadas com 100 μ L de uma solução de MTT (Across Organics) a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi então incubada por mais 3h nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 μ L de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em

espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620nm.

4.8 Avaliação da citotoxicidade em cultura de linfócitos

Aliquotas de 100µL das suspensões de linfócitos foram adicionadas em microplaca de 96 cavidades. Foram adicionados à cultura 100µL de FT, LP, FR e TX. A incubação foi realizada em estufa a 37°C contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific) por 48h. A seguir foram adicionados a cada cavidade, 20µL de uma solução concentrada de MTT (5mg/mL em meio RPMI), incubando por mais 3 horas. Após este procedimento, as placas foram centrifugadas a 800xg durante 10 minutos a 10°C em centrífuga refrigerada (Hettich). Os sobrenadantes foram retirados por aspiração com o auxílio de uma micropipeta, descartados e na cultura foram adicionados 100µL de álcool isopropílico (Mallinckrodt) em cada cavidade. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/visível (Multiskan Ascent, Labsystems) em comprimento de onda de 570nm (BAUTISTA et AL., 2000).

4.9 Avaliação da citotoxicidade em linhagem tumoral LM3

O crescimento celular foi quantificado através do ensaio de MTT, previamente descrito. As células foram desprendidas da garrafa de cultura celular com tripsina, lavadas e transferidas para microplacas de 96 na concentração de 3.10^4 células/mL. 190µL da suspensão celular tumoral foram adicionadas aos poços e incubadas a 37 °C com pressão constante de 5% CO₂. As microplacas contendo as células foram pré-incubadas por 24h

para permitir sua estabilização para a adição de amostras. Depois deste período 100µL de FT, LP, FR e TX foram adicionados e incubados por 48 h nas mesmas condições citadas acima. Apenas meio de cultura MEM foi usado como controle negativo e considerado 100% de viabilidade. Após a cultura o meio foi trocado por outro contendo 1mg/mL de MTT. Após 3h, o meio foi removido e 100µL de isopropanol (Mallinckrodt) foram adicionados para solubilizar os cristais de formazana formados. A absorvância foi quantificada em 540 nm, com filtro de referência de 620 nm em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) (MOSMANN, 1983).

4.10 Inoculação das Células Tumorais e Tratamento

A linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murino LM3, foi gentilmente cedida pela Dra. Elisa Bal Kier Joffé, do Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina. A linhagem celular foi obtida e a indução tumoral foi realizada através da inoculação subcutânea de 10^6 células, segundo Kinouchi (2006). Os tratamentos dos tumores foram realizados após 15 dias da realização da indução tumoral, ou quando o tumor estivesse com aproximadamente 10 mm de comprimento. As substâncias FT (2 mg/mL), LP (0,5 mg/mL), LN (2 mg/mL), FR (1 mg/mL), TX (0,0625 mg/mL) e solução salina PBS foram inoculadas intratumoralmente por 2 vezes, com intervalos de 5 dias. O sacrifício dos animais para retirada dos tumores foi realizado 7 dias após o último tratamento. Cada animal foi tratado, de acordo com as especificações dos grupos de estudo.

4.11 Grupos de Estudo

Os animais foram distribuídos em grupos:

Grupo I: tratamentos com PBS – controle negativo

Grupo II: tratamentos com FT

Grupo III: tratamentos com LP

Grupo IV: tratamentos com LN

Grupo V: tratamentos com FR

Grupo VI: tratamento com TX – controle positivo

4.12 Avaliação do volume e inibição tumoral

Após o sacrifício, os tumores foram retirados com auxílio de material cirúrgico, e medidos em seus diâmetros maior e menor utilizando paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper. O tumor também foi pesado com auxílio de uma balança não analítica (Boeco). O volume do tumor e o valor da inibição tumoral foram calculados pelas fórmulas (ZHOU et al.,1998):

$$\text{Volume} = 0,5 \times \text{diâmetro maior} \times (\text{diâmetro menor})^2$$

$$\text{Inibição tumoral} = (1 - V_1/V_2) \times 100$$

V_1 = Média dos volumes dos tumores tratados com as substâncias estudadas

V_2 = Média dos volumes dos tumores tratados com LPS (controle)

4.13 Análise Histológica dos Tumores

Os tumores removidos dos animais de estudos foram fixados em formol, e armazenado em álcool 70⁰. Após esta etapa foram feitas as inclusões dos tumores em parafina em posição adequada para obtenção de corte transversal no cento dos tumores. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5µm de espessura em um micrótomo Jung-Leica[®] RM2045 (Leica Microsystems GmbH, Alemanha). Todas as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas antes das colorações específicas.

A preparação das peças, os cortes histológicos e a coloração por H/E foram realizados pelo laboratório IPC em Araraquara. As lâminas foram então analisadas histopatologicamente e fotografadas com auxílio de microscópio com captura de imagem (Nikon Eclipse E200).

4.14 Análise da Angiogênese

O sistema de gradação para angiogênese por microscopia (MAGS) foi desenvolvido seguindo a técnica de Brem et al. (1972), modificado por Shankar et al. (2006). A vasoproliferação (KnN), a hiperplasia de células endoteliais (KeE) e a citologia endotelial (KxX) foram observadas esterometricamente em microscópio óptico em cortes de 5 m do tecido tumoral mamário fixados em formaldeído, desidratados usando etanol e xileno e embebidos em parafina, e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina, utilizando um aumento de 400 vezes. A pontuação foi calculada como: $MAGS = KnN + KeE + KxX$, onde as constantes são: $Kn = 1$, $Ke = 3$ e $Kx = 6$.

A vasoproliferação (KnN) possui um valor máximo de 40, com N sendo o número de capilares vistos sob o aumento de 400 vezes em cada campo. A hiperplasia de células endoteliais (KeE) possui valor máximo de 30, sendo E o número de células alinhadas na seção transversal do capilar, com valor máximo de 10. A citologia endotelial (KxX) possui um valor máximo de 30; X possui um valor entre 0 e 5 indicando a aparência histológica das células endoteliais na zona de hiperplasia, sendo 0 = célula endotelial normal; 1 = célula aumentada, 57 mas com núcleo normal e claro; 2 = célula aumentada, mas com núcleo claro e proeminente; 3 = célula com núcleo grande e hipercromático; 4 = células endoteliais “bizarras”; 5 = células que se apresentem como figura mitótica. A graduação MAGS calculada por esta fórmula varia entre 0 e 100, em valores arbitrários. Os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão em valores arbitrários, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo.

4.15 Determinação da presença de mitoses

A ocorrência de mitoses foi observada estereometricamente em microscópio óptico em cortes de 5 μ m do tecido tumoral mamário fixados em formaldeído, desidratados usando etanol e xileno e embebidos em parafina, e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina, utilizando um aumento de 400 vezes. Os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão do número de células em mitose em 5 campos aleatórios de cada animal, em 3 animais de cada grupo de estudo.

4.16 Determinação de Bcl-2

Metodologia baseada em LeBlanc et al. (2005). Cortes histológicos dos tumores (4 μm) de cada grupo foram utilizados para ensaios de imunofluorescência. Os tecidos foram fixados em formaldeído, desidratados usando etanol e xileno e embebidos em parafina. As células tumorais então foram marcadas por imunofluorescência direta para Bcl-2. Esta marcação foi realizada com anticorpos de camundongo anti-Bcl-2 marcados com FITC diluídos em PBS/BSA 1%, aplicados ao tecido por 2 horas em temperatura ambiente. As células fluorescentes foram contadas em 30 campos de visão sob aumento de 1000 vezes utilizando microscópio de fluorescência. Os resultados foram expressos em número de células positivas a cada 100 células contadas, em 30 campos contados, sob aumento de 1000 vezes em microscópio de fluorescência.

4.17 Deteminação da inibição da produção de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico, quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura, foi medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naphthyl-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%, utilizando NaNO_2 como padrão (GREEN et al., 1982). Os animais foram sacrificados como descrito anteriormente. A suspensão celular foi ajustada à 5.10^6 células/mL em meio de RPMI-1640-C, e foram distribuídos 100 μL dessa suspensão celular em placas de 96 cavidades estéreis (Corning Inc.). Na placa foram adicionados 100 μL da fração terpenoídica ou de β -sitosterol + 100 μL de uma solução de LPS a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como agente

estimulante, 100µL de LPS a 0,5µg/mL + 100µL de células (controle positivo). Em outras cavidades, foram adicionados 200µL de meio RPMI-1640-C à suspensão celular, como controle de células (controle negativo). A placa assim constituída foi incubada por 24, 48 e 72 hs em estufa a 37°C com tensão constante de CO₂ a 5% (Forma Scientific). Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 50µL de cada amostra, transferidas para uma outra placa e adicionados 50µL/cavidade de reagente de Griess. Após 10 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/visível de microplacas (Multiskan *Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) com filtro de 540nm. As concentrações de NO liberadas foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em meio RPMI-1640. Os testes foram feitos em triplicata e os valores expressos em µmol de NO/5.10⁵ células.

4.18 Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram utilizados na determinação da inibição da produção das citocinas IL-1, IL-12 e TNF-α. As células peritoneais foram ajustadas à concentração de 5.10⁶células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade foi adicionado 1mL da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 7,5% de CO₂. Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640.

Na avaliação da inibição da produção das citocinas IL-1, IL-12 e TNF- α foi adicionado às células aderentes 1mL de RPMI-1640-C, 1mL de FT, LP, LN, FR e TX e 1mL de LPS a 0,5 μ g/mL aos macrófagos que ficaram aderidos à placa. Da mesma forma, 1mL de LPS a 0,5 μ g/mL + 2mL de RPMI-1640-C foi utilizado como controle positivo e 3mL de RPMI-1640-C como controle de negativo.

Estas placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 7,5% de CO₂ por mais 24, 48 e 72 hs. Após esta incubação, o conteúdo das placas foi transferido para tubos do tipo *eppendorfs* que foram, em seguida, centrifugados a 7800 *xg* durante 10 minutos em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados em tubos do tipo *eppendorfs* e armazenados em freezer a -80° C até o momento da determinação das citocinas através do teste imunoenzimático, ELISA.

4.19 Determinação das citocinas IL-1, IL-12 e TNF- α .

As citocinas IL-1, IL-12 e TNF- α foram quantificadas nos sobrenadantes obtidos das culturas de macrófagos através do teste imunoenzimático ELISA de captura para cada citocina (Pharmigen), de acordo com as instruções do fabricante. As microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Corning Inc., NY) foram adsorvidas com um anticorpo de captura anti-IL-1, IL-12 e TNF- α de camundongo purificado obtido em ratos, na concentração de 4 μ g/mL (100 μ L/cavidade) diluído em tampão PBS e incubado “overnight” à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 (PBS) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Após a

lavagem, foram bloqueadas com 300 μ L de BSA a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas três vezes com PBS-T. Foram adicionados à placa 100 μ L da citocina padrão ou sobrenadantes das culturas de células peritoneais de camundongos. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos, e lavadas quatro vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 μ L/cavidade de anticorpo monoclonal de cabra anti-IL-1, IL-12 e TNF- α de camundongo marcado com biotina na concentração de 400 ng/mL em diluente de reagente (1%BSA, 0,05% de Tween 20 em tampão Tris-NaCl). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 μ L do conjugado peroxidase-streptavidina diluído em PBS/BSA e incubadas novamente à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse processo, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e 100 μ L do substrato (10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina [SIGMA] e 1,2 mM de H₂O₂) foram adicionados a cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50 μ L de H₂SO₄ 2N. A absorvância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan *Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) e as concentrações das citocinas foram quantificadas utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de IL-1, IL-12 e TNF- α padrão. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em picogramas/mL.

4.20 Análise dos Resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad InStat aplicando-se análise de variância (ANOVA) com determinação do nível de significância para $p < 0.05$, e através de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados usando seis animais e cada determinação foi executada em triplicata. Os gráficos foram confeccionados por intermédio do programa estatístico ORIGIN 5.0.

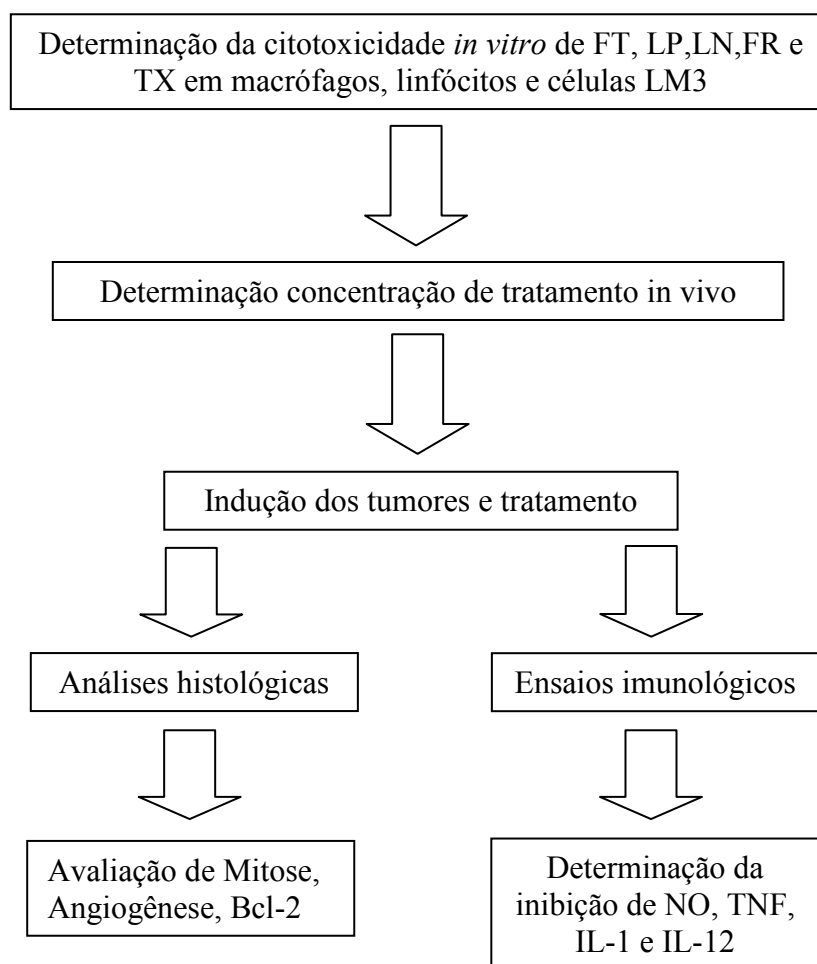


Figura 1: Fluxograma das atividades desenvolvidas

5. RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular de macrófagos, linfócitos e LM3

Os resultados iniciais deste estudo indicaram as concentrações ideais das substâncias estudadas para o tratamento dos animais portadores de tumor. Estas devem ser inócuas às células imunológicas e citotóxicas ao tumor.

Desta maneira, podemos destacar na Figura 2 e Tabela 1, que a substância FT praticamente não apresentou toxicidade aos macrófagos (viabilidade variando de 80.15 a 98.31%, nas diferentes concentrações) e linfócitos (100% de viabilidade em todas as concentrações). Por outro lado, a mesma substância apresenta alta toxicidade às células tumorais (viabilidade variando de 0 a 64.37%, nas diferentes concentrações).

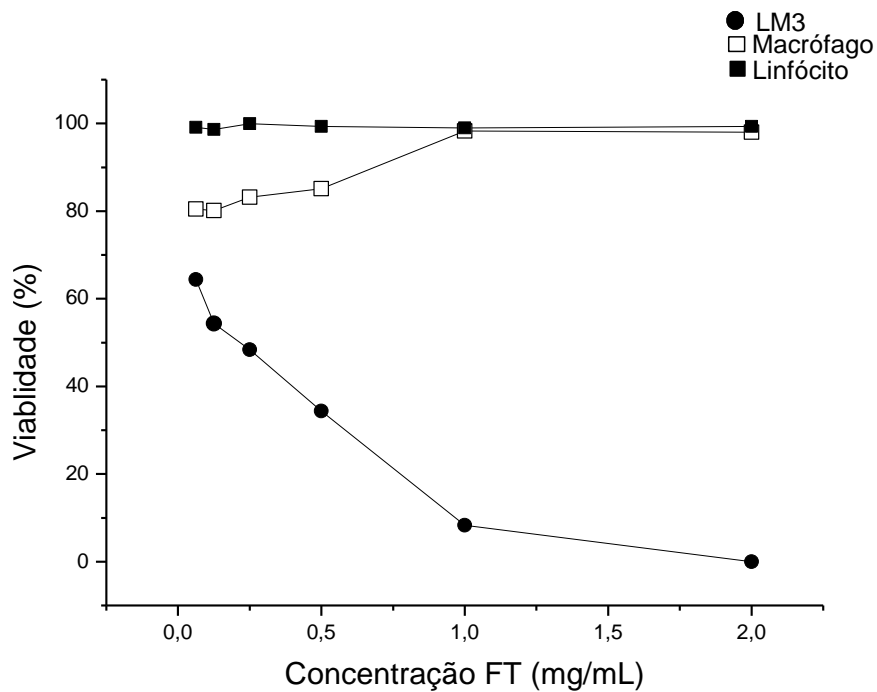


Figura 2: Viabilidade de macrófagos, linfócitos e células LM3, frente à exposição à FT obtida a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*. As células foram incubadas com as diferentes concentrações 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2mg/mL de FT e apenas meio de cultura RPMI-1640-C (Controle Negativo) pelo período de 48hs em estufa de CO₂ a 37°C. A viabilidade do controle negativo foi considerada 100%.

Tabela 1: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à FT em diversas concentrações.

FT	Macrófago	Linfócito	LM3
2 mg/mL	97.98 ± 7.95	99.32 ± 8.45	0.00 ± 0.00***
1 mg/mL	98.31 ± 5.24	98.99 ± 3.96	8.22 ± 1.35***
0.5 mg/mL	85.12 ± 6.47 *	99.31 ± 6.14	34.34 ± 2.67***
0.25 mg/mL	83,15 ± 5.77 *	99.97 ± 2.48	48.34 ± 2.15***
0.125 mg/mL	83,15 ± 4.91 *	98.64 ± 5.44	54.51 ± 3.47***
0.0625 mg/mL	80.47 ± 3.83 **	99.14 ± 7.37	64.37 ± 3.33***
Controle Negativo	100	100	100

Avaliação após 48 horas de incubação. Cada valor referente aos linfócitos e macrófagos representa a média ± desvio-padrão de seis animais realizados em triplicata. Os valores referentes às células LM3 representam a média ± desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata.

*** $p < 0,001$ quando comparada ao controle negativo (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

** $p < 0,01$ quando comparada ao controle negativo (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

* $p < 0,05$ quando comparada ao controle negativo (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

Na figura 3 e Tabela 2 podemos observar que LP apresentou pouca toxicidade aos macrófagos (viabilidade celular variando entre 65,25 e 99,49%), considerável toxicidade aos linfócitos nas concentrações mais elevadas (23,53 - 100% de viabilidade) e alta toxicidade às células LM3 em praticamente todas as concentrações (5,24 – 68,31%).

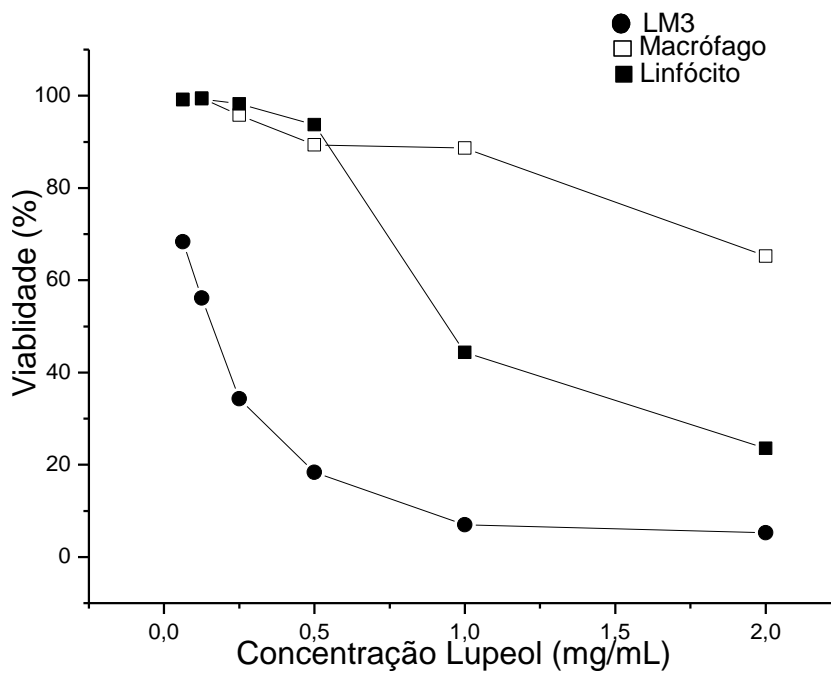


Figura 3: Viabilidade de macrófagos, linfócitos e células LM3, frente à exposição à LP, um dos constituintes de FT. As células foram incubadas com as diferentes concentrações 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2mg/mL de LP e apenas meio de cultura RPMI-1640-C (Controle Negativo) pelo período de 48hs em estufa de CO₂ a 37°C. A viabilidade do controle negativo foi considerada 100%.

Tabela 2: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à LP em diversas concentrações.

LP	Macrófago	Linfócito	LM3
2 mg/mL	65.25 ± 2.65***	23.53 ± 1.67***	5.24 ± 0.89***
1 mg/mL	88.64 ± 6.37	44.38 ± 2.94***	6.99 ± 0.97***
0.5 mg/mL	89.31 ± 6.11	93.70 ± 6.91	18.34 ± 2.54***
0.25 mg/mL	95.78 ± 5.55	98.21 ± 5.81	34.30 ± 1.97***
0.125 mg/mL	99.49 ± 6.91	99.31 ± 6.47	56.11 ± 3.75***
0.0625 mg/mL	99.17 ± 8.62	99.14 ± 7.28	68.31 ± 6.71***
Controle Negativo	100	100	100

Avaliação após 48 horas de incubação. Cada valor referente aos linfócitos e macrófagos representa a média ± desvio-padrão de seis animais realizados em triplicata. Os valores referentes às células LM3 representam a média ± desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata.

*** p<0,001 quando comparada ao controle negativo (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

A substância FR (Figura 4, Tabela 3) apresentou baixa toxicidade aos macrófagos (viabilidade celular variando de 53.14 - 98.47%), praticamente nenhuma toxicidade aos linfócitos (98.31 - 99.96%) e moderada citotoxicidade à linhagem celular LM3 (18.24 - 40.21%).

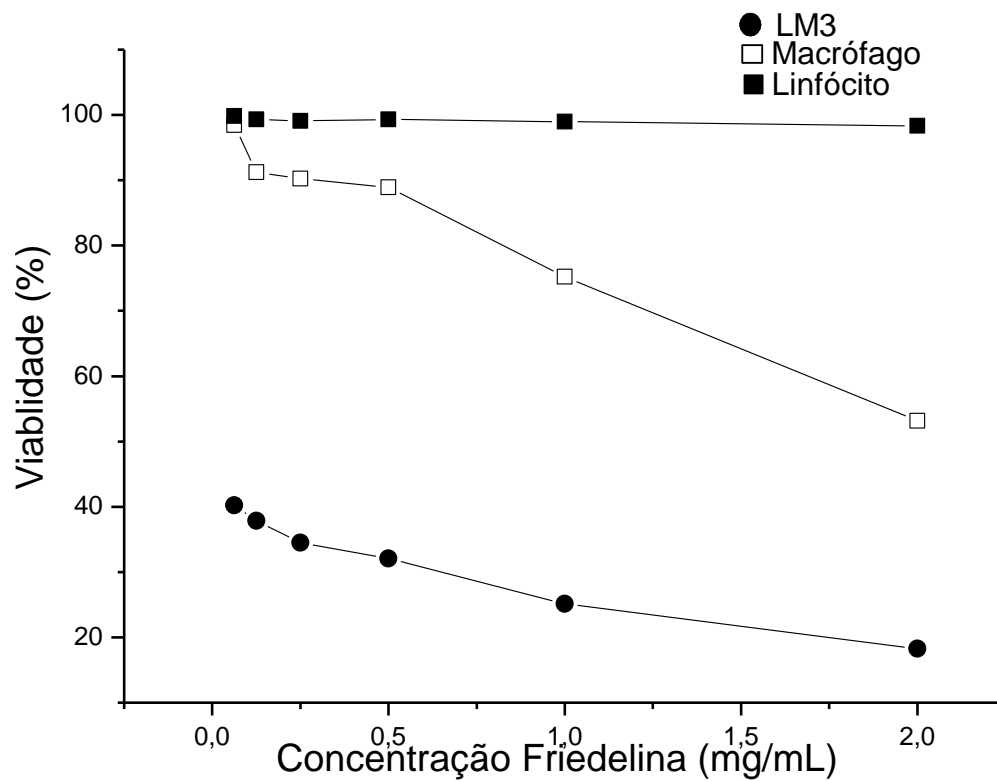


Figura 4: Viabilidade de macrófagos, linfócitos e células LM3, frente à exposição à FR, um dos constituintes de FT. As células foram incubadas com as diferentes concentrações 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2mg/mL de FR e apenas meio de cultura RPMI-1640-C (Controle Negativo) pelo período de 48hs em estufa de CO₂ a 37°C. A viabilidade do controle negativo foi considerada 100%.

Tabela 3: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à FR em diversas concentrações.

FR	Macrófago	Linfócito	LM3
2 mg/mL	53.14 ± 3.36***	98.31 ± 2.54	18.24 ± 0.99***
1 mg/mL	75.25 ± 4.48***	98.99 ± 6.71	25.13 ± 1.37***
0.5 mg/mL	88.91 ± 3.91	99.31 ± 3.86	32.08 ± 6.81***
0.25 mg/mL	90.24 ± 7.84	99.10 ± 2.99	34.48 ± 3.64***
0.125 mg/mL	91.24 ± 5.75	99.16 ± 5.94	37.83 ± 5.87***
0.0625 mg/mL	98.47 ± 6.16	99.86 ± 7.33	40.21 ± 7.19***
Controle Negativo	100	100	100

Avaliação após 48 horas de incubação. Cada valor referente aos linfócitos e macrófagos representa a média ± desvio-padrão de seis animais realizados em triplicata. Os valores referentes às células LM3 representam a média ± desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata.

***p<0,001 quando comparada ao controle negativo (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

A substância LN (Figura 5, Tabela 4) apresentou pouca citotoxicidade aos macrófagos (viabilidade variando de 87,56 a 99,98 %) e praticamente nenhuma toxicidade aos linfócitos (variação de 97,34 a 99,35 %). Por outro lado, a mesma substância apresenta alta toxicidade às células tumorais (viabilidade variando de 32,51 a 93,82 %).

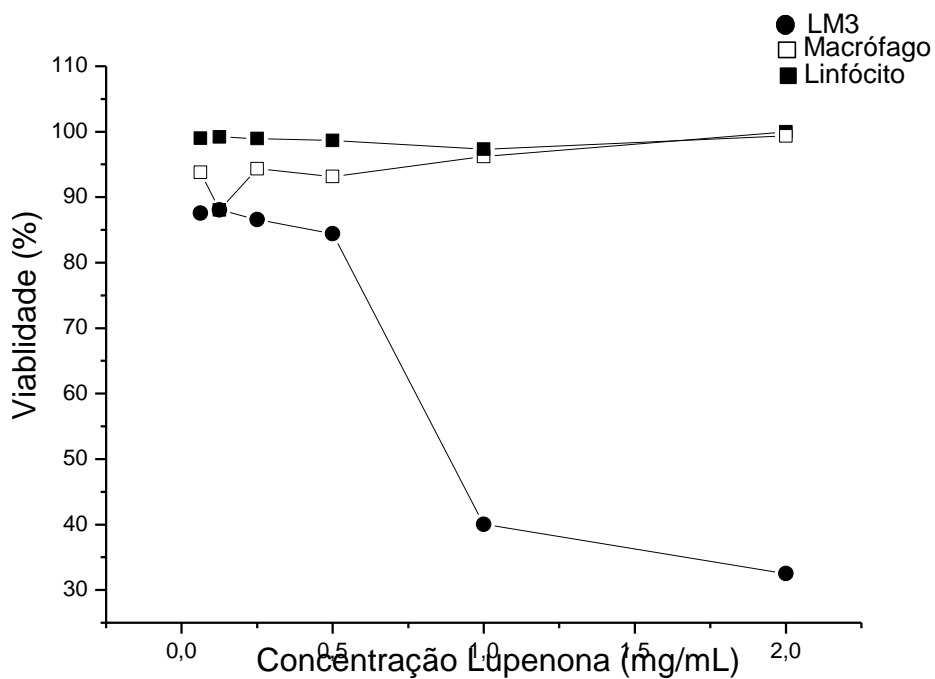


Figura 5: Viabilidade de macrófagos, linfócitos e células LM3, frente à exposição à LN obtida a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*. As células foram incubadas com as diferentes concentrações 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2mg/mL de LN e apenas meio de cultura RPMI-1640-C (Controle Negativo) pelo período de 48hs em estufa de CO₂ a 37°C. A viabilidade do controle negativo foi considerada 100%.

Tabela 4: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à LN em diversas concentrações.

LN	Macrófago	Linfócito	LM3
2 mg/mL	99,98 ± 2,35	99,35 ± 3,54	32,51 ± 1,89***
1 mg/mL	96,19 ± 4,54	97,34 ± 8,68	40,04 ± 2,87***
0,5 mg/mL	93,14 ± 6,16	98,68 ± 4,33	84,41 ± 6,13**
0,25 mg/mL	94,33 ± 1,89	98,97 ± 2,71	86,59 ± 4,64**
0,125 mg/mL	88,04 ± 3,74**	99,19 ± 2,87	88,03 ± 7,99**
0,0625 mg/mL	87,56 ± 4,91**	98,99 ± 7,36	93,82 ± 3,28
Controle Negativo	100	100	100

Avaliação após 48 horas de incubação. Cada valor referente aos linfócitos e macrófagos representa a média ± desvio-padrão de seis animais realizados em triplicata. Os valores referentes às células LM3 representam a média ± desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata.

*** $p < 0,001$ quando comparada ao controle negativo (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

** $p < 0,01$ quando comparada ao controle negativo (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

Quando observamos os resultados referentes à droga padrão TX, na Figura 6 e Tabela 5, notamos que esta substância apresenta considerável toxicidade aos macrófagos (viabilidade variando de 22.87 – 98.91%), nenhuma toxicidade aos linfócitos (98.65 – 99.86%) e média toxicidade às células tumorais LM3 (54.39 – 56.63%). Podemos ressaltar ainda, a alta toxicidade desta substância aos macrófagos em concentrações mais elevadas, nas quais as concentrações de 2 e 1mg/mL apresentaram respectivamente viabilidade de 22.87 e 30.41%, além da linearidade da atividade citotóxica contra as células LM3, cuja viabilidade variou entre 54.39 – 56.63%.

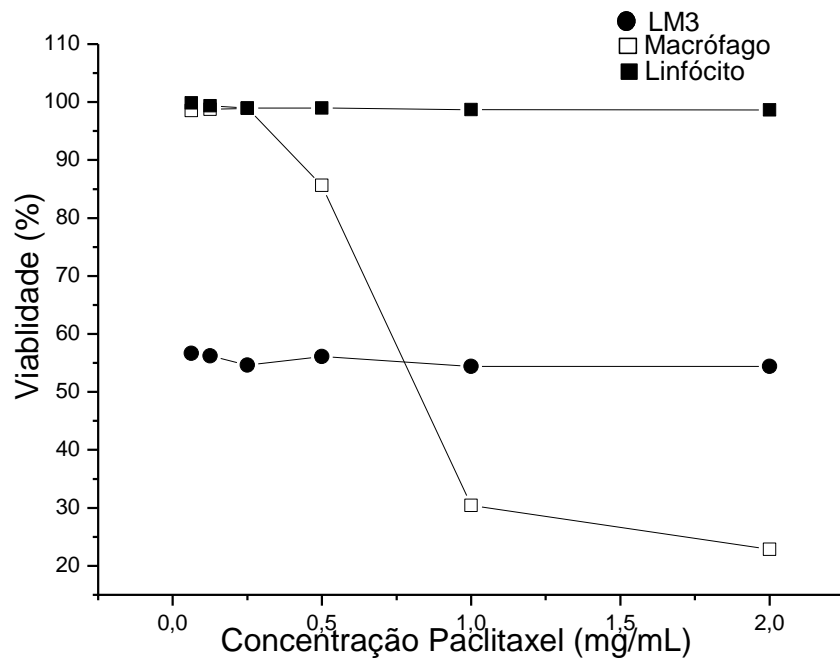


Figura 6: Viabilidade de macrófagos, linfócitos e células LM3, frente à exposição à droga padrão TX. As células foram incubadas com as diferentes concentrações 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2mg/mL da droga padrão TX e apenas meio de cultura RPMI-1640-C (Controle Negativo) pelo período de 48hs em estufa de CO₂ a 37°C. A viabilidade do controle negativo foi considerada 100%.

Tabela 5: Viabilidade de diferentes tipos celulares frente à TX em diversas concentrações.

TX	Macrófago	Linfócito	LM3
2 mg/mL	22.87 ± 3.94***	98,65 ± 6.81	54,39± 3.84***
1 mg/mL	30.41 ± 2.67***	98,67 ± 8.66	54,43 ± 4.27***
0.5 mg/mL	85.64 ± 8.37	98,99 ± 8.47	56,13± 3.99***
0.25 mg/mL	98.91 ± 5.70	98,95 ± 8.19	54,61± 3.76***
0.125 mg/mL	98.76 ± 8.33	99,34 ± 7.58	56,20± 5.80***
0.0625 mg/mL	98.54 ± 7.91	99.86 ± 5.84	56,63± 2.87***
Controle Negativo	100	100	100

Avaliação após 48 horas de incubação. Cada valor referente aos linfócitos e macrófagos representa a média ± desvio-padrão de seis animais realizados em triplicata. Os valores referentes às células LM3 representam a média ± desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata.

***p<0,001 quando comparada ao controle negativo (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

5.2 Determinação do volume e inibição tumoral

Na figura 7, os animais dos grupos que receberam o tratamento com os derivados de *Q. multiflora*, FT ($76,9 \pm 4,06\%$), LP ($61,05 \pm 4,72$), LN ($83,2 \pm 6,31$) e FR ($88,2 \pm 7,04$) tiveram uma maior inibição do crescimento tumoral em relação ao grupo que recebeu a droga padrão TX ($57,89 \pm 3,31$).

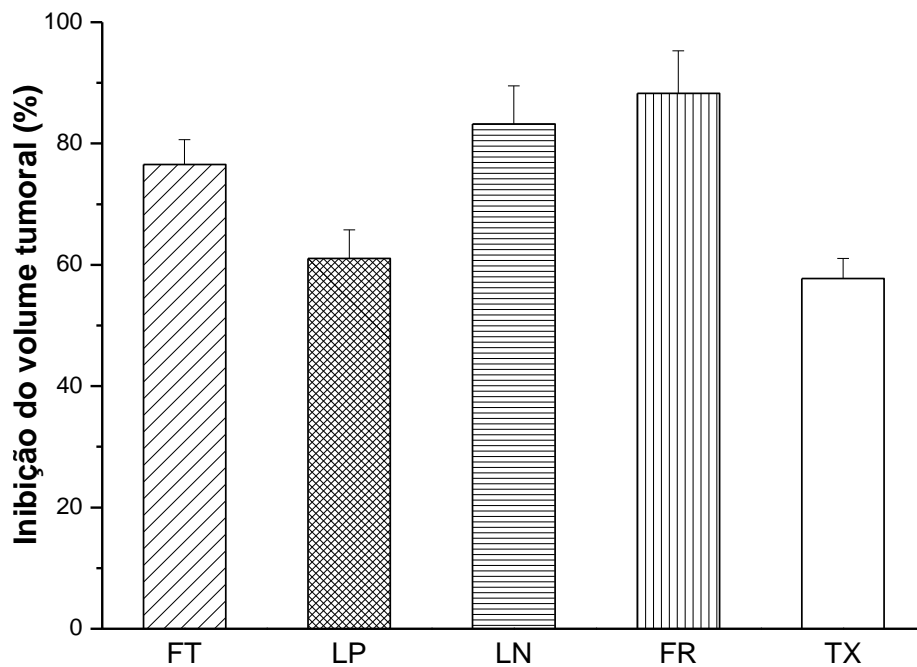


Figura 7: Inibição do crescimento tumoral após o tratamento com FT, LP, LN, FR e TX. Os tumores dos animais dos grupos FT, LP, FR e TX foram extraídos ao término do tratamento, pesados e medidos para cálculo do volume tumoral. A partir destes resultados, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento tumoral de cada grupo tratado quando comparado ao tratamento apenas com solução salina PBS. O valor é expresso em média \pm desvio padrão.

5.3 Análise macroscópica e microscópica do tumor

Foi observado macroscopicamente que o tumor é elíptico e pode crescer aderindo-se ao músculo da pata traseira do animal ou de forma mais isolada em relação a este, invadindo-o ou sem penetrar a musculatura. Exteriormente, tende a apresentar cor esbranquiçada ou amarelada, com grande presença de vasos sanguíneos. Em seu interior, apresenta regiões centrais de coloração mais arroxeadas e, às vezes, forma-se uma pequena cavidade contendo líquido escuro.

Microscopicamente, todos os tumores, independentemente do tratamento realizado, apresentam região central com presença notável de extensa área acidofílica de necrose (Figura 8, A) e na periferia, células tumorais viáveis com grande quantidade de vasos sanguíneos. Na região periférica, o tumor contém células atípicas, com diferença no tamanho celular, no tamanho dos núcleos e na intensidade de coloração do citoplasma (Figura 8, B). Além disto, estas células apresentam aumento no número de nucléolos. Há presença de mitoses em diversas regiões. Em algumas áreas dos tumores ocorre grande infiltrado inflamatório, com maior presença de neutrófilos na região central e com a ocorrência de poucos macrófagos na periferia.

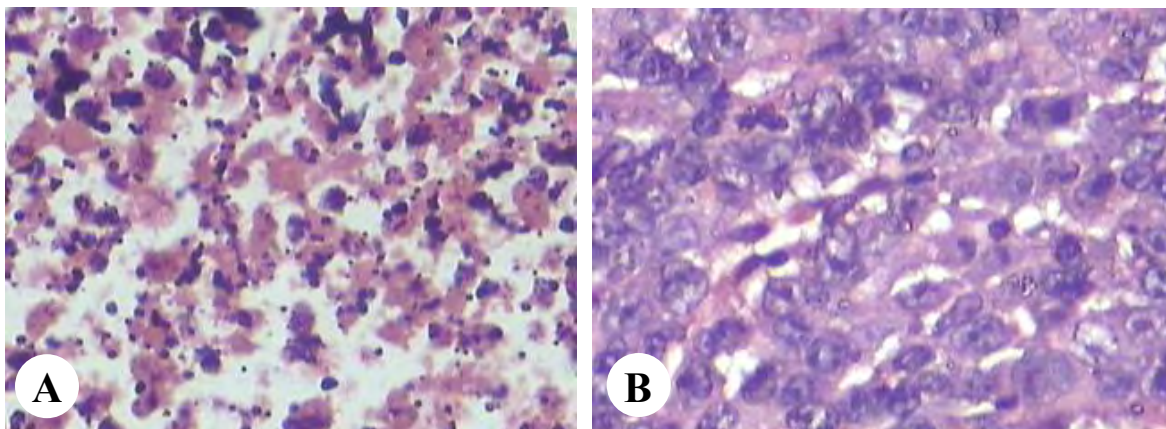


Figura 8: Microscopia tumoral. Coloração de hematoxilina/eosina (H/E), aumento de 400x.

A) Região central tumoral com extensa área de necrose (tratamento com PBS). B) Células atípicas, com diferença no tamanho celular, no tamanho dos núcleos e na intensidade de coloração do citoplasma (tratamento com PBS).

5.4 Determinação da presença de mitose

Quando comparada a quantidade de células em mitose em cada tumor (Figuras 9 e 10), observa-se que todos os grupos tratados apresentaram menor quantidade de mitose /campo quando comparados com o tratamento com salina PBS ($1,9 \pm 0,8$). No entanto, entre os tratamentos, os derivados de *Q. multiflora*, FT ($0,7 \pm 0,22$), LP ($1,15 \pm 0,56$), LN ($0,84 \pm 0,09$) e FR ($0,85 \pm 0,15$) apresentaram menos mitoses/campo relativamente ao tratamento com a droga padrão TX ($1,65 \pm 0,61$).

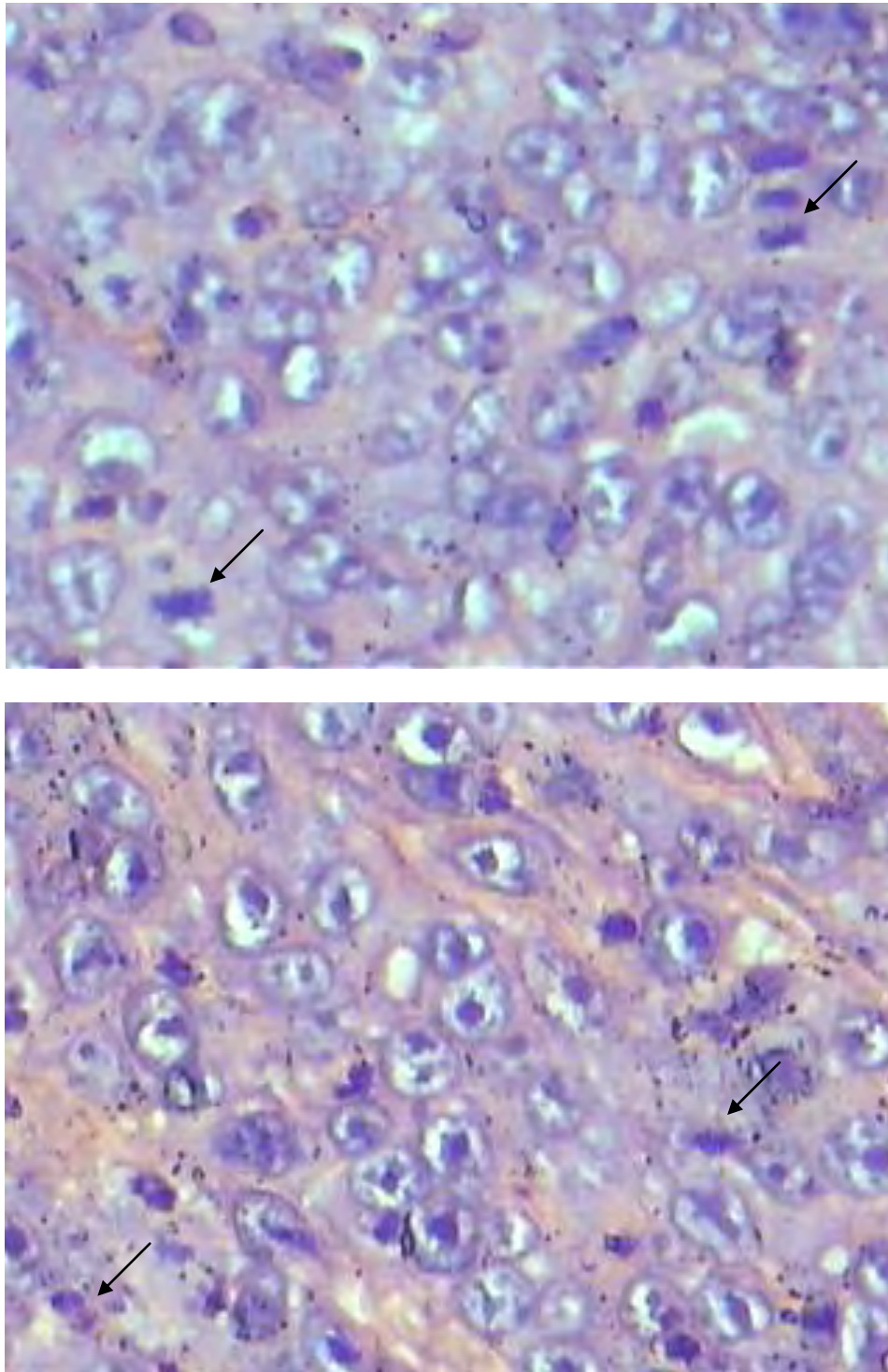


Figura 9: Mitose em células tumorais. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) e observadas sob aumento de 400x. As setas indicam células em mitose.

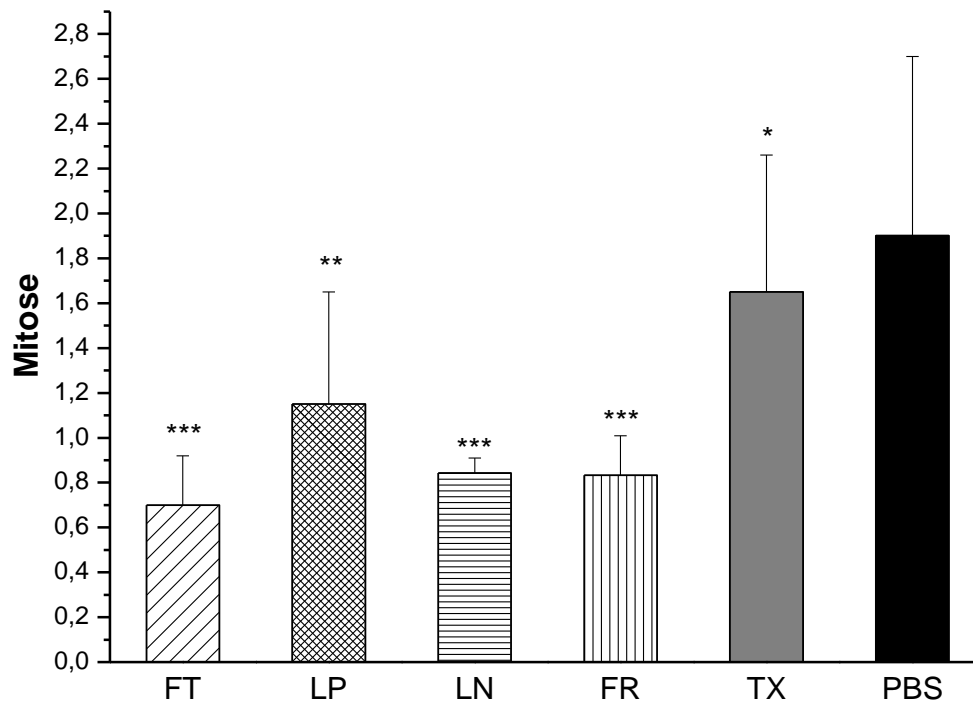


Figura 10: Quantidade de células em mitose nos tumores tratados com FT, LP, LN, FR, TX e solução salina PBS. As células em mitose foram contadas em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em números absolutos, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo.

*** $p < 0,001$ quando comparada ao tratamento com salina (PBS)

** $p < 0,01$ quando comparada ao tratamento com salina (PBS)

* $p < 0,05$ quando comparada ao tratamento com salina (PBS)

5.5 Grau de Angiogênese Tumoral

Os resultados do grau de angiogênese tumoral (Figura 11 e Figura 12) mostraram que não houve diferença significativa no grau de angiogênese dos tumores tratados com FT ($9,73 \pm 4,62$), LP ($8,69 \pm 3,84$), LN ($8,95 \pm 2,94$) e FR ($9,90 \pm 2,11$), comparativamente ao tratamento com solução salina PBS ($10,89 \pm 3,21$). No entanto, quando se compara estes tratamentos com a droga padrão TX, observa-se o aumento expressivo do grau de angiogênese nos tumores tratados com TX ($19,68 \pm 8,94$).

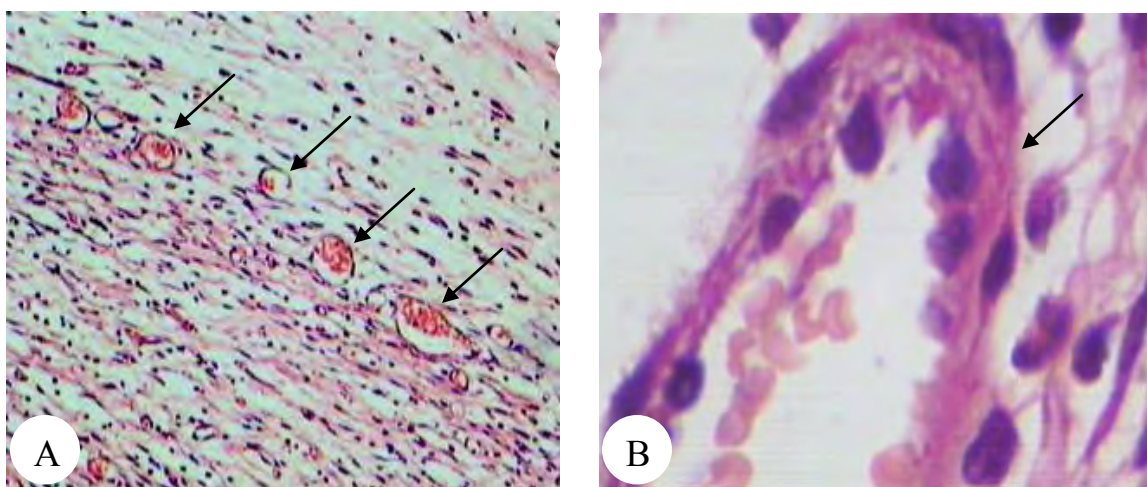


Figura 11: Avaliação da angiogênese tumoral. Coloração de hematoxilina e eosina (H/E). A) Vasos em um tumor tratado com LP no aumento de 100x. B) Vaso hiperplásico em tumor tratado com TX em aumento de 1000x. Setas indicando vasos.

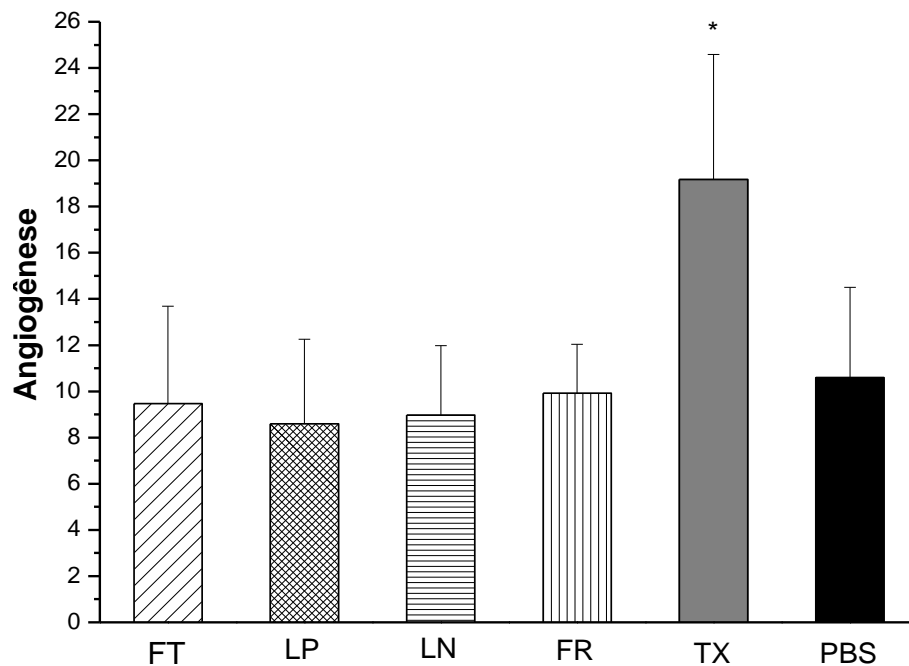
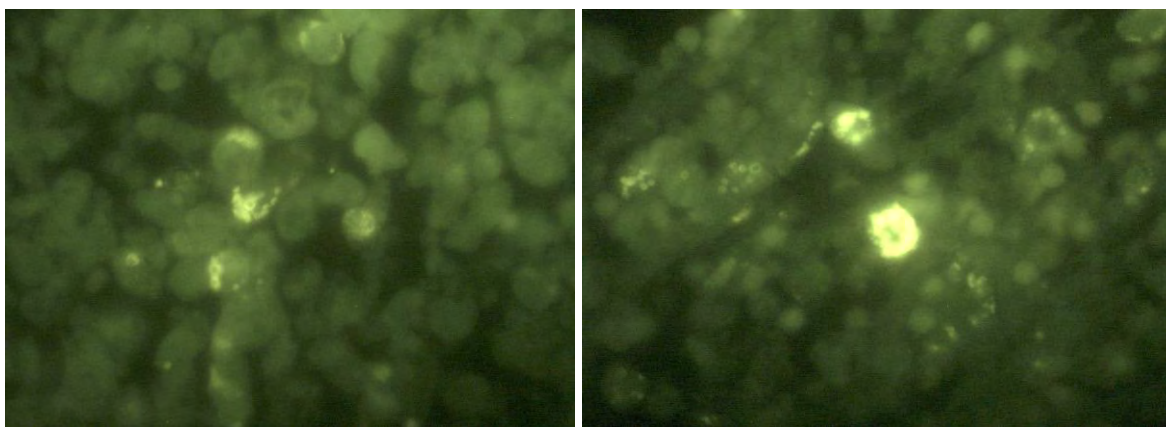


Figura 12: Grau de angiogênese tumoral dos tumores tratados com FT, LP, LN, FR, TX e solução salina PBS. O grau de angiogênese foi determinado em lâminas coradas com hematoxilina e eosina através do Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia (MAGS). Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em valores arbitrários, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo.

* $p < 0,05$ quando comparada ao tratamento com salina (PBS)

5.6 Determinação de Bcl-2

Os resultados referentes à determinação de Bcl-2 mostra pouca marcação para esta molécula de superfície com resultados inferiores a 10% (Figura 13). No entanto é possível observar na figura 14 que os tumores controles tratados com PBS apresentam maior presença desta marcação quando comparado com todas as outras amostras testadas.



A

B

Figura 13: Bcl-2 por imunofluorescência do corte histológico de tumores tratados com derivados de *Q. multiflora* A) Células marcadas com FITC, em corte histológico de tumor tratado com FR em aumento de 1000x. B) Células marcadas, em corte histológico de tumor tratado com TX em aumento de 1000x.

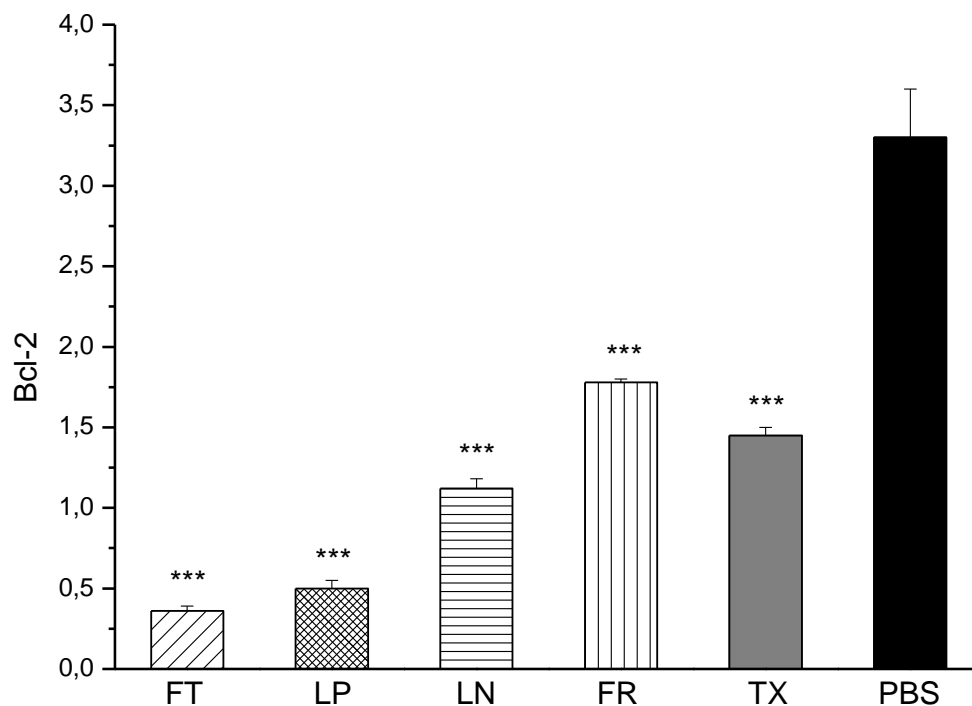


Figura 14: Presença de Bcl-2 em corte histológico dos tumores tratados com FT, LP, LN, FR, TX e solução salina PBS. A molécula de superfície Bcl-2 foi determinada através da técnica de imunofluorescência. Os resultados foram expressos em células marcadas/100 células contadas, obtidas em pelo menos 30 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo.

*** $p < 0,001$ quando comparada ao tratamento com salina (PBS)

5.7 Determinação da inibição de NO

Na avaliação da atividade inibitória de NO em macrófagos peritoneais de camundongos portadores de tumor, podemos verificar que FT (97,93%) e seus constituintes LN (87,24%) e FR (89,45%) apresentaram uma expressiva inibição deste mediador imunológico (Figura 15). LP, apesar de não apresentar uma resposta tão proeminente, também apresentou importante atividade inibitória da produção de NO com valor de 68,24%. Por outro lado, de maneira oposta aos derivados de *Q. multiflora*, a droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de NO pelos macrófagos peritoneais.

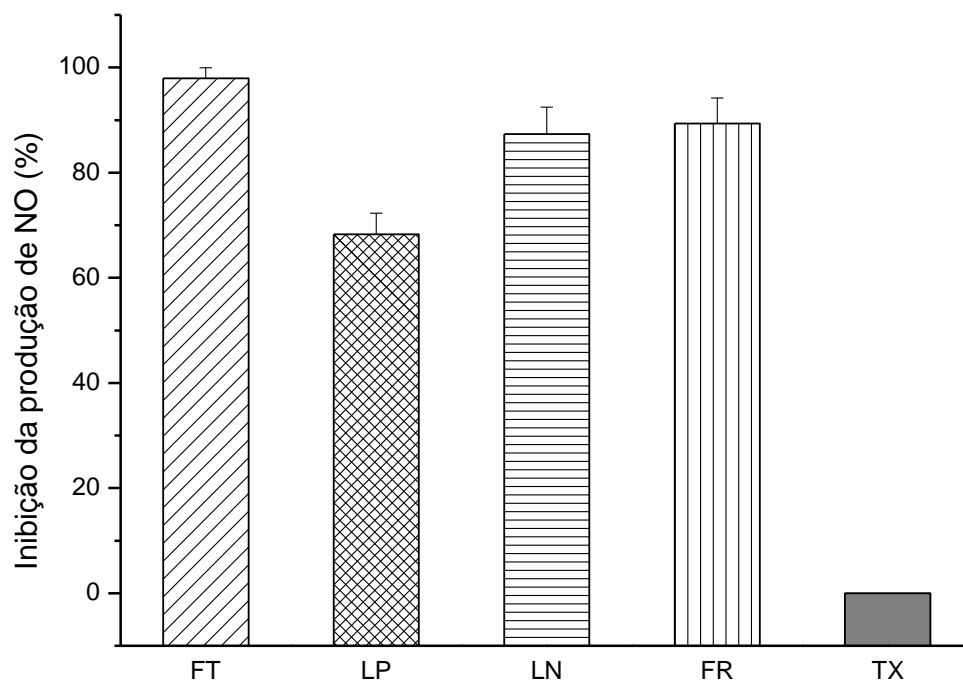


Figura 15: Inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos a TX, FT, LP, LN e FR obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*. Os macrófagos peritoneais foram incubados com as diferentes concentrações dos compostos + LPS (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), somente LPS (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou somente células, durante o período de 48 horas, em estufa de CO_2 a 37°C . Cada barra representa a média e desvio padrão de 06 animais portadores de tumor, sendo que cada determinação foi realizada em triplicata.

5.8 Determinação da inibição de TNF- α

Na determinação da atividade inibitória da produção de TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos portadores de tumor, é possível observar que FT (95,99%) e seu constituinte FR (82,42%) apresentaram uma intensa inibição deste mediador imunológico (Figura 16). LN e LP, apesar de não apresentarem uma resposta tão proeminente, também apresentou importante atividade inibitória da produção de TNF- α com valores de 70,42% e 71,24%, respectivamente. Por outro lado, de maneira oposta aos derivados de *Q. multiflora*, a droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de TNF- α pelos macrófagos peritoneais.

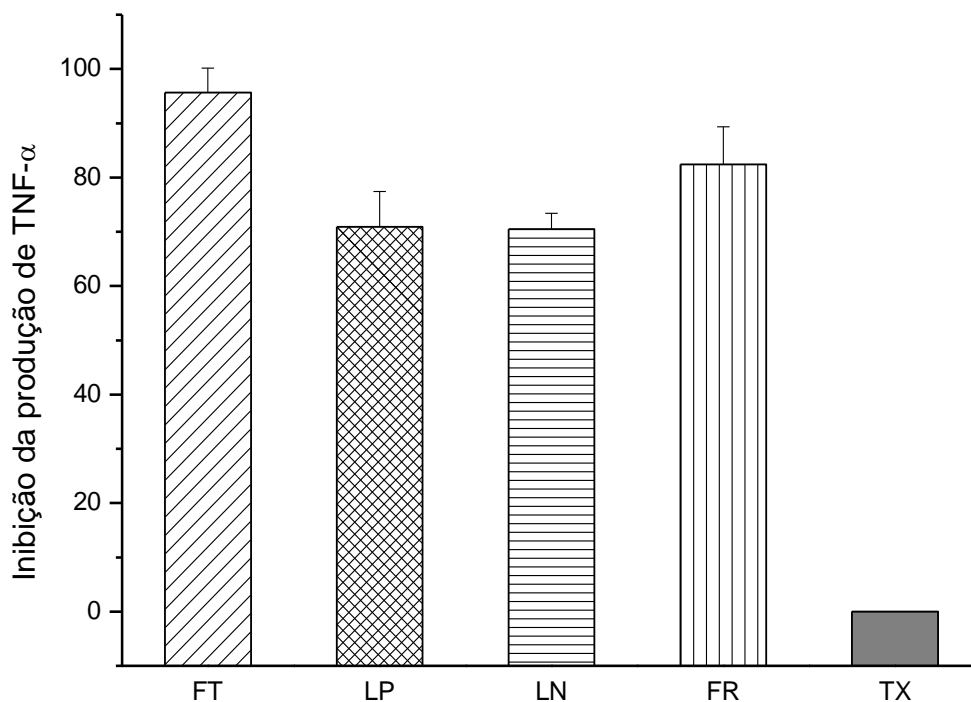


Figura 16: Inibição da produção de TNF- α em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos a TX e FT, LP, LN, FR obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*. Os macrófagos peritoneais foram incubados com as diferentes concentrações dos compostos + LPS (0,5 $\mu\text{g/mL}$), somente LPS (0,5 $\mu\text{g/mL}$) ou somente células, durante o período de 48 horas, em estufa de CO₂ a 37°C. Cada barra representa a média e desvio padrão de 06 animais portadores de tumor, sendo que cada determinação foi realizada em triplicata.

5.9 Determinação da inibição de IL-1

Observando a Figura 17, referente a atividade inibitória da produção de IL-1 em macrófagos peritoneais de camundongos portadores de tumor, é possível notar que FR apresentou a maior inibição da produção desta citocina (60,25%). FT (51,20%), LN (48,43%) e LP (45,43%) apresentaram valores semelhantes de atividade inibitória desta citocina. Mais uma vez, de maneira oposta aos derivados de *Q. multiflora*, a droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de IL-1 pelos macrófagos peritoneais estimulados com LPS.

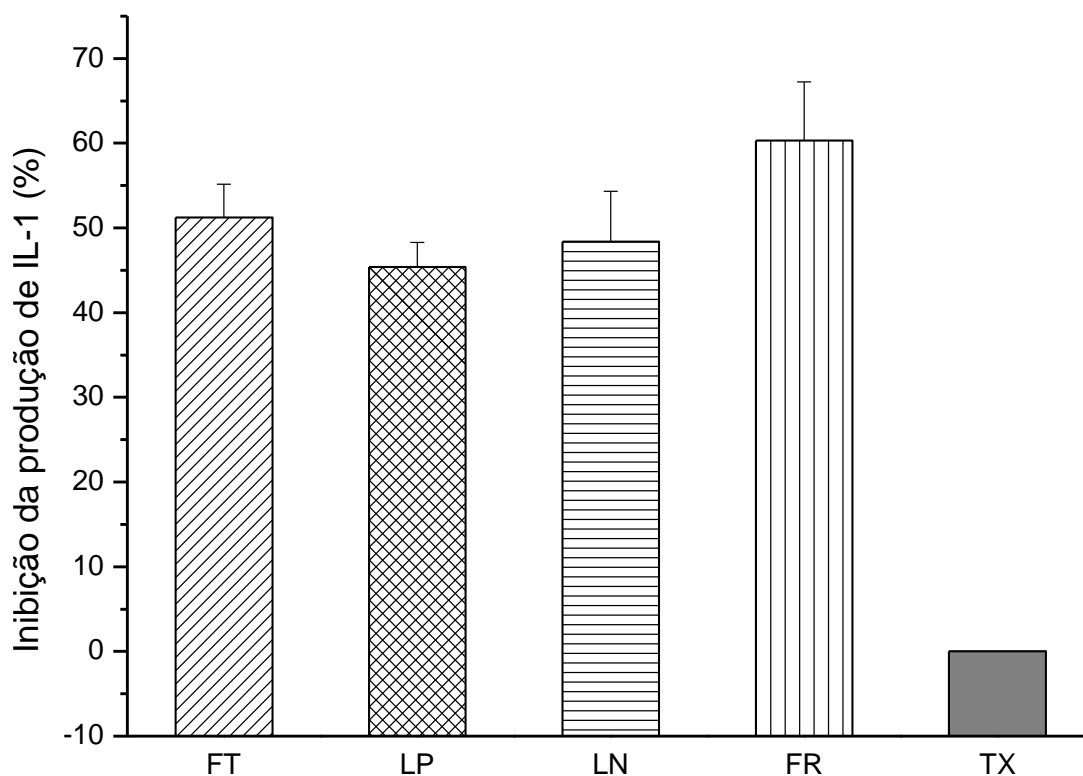


Figura 17: Inibição da produção de IL-1 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos a TX e FT, LP, LN e FR obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*. Os macrófagos peritoneais foram incubados com as diferentes concentrações dos compostos + LPS (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), somente LPS (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou somente células, durante o período de 48 horas, em estufa de CO_2 a 37°C . Cada barra representa a média e desvio padrão de 06 animais portadores de tumor, sendo que cada determinação foi realizada em triplicata.

5.10 Determinação da inibição de IL-12

Na figura 18, podemos notar que todos os derivados de *Q. multiflora* apresentaram grande atividade inibitória da produção de IL-12. Esta atividade variou de 86,99 %(LN) a 96,59 % (FT). Por outro lado, a droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de IL-18 pelos macrófagos peritoneais estimulados com LPS.

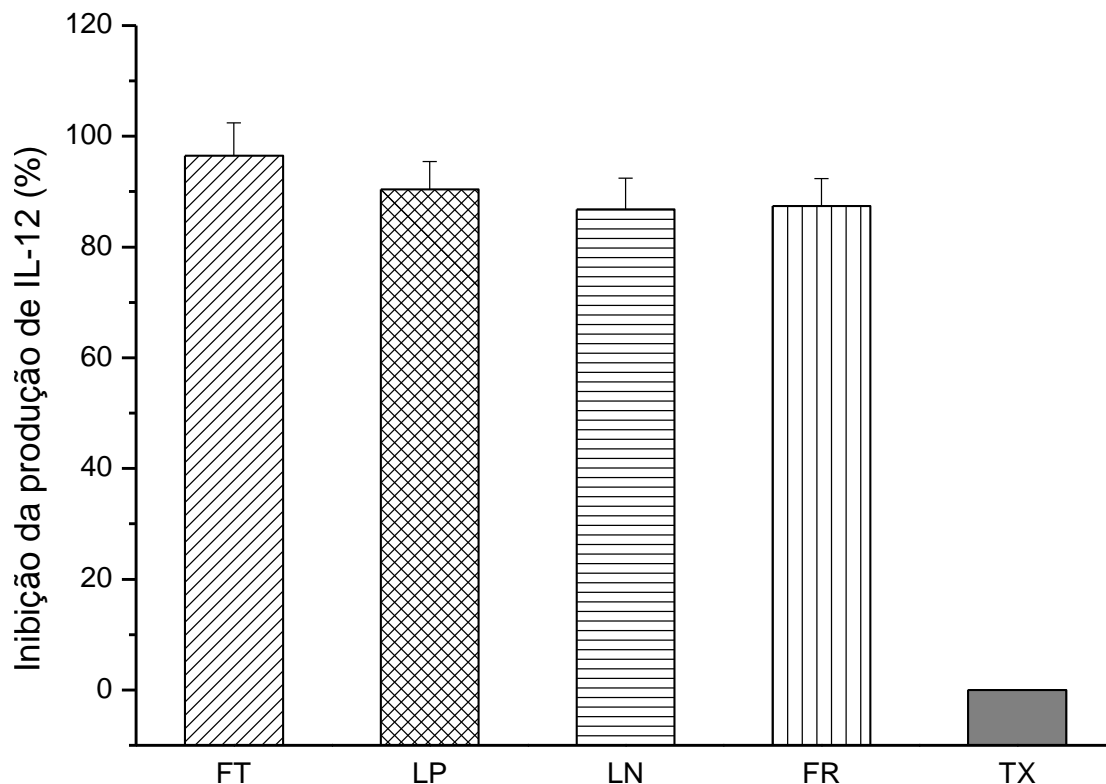


Figura 18: Inibição da produção de IL-12 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos a TX e FT, LP, LN e FR obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*. Os macrófagos peritoneais foram incubados com as diferentes concentrações dos compostos + LPS (0,5 µg/mL), somente LPS (0,5 µg/mL) ou somente células, durante o período de 48 horas, em estufa de CO₂ a 37°C. Cada barra representa a média e desvio padrão de 06 animais portadores de tumor, sendo que cada determinação foi realizada em triplicata.

5.11 Avaliação dos Parâmetros tumorais

Uma visão geral dos parâmetros tumorais após os tratamentos dos tumores com FT, LP, LN, FR e TX pode ser observada na Tabela 7.

Tabela 6: Parâmetros tumorais após tratamento

	Peso (g)	Volume (mm)	Inibição tumoral (%)	Mitoses	Angiogênese	Bcl-2	Perfil imunológico
FT	1,81 ± 0,45***	1731,31***	76,9	0,7 ± 0,22***	9,735 ± 4,62	0,36 ± 0,03***	Antiinflamatório
LP	2,9 ± 0,54***	2919,00***	61,05	1,15 ± 0,56**	8,69 ± 3,84	0,5 ± 0,04***	Antiinflamatório
LN	1,37 ± 0,43***	1258,49***	83,2	0,86 ± 0,09***	8,95 ± 2,94	1,12 ± 0,05***	Antiinflamatório
FR	1,7 ± 0,61***	881,83***	88,2	0,85 ± 0,15***	9,90 ± 2,11	1,78 ± 0,02***	Antiinflamatório
TX	2,42 ± 0,84***	3155,35***	57,89	1,65 ± 0,61*	19,68 ± 8,94*	1,45 ± 0,05***	Pró-inflamatório
PBS	5,96 ± 1,33	7494,22***	0	1,9 ± 0,8	10,89	3,3 ± 0,3	Inerte

*** p<0,001 quando comparada ao tratamento com solução salina (PBS)

** p<0,01 quando comparada ao tratamento com solução salina (PBS)

* p<0,05 quando comparada ao tratamento com solução salina (PBS)

6. DISCUSSÃO

O uso de plantas como medicamento tem aumentado dia a dia em todo o mundo e essa realidade também é bastante visível no Brasil. Por diversos motivos, sejam de ordem médica, social, cultural, econômica ou filosófica, as plantas medicinais têm sido opção terapêutica para uma parcela crescente da população brasileira, rural ou urbana que utiliza medicamentos produzidos pelas indústrias farmacêuticas, fitoterápicos produzidos por centenas de entidades e organizações não governamentais, programas de prefeituras municipais e governos estaduais. No entanto, nos últimos vinte anos no Brasil, país com a maior diversidade vegetal do mundo, o número de estudos sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (PLOTKIN, 1991; BRASIL, 1998; BRITO e BRITO 1993; MARTÍNEZ et al., 2010). Isso mostra que em um país biologicamente tão rico, mas com ecossistemas tão ameaçados, pesquisas com plantas medicinais devem ser incentivadas (SANT'ANA & ASSAD, 2004; OLIVEIRA et al., 2010; CONCEIÇÃO et al., 2012).

Visando contribuir com estas pesquisas, o presente estudo objetiva descobrir tratamentos alternativos contra o câncer de mama, através de uma atividade mais seletiva e conseqüentemente menos agressiva aos pacientes. Para tanto, foram inicialmente realizados ensaios de determinação da atividade citotóxica *in vitro* de FT e de seus constituintes LP, LN e FR, além da droga padrão TX. Isto porque, para que uma droga seja classificada como seletiva, é necessário que a mesma possua pouco ou nenhum efeito citotóxico contra células fisiológicas, associado ao alto efeito tóxico às células tumorais (MOLLINEDO et al., 2010; CHRESTA et al., 2010; WANG et al., 2010; ISMAIL et al., 2010; SVENSEN et al., 2012).

Desta maneira, na Figura 2 e Tabela 1, observamos que FT possui alta seletividade *in vitro*, uma vez que, principalmente nas concentrações de 2 e 1mg/mL, praticamente não

apresentou atividade tóxica contra os macrófagos e linfócitos (respectivamente 97.98 e 99.32% de viabilidade, na concentração 2mg/mL) porém, extrema atividade contra a célula tumoral (0%). Mesmo em concentrações mais baixas, FT apresenta baixa toxicidade para as células imunológicas, com importante atividade citotóxica. Um exemplo disto é a toxicidade de FT na concentração de 0.125mg/mL; nesta concentração macrófagos e linfócitos apresentaram viabilidade de 80,15 e 98,64% respectivamente, enquanto que as células tumorais se mostraram mais sensíveis à FT, com viabilidade de 54,51%. Com base nestas informações, a concentração 2mg/mL foi selecionada para o tratamento intratumoral dos animais portadores de tumor, uma vez que apresenta atividade citotóxica seletiva à linhagem LM3.

Observando os resultados referentes à LP, notamos que este apresenta maior toxicidade frente às células imunológicas, principalmente aos linfócitos e em concentrações mais elevadas, quando comparado a FT, mas por outro lado apresenta grande citotoxicidade às células tumorais. Este fato pode ser observado na Figura 3, Tabela 2, na concentração de 2mg/mL, onde macrófagos foram mais resistentes (65,25% de viabilidade) à exposição a LP que os linfócitos (23,53%). No entanto, a partir de 0,5 mg/mL, notamos que a substância perde a toxicidade às células imunológicas, mantendo parte de sua atividade citotóxica à linhagem tumoral. Desta maneira, a concentração de 0,5mg/mL foi selecionada aos tratamentos intratumorais com LP, uma vez que apresenta baixa toxicidade aos macrófagos (89,31% de viabilidade) e linfócitos (93,70%) e importante citotoxicidade (18,34%) à linhagem tumoral em estudo (Tabela 2).

De maneira semelhante à LP, FR também apresentou maior toxicidade às células imunes, quando comparada a FT (Figura 4, Tabela 3). No entanto, esta citotoxicidade refere-se apenas aos macrófagos, na concentração mais elevada (2mg/mL), apresentando viabilidade de 53,14%. Nesta concentração, linfócitos e células LM3 apresentaram viabilidade de 98,31 e 18,14%, respectivamente. Observando uma concentração inferior (1mg/mL), notamos que houve

uma acentuada diminuição de citotoxicidade da amostra frente aos macrófagos, mantendo a inocuidade aos linfócitos e toxicidade às células tumorais. Com isto, elegemos 1mg/mL para o tratamento dos animais portadores de tumor.

Por outro lado, observamos que LN possui alta seletividade (Figura 5, Tabela 4), uma vez que, principalmente nas concentrações de 2 e 1 mg/mL, praticamente não apresentou atividade tóxica contra os macrófagos e linfócitos (respectivamente $99,98 \pm 2,35\%$ e $99,35 \pm 3,54\%$ de viabilidade, na concentração 2mg/mL) porém, significativa atividade contra a célula tumoral ($32,51 \pm 1,89\%$). Com base nestas informações, a concentração 2mg/mL foi selecionada para o tratamento intratumoral dos animais portadores de tumor, uma vez que apresenta excelente atividade citotóxica seletiva à linhagem LM3.

Foi também avaliado neste estudo, o efeito citotóxico de Paclitaxel (Taxol – TX), uma droga isolada inicialmente a partir da árvore *Taxus brevifolia*, amplamente utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, entre eles o de mama (BRIJNONE et AL., 2010; CESCO et AL., 2010; VICARI et AL., 2010; LICHTMAN et al., 2012). Os resultados mostraram (Figura 6, Tabela 5) que a droga apresenta grande citotoxicidade aos macrófagos (viabilidade variando de 22,87 – 98,91%), nenhuma citotoxicidade aos linfócitos (98,65 – 99,86%) e linear toxicidade às células LM3 (54,39 – 56,63%). Desta maneira, com base na Tabela 5, a concentração 0,0625mg/mL foi eleita para o tratamento dos animais portadores de tumor considerando a ausência de toxicidade às células imune e a estabilidade de sua atividade citotóxica contra LM3.

Apesar de TX apresentar pouca citotoxicidade *in vitro* às células imunológicas nas concentrações mais baixas, não foram observados os efeitos esperados de acentuada toxicidade à linhagem LM3, em nenhuma concentração. Com isto, estes resultados tornaram-se pouco expressivos quando comparados aos resultados referentes aos derivados de *Q.multiflora*, uma vez que, por exemplo, FT na concentração de 2mg/mL promoveu completa morte das células

tumorais (0% de viabilidade – Tabela 1), enquanto que o efeito máximo de TX (Tabela 5), em todas as concentrações testadas, não ultrapassou 43,37 % de morte celular (56,63% de viabilidade).

Com base nestes ensaios *in vitro*, observamos que FT apresentou a melhor atividade citotóxica contra as células tumorais quando comparado às outras amostras testadas, mesmo quando comparamos às substâncias isoladas LP, LN e FR, constituintes de FT. Isto porque, apesar de LP apresentar alta citotoxicidade às células LM3, o mesmo foi bastante tóxico aos linfócitos, nas maiores concentrações (2 e 1mg/mL) (Figura 3). Nestas mesmas concentrações, FR apresentou significativa citotoxicidade aos macrófagos e moderada atividade tóxica contra as células tumorais (Figura 4). Por outro lado, LN não apresentou toxicidade às células imunológicas (Figura 5), mas também não apresenta grande efeito antitumoral *in vitro*. De maneira contrária, FT que possui em sua constituição LP, LN e FR não apresentou nenhuma atividade citotóxica contra as células imune e excelente efeito citotóxico contra a linhagem LM3 (Figura 2), sugerindo a seletividade de sua citotoxicidade.

Em uma segunda etapa do projeto iniciou-se a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* das substâncias estudadas. Assim, com base nas escolhas das concentrações de tratamento das substâncias estudadas, foi iniciado o processo de implantação tumoral e tratamento destes tumores. Ao término dos tratamentos, os animais foram sacrificados para que os tumores pudessem ser extraídos, pesados e medidos. A partir destas aferições foram alcançados os valores de inibição do crescimento tumoral que descrevem uma incrível atividade antitumoral *in vivo* dos componentes de *Q. multiflora* quando comparados com a droga padrão. Os animais dos grupos que receberam o tratamento com os derivados de *Q. multiflora*, FT ($76,9 \pm 4,06\%$), LP ($61,05 \pm 4,72\%$), LN ($83,2 \pm 6,31$) e FR ($88,2 \pm 7,04\%$) tiveram uma maior taxa de inibição do crescimento tumoral (Figura 7) em relação ao grupo que recebeu a droga padrão TX ($57,89 \pm$

3,31%), quando comparados ao grupo controle tratado com salina (PBS). Estudos semelhantes com a planta *Citrus maxima* mostrou que o tratamento dos tumores de Ehrlich com seu extrato metanólico inibiu o crescimento tumoral indicando uma potencial atividade antitumoral (KUNDUSEN et al., 2011). Outro estudo similar mostrou que os extratos etanólico e aquoso de *Dendrophthoe falcata* apresentaram importante atividade inibitória do volume tumoral mamário murino com ação comparável à cisplatina (DASHORA et AL., 2011).

Frente à retirada dos tumores dos animais tratados, foram feitas análises macroscópicas e microscópicas nos mesmos. Macroscopicamente, o tumor é elíptico, tendendo a apresentar cor esbranquiçada/amarelada, com grande presença de vasos sanguíneos. No centro tumoral há presença de líquido cístico, provavelmente derivado da necrose de células tumorais e do acúmulo de metabólitos liberados pelas células circundantes, decorrente do crescimento acelerado sem suporte nutricional adequado.

Microscopicamente (Figura 8), o tumor apresenta todas as características esperadas de uma neoplasia bem sucedida expandindo-se no hospedeiro. O tumor apresenta hipercelularidade e contém células atípicas, com diferença no tamanho celular e nuclear. Mitoses podem ser observadas em diversas regiões, indicando proliferação acentuada. Há presença marcante grande quantidade de vasos sanguíneos na área periférica. É conhecido pela literatura que tumores autólogos desenvolvem uma rede de vasos sanguíneos desde seu início mais precoce, acumulando estes capilares no centro do tumor (FOLKMAN, 2000). Diferentemente, tumores transplantados, como é o caso do presente estudo, atraem a formação de vasos através da liberação de mediadores solúveis, e estes vasos então crescem partindo da periferia para o centro tumoral (LIN E POLARD, 2007).

Ao observarmos a quantidade de mitoses nos animais de todos os grupos experimentais (Figura 9 e Figura 10), notamos que os grupos tratados com FT ($0,7 \pm 0,22$), LP

($0,86 \pm 0,09$) e FR ($0,85 \pm 0,15$) apresentaram menor quantidade de mitose por campo quando comparados aos outros grupos LP ($1,15 \pm 0,56$), PBS ($1,9 \pm 0,8$) e TX ($1,65 \pm 0,61$). Apesar de todos os tratamentos serem diferentes estatisticamente do controle PBS, representando uma diminuição de mitoses com os tratamentos estudados, a droga padrão TX tem a menor diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao grupo PBS, o que significa que TX é mais uma vez inferior quando comparado aos derivados de *Q. multiflora*. O estudo do efeito de tratamentos antineoplásicos sobre a mitose celular vem sendo estudado como provável mecanismo de ação. Dentro deste contexto, um triterpeno da planta *Boswellia serrata* mostrou atividade antitumoral *in vivo* com inibição das mitoses celulares nos camundongos portadores de tumor de Ehrlich (AGRAWAL et AL., 2011). Outro estudo sugere que a atividade antitumoral de benzofuranos derivados de plantas da família Asteraceae pode ser em consequência a sua influência no processo mitótico de células tumorais (ROMANO et AL., 2011).

Para analisar o grau de angiogênese tumoral (Figura 11, Figura 12), foram observados campos microscópicos em regiões de centro e periferia do tumor. Não houve diferença no grau de angiogênese entre os animais do grupo controle PBS ($10,89 \pm 3,21$) e aqueles que foram tratados com derivados FT ($9,735 \pm 4,62$), LP ($8,69 \pm 3,84$) e FR ($9,90 \pm 2,11$) de *Q. multiflora*. No entanto, o tratamento com a droga padrão TX ($19,68 \pm 8,94$) apresentou valores bem superiores de grau de angiogênese quando comparado com o grupo controle PBS. A justificativa para este acontecimento pode estar embasada no fato de que pequenas doses de TX podem estimular a produção de COX-2 e com isso aumentar a angiogênese tumoral (SUBBARAMAIAH et al., 2000; MERCHAN et AL., 2005).

Foram também realizados ensaios para a determinação de Bcl-2, uma molécula de superfície celular, expressa em alguns tipos de célula para escapar da morte programada (apoptose), indispensável à contenção tumoral. Os resultados mostraram pouca marcação para

esta molécula de superfície com resultados inferiores a 10% de células marcadas por campo (Figura 13). No entanto, é possível observar na Figura 14 que os tumores controles tratados com PBS apresentam maior presença desta marcação quando comparado com todas as outras amostras testadas. Uma vez que a expressão de Bcl-2 na superfície celular é um mecanismo tumoral de escape à morte programada (apoptose), é sensato afirmar a partir dos resultados observados na Figura 14 que todas as drogas testadas FT, LP, LN, FR e TX cumpriram seu papel antitumoral, inibindo a superexpressão desta molécula nas células tumorais, deixando-as vulneráveis à apoptose.

Além destes parâmetros tumorais foram também realizados testes para avaliar o efeito modulatório das amostras estudadas sobre o sistema imunológico de animais portadores de tumor. Assim, nos resultados referentes à produção de NO, podemos verificar que FT (97,93%) e seus constituintes LN (87,24%) e FR (89,45%) apresentaram uma expressiva inibição deste mediador imunológico (Figura 15). LP, apesar de não apresentar uma resposta tão expressiva, apresentou importante atividade inibitória da produção de NO com valor de 68,24 %. Por outro lado, de maneira oposta aos derivados de *Q. multiflora*, a droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de NO pelos macrófagos peritoneais. Diversos estudos comprovam o efeito de TX sobre o microambiente tumoral através da estimulação da produção de NO e outros mediadores inflamatórios pelos macrófagos.

De maneira semelhante, na determinação da atividade inibitória da produção de TNF- α , é possível observar que FT (95,99%) e seu constituinte FR (82,42%) apresentaram grande inibição deste mediador imunológico (Figura 16). LN e LP, apesar de não apresentarem uma resposta tão proeminente, também apresentou importante atividade inibitória da produção de TNF- α com valores de 70,42% e 71,24%, respectivamente. Mais uma vez, a droga padrão TX

não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de TNF- α pelos macrófagos peritoneais.

Observando a Figura 17, referente a atividade inibitória da produção de IL-1 em macrófagos peritoneais de camundongos portadores de tumor, é possível notar que FR apresentou a maior inibição da produção desta citocina (60,25%). FT (51,20%), LN (48,43%) e LP (45,43%) apresentaram valores semelhantes de atividade inibitória desta citocina. Novamente, a droga padrão TX não apresentou nenhum efeito inibitório sobre o sistema imune com (0)% de inibição de IL-1 pelos macrófagos peritoneais estimulados com LPS.

Verificando ainda os parâmetros imunológicos, podemos notar que todos os derivados de *Q. multiflora* apresentaram grande atividade inibitória da produção de IL-12, sendo a citocina mais inibida pelas as amostras testadas. Esta atividade variou de 86,99 %(LN) a 96,59 % (FT). Por outro lado, a droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de IL-18 pelos macrófagos peritoneais estimulados com LPS.

Desta maneira podemos concluir que os derivados de *Q. multiflora* apresentam características anti-inflamatórias sobre os macrófagos e com isso favorecem a contenção tumoral. Isto porque a liberação excessiva de NO, TNF, IL-1 e IL-12 no microambiente tumoral é considerada prejudicial à contenção do tumor uma vez que vários estudos vem mostrando seu efeito no aumento da vascularização tumoral e conseqüente metástase além de outros mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral (AMBS and GLYNN, 2011). Tanese e colaboradores (2011) relacionaram a quantidade de NO no microambiente tumoral do melanoma com a progressão deste tumor e propõem a inibição da iNOS como alvo do tratamento dos pacientes portadores de tumor. Apesar de inicialmente o TNF- ter sido documentado como um mediador anti-tumoral, estudos mais recentes vêm mostrando que esta molécula é um dos principais mediadores de inflamação relacionada à câncer e age como fator promotor de tumor

TNF- α (WU e ZHOU, 2010). A produção de IL-1 também está sendo relacionada à progressão tumoral e vem sendo estudada como alvo da terapêutica no câncer de mama (HOU et al., 2011). Outros estudos sugerem que a neutralização de IL-1 no sobrenadante do ambiente tumoral, inibe a infiltração das células tumorais e a angiogênese através da inibição de 85% do fator de crescimento endotelial tumoral (VEGF)(CARMI et al., 2009).

Por fim, na análise da Tabela 6, que fornece uma visão geral dos efeitos dos diversos tratamentos sobre vários parâmetros tumorais, podemos observar que FT, LN e FR apresentaram o melhor desempenho no que diz respeito à taxa de inibição tumoral. Este dado soma-se ao fato de que estas mesmas substâncias também apresentaram a menor quantidade de mitoses por campo. Contudo podemos sugerir que estes dois parâmetros tumorais podem estar relacionados considerando que diversas drogas antitumorais possuem mecanismo de ação relacionado à diminuição da taxa de mitose celular (AGRAWAL et al., 2011; PANDI et al., 2011; ROMANO et al., 2011). Além dos bons resultados obtidos através do tratamento antitumoral com os derivados de *Q. multiflora* referentes aos fatores tumorais histológicos podemos destacar também o efeito anti-inflamatório destas substâncias sobre os macrófagos através da inibição dos mediadores pró-inflamatórios NO, TNF- α , IL-1, IL-12. Por outro lado, a droga padrão TX não apresenta atividade inibitória da produção destes mediadores envolvidos na progressão tumoral.

Conclui-se, portanto que os derivados de *Q. multiflora* possuem promissor efeito antitumoral *in vivo*, apresentando grande inibição do volume tumoral e diminuição da taxa de mitose celular, além de efeito anti-inflamatória sobre macrófagos, superando os efeito da droga Paclitaxel (TX) amplamente utilizada em tratamentos oncológicos. Estes resultados encorajam a continuidade deste projeto, visando estudos mais aprofundados sobre os efeitos *in vivo* desta planta no tratamento de tumor mamário murino.

7. CONCLUSÕES

- FT possui excelente atividade seletiva citotóxica *in vitro* à linhagem tumoral de mama LM3, sem afetar a viabilidade das células imunológicas.
- Apesar de ser uma droga amplamente estudada e utilizada em tratamentos oncológicos, TX não superou o efeito citotóxico dos derivados de *Q. multiflora* contra as células LM3 *in vitro*. Além disso, provocou considerável diminuição da viabilidade dos macrófagos em suas concentrações mais elevadas.
- FT, LP, LN e FR possuem expressiva atividade inibitória do crescimento tumoral *in vivo*.
- LN e FR apresentaram os melhores resultados *in vivo*, entre os derivados de *Q. multiflora*.
- FT, LP, LN e FR apresentaram grande inibição da produção dos mediadores inflamatórios envolvidos na carcinogênese NO, IL-1, IL-12 e TNF- α
- Em todos os parâmetros estudados (citotoxicidade *in vitro*, inibição tumoral, angiogênese e mitose, atividade anti-inflamatória), a droga padrão TX apresentou resultados inferiores aos derivados de *Q. multiflora*.

7. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B.B.; VIJAYALEKSHMI, R.V.; AND SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, longtermfoe. **Clin. Cancer Res.** v.15, p.425–430, 2009.

ALLAVENA, P.; SICA, A.; SOLINAS, G.; PORTA, C.; MANTOVANI A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. **Crit. Rev. Oncol. Hematol**, v.66, p.1-9, 2008.

AMMIRANTE, M.; LUO, J.-L.; GRIVENNIKOV, S.; NEDOSPASOV, S.; AND KARIN, M. B. cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. **Nature** 464, 302–305, 2010.

ANDREU, P.; JOHANSSON, M.; AFFARA, N.I.; PUCCI, F.; TAN, T.; JUNANKAR, S.; KORETS, L.; LAM, J.; TAWFIK, D.; DENARDO, D.G. FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. **Cancer Cell**, v.17, p.121–134, 2010.

BAUTISTA, G.C.R.; ACOSTA, G.E.; TOLEDO, G.I.I. Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferation in vitro de linfocitos de bovino, frescos y congelados/ Evaluation of MTT. **Vet Mex**, v.31, p.101-106, 2000.

BRASIL Primeiro relatório nacional para a conservação sobre diversidade biológica: Brasil. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Brasília, 1998.

BRIGNONE, C.; GUTIERREZ, M.; MEFTI, F.; BRAIN, E.; JARCAU, R.; CVITKOVIC, F.; BOUSETTA, N.; MEDIONI, J.; GLIGOROV, J.; GRYGAR, C.; MARCU, M.; TRIEBEL, F. First-line chemoimmunotherapy in metastatic breast carcinoma: combination of paclitaxel and IMP321 (LAG-3Ig) enhances immune responses and antitumor activity. **J Transl Med**, doi:10.1186/1479-5876-8-71.

BRITO, A. R. M. e BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **J. Ethnopharmacol.**, v. **39**, p.53-67, 1993

BROWN, D. A.; HANCE, K. W.; ROGERS, C. J.; SANSBURY, L. B.; ALBERT, P. S.; MURPHY, G.; LAIYEMO, A.O.; WANG, Z.; CROSS, A. J.; SCHATZKIN, A.; DANTA, M.; SRASUEBKUL, P.; AMIN, J.; LAW, M.; BREIT, S. N.; LANZA, E. Serum Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1/GDF15): A Potential Screening Tool for the Prevention of Colon Cancer? **Cancer Epidemiol Biomarkers**. v.21, p.337, 2012

CARLI, C.B.A.; MATOS, D.C.; LOPES, F.C.M.; MAIA, D.C.G.; DIAS, M.B.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; ANDREO, M.A.; VILEGAS, W.; COLOMBO L.L.; CARLOS I. Z. Isolated Flavonoids against Mammary Tumour Cells LM2. **Z. Naturforsch.**, v.64c, p.32-36, 2009.

CARMI, Y.; VORONOV, E.; DOTAN S.; LAHAT N.; RAHAT, M. A.; FOGEL M.; HUSZAR, M.; WHITE, M. R.; DINARELLO, C. The Role of Macrophage-Derived IL-1 in Induction and Maintenance of Angiogenesis. **The Journal of Immunology**. v.183,4705-4714, 2012.

CESCA, M.; FRAPOLLI, R.; BERNDT, A.; SCARLATO, V.; RICHTER, P.; KOSMEHL, H.; D'INCALCI, M.; RYAN, A. J.; GIAVAZZI, R. The Effects of Vandetanib on Paclitaxel Tumor Distribution and Antitumor Activity in a Xenograft Model of Human Ovarian Carcinoma. **Neoplasia**, v.11, p.1155–1164, 2009.

CHEN, Y.; CHEN, S.; MIAOC, L.; LIUD, Z.; LIE, W.; ZHAOF, Z.; SUNG, X.; JIANG, G. , QI CHENG, Serum levels of interleukin (IL)-18, IL-23 and IL-17 in Chinese patients with multiple sclerosis. **Jour of Neuroimmunol**, v. 243 (1–2), p.56–60, 2012.

CHRESTA, C.M.; DAVIES, B.R.; HICKSON, I.;HARDING, T.; COSULICH, S.;CRITCHLOW, S.E.; VINCENT, J.P.; ELLSTON, R.; JONES, D.; SINI, P.; JAMES, D.;HOWARD, Z.; DUDLEY, P.; HUGHES, G.; SMITH, L.; MAGUIRE, S.; HUMMERSONE. M.;MALAGU, G.; MENEAR, K.; JENKINS, R.; JACOBSEN, M.; SMITH,G.C.M.; GUICHARD, S.; PASS, M. AZD8055 Is a Potent, Selective, and Orally Bioavailable ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with *In vitro* and *In vivo* Antitumor Activity. **Cancer Res January**, v.1(0), p.288-298, 2010.

CONCEIÇÃO, G. M. RUGGIERI, A. C.; ARAÚJO, M. F. V.; CONCEIÇÃO, T. T. M. M.; CONCEIÇÃO, M. A. M. M. Plantas do Cerrado: Comercialização, Uso e Indicação Terapêutica Fornecida pelos Raizeiros e Vendedores, Teresina, Piauí. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, 2011.

CORTI, A.; GIOVANNINI, M.; BELLI, C.; VILLA, E. Immunomodulatory Agents with Antivascular Activity in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on TLR9 Agonists, IMiDs and NGR-TNF. **Journal of Oncology**, doi:10.1155/2010/732680.

Patricia J. Dubin, Ashley Martz, Jessica R. Eisenstatt, Michael D. Fox, Alison Logar and Jay K. Kolls Interleukin-23-Mediated Inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection *Infect. Immun.* January 2012 vol. 80 no. 1 398-409

EVERS, B.; SCHUT, E.; VAN DER BURG, E.; BRAUMULLER, T. M.; EGAN, D.A.; HOLSTEGE, H.; EDSER, P.; ADAMS, D.J.; WADE-MARTINS, R.; BOUWMAN, P.; JONKER, J. A High-Throughput Pharmaceutical Screen Identifies Compounds with Specific Toxicity against BRCA2-Deficient Tumors. **Clin Cancer Res.** v.1, p. 99-108, 2010.

HOU, Z.; FALCONE, D. J.; SUBBARAMAIAH K., DANNENBERG, A. J. Macrophages induce COX-2 expression in breast cancer cells: role of IL-1 β autoamplification. **Carcinogenesis**, v. 32, p.695-702, 2012

FRAZIER, J.; HAN, J.; LIM, M.; OLIVI A. Immunotherapy Combined with Chemotherapy in the Treatment of Tumors. **Neurosurgery Clinics of North America**. v.21, p.187-194, 2010.

GOCHMAN, E.; MAHAJNA, J.; SHENZER, P.; DAHAN, A.; BLATT, A.; ELYAKIM, R.; REZNICK, A. Z. The expression of inos and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans **Acta Histochemica**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2012.02.004>

GOEPEL, M.; HECKER, U.; KREGE, S.; RUBBEN, H.; MICHEL, M.C. Saw palmetto extracts potently and noncompetitively inhibit human alpha-adrenoceptors in vitro. **Prostate**, v. 38, n.3, p.208-215, 1999.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v.140, p.883–899, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa da Incidência de Câncer para 2012 no Brasil**. Disponível no site: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>; acesso em 29/02/2012.

IONTCHEVA, I.; AMAR, S.; ZAWAWI, K.H.; KANTARCI, A.; VAN DYKE, T.E. Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. **Infect Immun.**, v.72, p.2312–2320, 2004.

ISMAIL, M. M. F.; AMIN, K. M.; NOAMAN, E.; SOLIMAN, D. H.; AMMAR, Y. A. New quinoxaline 1, 4-di-*N*-oxides: Anticancer and hypoxia-selective therapeutic agents. **Eur J Med Chem**, v. 45, p. 2733-2738, 2010.

HAAN, J. M. M.; KRAAL, D. G. Innate Immune Functions of Macrophage Subpopulations in the Spleen. **J Innate Immun** (DOI: 10.1159/000335216)

GHEE, H.L.; NATHAN, S.; LORI, S.; ABHIJIT, M.; GERARD, W.; OLENA, I.; CHRISTENSON, E.; SCHLESINGER, P.; AKABORI, K.; SANTANGELO, C. Bcl-2 apoptosis proteins, mitochondrial membrane curvature, and cancer **Bull Amer Phys Soc**. V.57, Number 1, 2012

KARBACH, J.; GNJATIC, S.; BENDER, A.; NEUMANN, A.; WEIDMANN, E.; YUAN, J.; FERRARA, C. A.; HOFFMANN, E.; OLD, L. J.; ALTORKI, N. K.; JÄGER, E. Tumor-reactive CD8⁺ T-cell responses after vaccination with NY-ESO-1 peptide, CpG 7909 and Montanide® ISA-51: association with survival. **Int. J. Cancer**, v.26 (4) , p.909-918, 2010.

KOVRT, H. E.; HOUOT; R.; WEISKOPF, K.; GOLDSTEIN, M. J.; FERENC SCHEEREN, DEBRA CZERWINSKI,1 A. DIMITRIOS COLEVAS,1WEN-KAI WENG,1 MICHAEL F. CLARKE,4 ROBERT W. CARLSON,1 FRANK E. STOCKDALE,1 JOSEPH A. MOLLICK,1 LIEPING CHEN,5 AND RONALD LEVY1 Stimulation of natural killer cells with a CD137-

specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. **J Clin Invest.** v.122 (3), p.1066–1075, 2012.

KOSHKARYEV, A.; PIROYAN, A.; TORCHILIN, V.P. A Dynamic Inflammatory Cytokine Network in the Human Ovarian Cancer Microenvironment Increased apoptosis in cancer cells in vitro and in vivo by ceramides in transferrin-modified liposomes. **Cancer Biol Ther.** v.13(1), p.50-60, 2012.

KULBE, H.; CHAKRAVARTY, P.; LEINSTER, D. A.; CHARLES, K. A.; KWONG, J.; THOMPSON, R.G.; COWARD, J. I.; SCHIOPPA, T.; ROBINSON, S. C.; GALLAGHER, W. M.; GALLETTA, L. On behalf of the Australian Ovarian Cancer Study Group. **Cancer Res** v.72, p66.

KUNDU, J.K.; SURH, Y. Inflammation: Gearing the journey to cancer. **Mutation Res.**, v. 659, p.15-30, 2008.

LAMBIN, P.; STEVEN F. PETIT, HUGO J.W.L. AERTS, WOUTER J.C. VAN ELMPT, CARY J.G. OBERIJE, MAUD H.W. STARMANS, RUUD G.P.M. VAN STIPHOUT, GUUS A.M.S. VAN DONGEN, C, KRISTOFF MUYLLE, PATRICK FLAMEN, ANDRÉ L.A.J. DEKKER, DIRK DE RUYSSCHER From population to voxel-based radiotherapy: Exploiting intra-tumour and intra-organ heterogeneity for advanced treatment of non-small cell lung cancer **Radiotherapy and Oncology**, v 96, p 145–152, 2010.

LICHTMAN, S. M.; HURRIA, A.; CIRRINCIONE, C. T.; SEIDMAN, A. D.; WINER, E.; HUDIS, C.; COHEN H. J.; MUSS, B. Paclitaxel efficacy and toxicity in older women with metastatic breast cancer: combined analysis of CALGB 9342 and 9840. **Ann Oncol**, v. 23(3), p.632-638, 2012

POUDYAL, D.; MAI LE P, D. T; HOFSETH, A.B.; CHUMANEVICH, A.; CHUMANEVICH A.A.; WARGOVICH, M.J.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P.S.; WINDUST, A.; HOFSETH, L.J. A Hexane Fraction of American Ginseng Suppresses Mouse Colitis and Associated Colon Cancer: Anti-inflammatory and Proapoptotic Mechanisms. **Cancer Prev Res** 2012 Feb 29. [Epub ahead of print]

LINDGREN, A.; PAVLOVIC, V.; FLACH, C.; SJOÖLING, A; LUNDIN, S. Interferon-gamma secretion is induced in IL-12 stimulated human NK cells by recognition of Helicobacter pylori or TLR2 ligands **J Innate Immun**, doi:10.1177/1753425909357970

LUQMAN, S.; MORAIS, M. C. C.; KONDRATYUK, T. P.; PETRONIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; SOARES, C. P.; PEZZUTO, J. M. Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic alkyl-gallates: Possible role in cancer chemoprevention, doi:10.1038/npre.2012.6922.1

MAJDALAWIEH, A. F.; HMAIDAN, R.; CARR, R. I. *Nigella sativa* modulates splenocyte proliferation, Th1/Th2 cytokine profile, macrophage function and NK anti-tumor activity. **J. Ethnopharmacol.** doi:10.1016/j.jep.2010.06.030.

MALIK, F.; KUMAR, A.; BHUSHAN, S.; MONDH, D. M.; PAL, H. C.; SHARMA, R.; KHAJURIA, A.; SINGH, S.; SINGH, U.; SAXENA, A. K.; SURI, K. A.; QAZI, G. N. ; SINGH J. Immune modulation and apoptosis induction: Two sides of antitumoural activity of a standardised herbal formulation of *Withania somnifera*. **Eur. J. Cancer.** *in press* 2009

MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. **Nature.** v.457, p.36-37, 2009.

MANTOVANI, A.; MARCHESI, F.; PORTA, C.; SICA, A.; ALLAVENA, P. Inflammation and cancer: Breast cancer as a prototype. **Breast,** v.16, p.27-33, 2007.

MARTÍNEZ, G. B.; JUNIOR, M. M.; JUNIOR, S. B. Seleção de ideótipos de espécies florestais de múltiplo uso em planícies fluviais do Baixo Amazonas, Pará. **Acta Amaz.** vol.40, Manaus Mar, 2010.

MOLLINEDO, F.; IGLESIA-VICENTE, J. C. G.; MENDOZA, A.; VILLA-PULGARIN, J. A.; FRIAS, M.; ROUÉ, G.; GIL, J.; COLOMER, D.; CAMPANERO, M. A.; BLANCO-PRIETO M. J. *In vitro* and *In vivo* Selective Antitumor Activity of Edelfosine against Mantle Cell Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Involving Lipid Rafts. **Clin Cancer Res,** v.16, p.2046-2054, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983

NAGASAKI, E.; TAKAHARA, A.; SAGAWA, S. K.; AIBA, Y. K.; TAJIRI, H.; YAGITA, H.; HOMMA, S. Combined Treatment With Dendritic Cells and 5-fluorouracil Elicits Augmented NK Cell-mediated Antitumor Activity Through the Tumor Necrosis Factor- α Pathway. **J Immunother**, v. 33, p. 467-474, 2010.

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*lavandula offi cinalis*), melaleuca (*melaleuca alternifolia*), cedro (*juniperus virginiana*), tomilho (*thymusvulgaris*) e cravo (*eugenia caryophyllata*). Revista Analytica, v.21, p.36-39, 2006.

OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta bot Bras**, v.24(2), p.571-577, 2010.

PARADISI, A.; MEHLEN, P. Netrin-1, a missing link between chronic inflammation and tumor progression. **Cell cicle**, v.9, p. 1229, 2010.

PIÑA, Y.; BOUTRID, H.; MURRAY, T. G.; JAGER, M. J.; CEBULLA, C. M.; SCHEFLER, A.; LY, L. V.; ALEGRET, A.; CELDRAN, M.; FEUER, W.; JOCKOVICH, M. Impact of Tumor-

Associated Macrophages in LH_{BETA}T_{AG} Mice on Retinal Tumor Progression. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v.51, p.2671-2677, 2010.

PLOTKIN, M. J.. Traditional knowledge of medicinal plants: the search for new jungle medicines.. In: O. Akerele, V. Heywood e H. Syngé. **Conservation of medicinal plants**. p.53-64, 1991

QIAN, B.; AND POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v.141, p.39-51, 2010.

ROJAS, A.; FIGUEROA, H.; MORALES, E. Fueling inflammation at tumor microenvironment: the role of multiligand/rage axis. **Carcinogenesis**, v.31, 334-341, 2010.

SANT' ANA, P. J. P.; ASSAD, A. L. D. Programa de pesquisa em produtos naturais: a experiência da CEME. **Quím Nova**, v.27, p.508-512, 2004.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: The macrophage connection. **Cancer Lett.**, v.264, p.204–215, 2008.

SOLINAS, G.; SCHIAREA, S.; LIGUORI, M.; FABBRI, M.; PESCE, S.; ZAMMATARO, L.; PASQUALINI, F.; NEBULONI, M.; CHIABRANDO, C.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA P. Tumor-Conditioned Macrophages Secrete Migration-Stimulating Factor: A New Marker for M2-

Polarization, Influencing Tumor Cell Motility. **J Immunol.** doi:10.4049/jimmunol.1000413, 2010.

SVENSEN, N., WALTON, J. G.A.; BRADLEY, M. Peptides for cell-selective drug delivery **Pharmacol. Sciences.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2012.02.002>,

TRINCHIERI, G. Cancer and Inflammation: An Old Intuition with Rapidly Evolving New Concepts. **Ann. Rev. Immun.** v. 30, 2012.

U'REN, L.; GUTH, A.; KAMSTOCK, D.; DOW, S. Type I interferons inhibit the generation of tumor-associated macrophages. **Cancer Immunol, Immunother**, v.59, p.587-598, 2010.

URTREGER, A.J.; LADADA, V.E.; PURICELLI, L.I.; RIVELL, A . VIDAL, M.D.C.; LUSTIG, E.S.; JOFFÉ, E.B.K. Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. **Inter J Oncol**, v.11, 1997.

VICARI, A. P.; LUU, R.; ZHANG, N.; PATEL, S.; MAKINEN, S.; HANSON, D. C.; WEERATNA, R. D.; KRIEG, A. M. Paclitaxel reduces regulatory T cell numbers and inhibitory function and enhances the anti-tumor effects of the TLR9 agonist PF-3512676 in the mouse. **Cancer Immunol Immunother**, v.58, p.615–628, 2009.

WALDNER, M. J.; WIRTZ, S.; BECKER, C.; SEIDEL, D.; TUBBE, I.; CAPPEL, K.; HÄHNEL, P., GALLE, S. R.; SCHULER, M.; NEURATH, M. F. Perforin deficiency attenuates inflammation and tumor growth in colitis-associated cancer. **Inflamm Bowel Dis.** v.16, p.559 – 567, 2010.

WANG, F.; REN, J.; QIU, X.; WANG, L.; ZHU, Q.; ZHANG, Y.; HUAN, I.; MENG, Y.; YAO, L.; CHEN, S.; XU, Y.; YANG, A. Selective Cytotoxicity to HER2-Positive Tumor Cells by a Recombinant e23sFv-TD-tBID Protein Containing a Furin Cleavage Sequence. **Clin Cancer Res,** v.16, p.2284-2294, 2010.

WAI, P. Y., KUO, P. C. Intersecting pathways in inflammation and cancer: Hepatocellular carcinoma as a paradigm. **World J Clin Oncol.** v.10, p.15–23, 2012.

WYCKOFF, J. B.; WANG, Y.; LIN, E. Y.; LI, J.; GOSWAMI, S.; STANLEY, E. R.; SEGALL, J. E.; POLLARD, J. W.; CONDEELIS J. **Cancer Res.** v.67, p.2649–2656, 2007.

WU, Y., ZHOU, B. P. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion **British Jour. of Can.** v. 102, p. 639-644.

YANG, L.; HUANG, J.; REN, X.; GORSKA, A. E.; CHYTIL, A.; AAKRE, M.; CARBONE, D. P.; MATRISIAN, L.M.; RICHMOND, A.; LIN, P. C.; MOSES, AND H.L. Abrogation of TGF β Signaling in Mammary Carcinomas Recruits Gr-1+CD11b+ Myeloid Cells that Promote Metastasis. **Cancer Cell**, v.13, p.23–35, 2008.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523p.

ZHANG, H.; NEELY, L.; LUNDGREN, K.; YANG, Y.; LOUGH, A.; TIMPLE, N. BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, has broad application against tumors with acquired multidrug resistance. **Int J Cancer**. v.126, p.1226-1234, 2010.

ZHANG, W.; ZHU, X.; SUN, H.; XIONG, Y.; XU, H.; KONG, L.; WANG, L.; WU, W.; TANG, Z. Depletion of Tumor-Associated Macrophages Enhances the Effect of Sorafenib in Metastatic Liver Cancer Models by Antimetastatic and Antiangiogenic Effects. **Clin Cancer Res**, v.16, p.3420-3430, 2010.