

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Gabriela Regina Silva Ferreira

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UMA  
CLINOPTILOLITA DE ORIGEM NATURAL E OUTRA  
SINTÉTICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE EHRLICH

**Araraquara**

**2015**

Gabriela Regina Silva Ferreira

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UMA  
CLINOPTILOLITA DE ORIGEM NATURAL E OUTRA  
SINTÉTICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE EHRLICH

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Zeppone Carlos  
Co-orientadora: Francine Alessandra Manente

**Araraquara**

**2015**

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente meus pais que me deram suporte durante a faculdade, sempre me apoiaram e me incentivaram nesses anos. Que me educaram, ensinaram os valores e princípios da vida e me encorajaram a sempre buscar meus sonhos. À minhas irmãs, quase mães, nas quais eu me espelho e foram as responsáveis pela minha persistência nos estudos para entrar na UNESP, e que sinto muita falta no dia-a-dia.

À minha orientadora Iracilda Zeppone Carlos, que me ajudou sempre que necessário e buscou solucionar todos os problemas encontrados ao longo da minha iniciação científica. À Francine Alessandra Manente, minha tutora, que me ensinou tudo que aprendi durante meu estágio, a quem agradeço muito pelo esforço e pela paciência. Ao Professor Alexander Batista Duharte por estar sempre disposto a ajudar e pelos ensinamentos de técnicas durante minha iniciação, e a todos do Laboratório de Imunologia Clínica que me receberam de braços abertos, me ajudaram sempre que necessário e colaboraram para meu desenvolvimento acadêmico.

À República Krakatoa, a família que me adotou em Araraquara e esteve presente em todos os momentos desde o meu primeiro ano, à todas as krakas que tive o prazer de morar e mesmo as que não morei mas fizeram parte dessa história. Muito obrigada por todos os momentos que vocês me proporcionaram, por todas as histórias que vivemos, pelas noites não dormidas, pelos conselhos confortantes, pelas risadas, pelo carinho, pelas festas, pelo companheirismo, pelas caronas, e pela amizade de irmã que nunca vai deixar de existir. Eu só tenho a agradecer por

terem me acolhido na terra da laranja, e terem feito desses os melhores anos da minha vida, na qual sempre sentirei muitas saudades.

Ao André Cresto Garcia, que sempre me apoiou, incentivou e principalmente aguentou meus desesperos e me amparou nos momentos mais difíceis, tentando sempre buscar soluções para os problemas que apareciam. Entendeu quando eu disse que tinha que passar o final de semana escrevendo, mesmo com a saudade apertando. Parceiro para todas as horas, compartilhando comigo as vitórias, conquistas, alegrias e desafios.

Ao Farra Farma, que alegrou meus dias no campus, tornando-os mais fáceis e divertidos. Agradeço pelos nossos grupos de estudo pré-prova que ajudavam a entender e absorver muita coisa, principalmente as moléculas de QF; aos encontros pós-prova (ou pós foto do branco) que serviram para relaxar e descontraír; aos brindes; aos esquentas; às fotos que nunca conseguíamos tirar; à amizade que criamos e desde já aos futuros reencontros que irão ter. Obrigada por esses quase 5 anos de Araraquara.

E às PIBS do coração que mesmo longe sempre estiverem presentes e que não importava a distância, quando nos encontrávamos parecia que nunca estivemos longe.

## Lista de Ilustrações

- Figura 1:** Microscopia eletrônica de varredura da clinoptilolita natural em aumento de 18kx, com escala de 1  $\mu\text{m}$ , sendo possível observar a ausência de fibras. ....29
- Figura 2:** Distribuição do tamanho de partículas da clinoptilolita quando triturada por 6 horas, em temperatura ambiente, em moinho de bola de ágata apresentando partículas com tamanho mediano de 7  $\mu\text{m}$ . ....30
- Figura 3:** Distribuição do tamanho de partículas da clinoptilolita quando triturada por 1 hora, em temperatura ambiente, em moinho de bola de alumina apresentando partículas com tamanho mediano menor que 3,7  $\mu\text{m}$ . ....31
- Figura 4:** Difratoograma de raio X obtido pelo método do pó, com varredura contínua de 0,02°/s entre  $5 < 2\theta < 45^\circ$  para a zeólita natural. Os padrões de difração de raios X (DRX) foram medidos com a radiação  $\text{CuK}\alpha$  em um difratômetro automático de pó. ....32
- Figura 5:** Difratoograma de raio X calculado para a zeólita natural de acordo com ficha 87847 da base de dados Inorganic Centre Structure Database (ICSD). ....32
- Figura 6:** Projeção cristalográfica da zeólita natural utilizando as posições atômicas da ficha 87847 da base de dados Inorganic Centre Structure Database (ICSD). ....33
- Figura 7:** Difratoograma de raio X calculado para a zeólita natural de acordo com ficha 66457 da base de dados Inorganic Centre Structure Database (ICSD). ....33
- Figura 8:** Projeção cristalográfica da zeólita natural utilizando as posições atômicas da ficha 66457 da base de dados Inorganic Centre Structure Database (ICSD). ....34
- Figura 9:** Avaliação da citotoxicidade contra células de Ehrlich, após aderência, de camundongos Swiss portadores do tumor ascítico de Ehrlich, pelo método de MTT. Foi utilizada diferentes concentrações da zeólita natural e zeólita comercial (50, 25, 5 e 0,5 mg/mL). A avaliação foi realizada em triplicata e esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos em percentual (%) através do teste 2way ANOVA pelo programa GraphPad Prism, como média  $\pm$  desvio padrão. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). ....35
- Figura 10:** Avaliação da citotoxicidade contra macrófagos peritoneais, após aderência, de camundongos Swiss. As células foram cultivadas na presença da zeólita natural e zeólita comercial na concentração de 0,5 mg/mL. A avaliação foi realizada em duplicata com cinco animais e esses resultados apresentam valores de

experimentos independentes. Os resultados foram expressos em percentual (%) como média  $\pm$  desvio padrão. ....36

**Figura 11:** Avaliação da produção de NO (óxido nítrico) a partir de macrófagos peritoneais, após aderência, de camundongos Swiss. As células foram cultivadas na presença da zeólita natural e zeólita comercial na concentração de 0,5 mg/mL, LPS na concentração de 5  $\mu$ g/mL como controle positivo e o meio RPMI como controle negativo. A avaliação foi realizada em duplicata com cinco animais e esses resultados apresentam valores de experimentos independentes. As concentrações de nitrito foram obtidas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de  $\text{NaNO}_2$  e os resultados expressos em  $\mu$ mols de nitrito/ $5 \times 10^5$  células, como média  $\pm$  desvio padrão.....37

**Figura 12:** Avaliação da inibição tumoral do Tumor de Ehrlich após a eutanásia de camundongos Swiss tratados com zeólita natural e comercial, por gavagem, 50mg/animal/duas vezes ao dia, em um período de 15 dias. A análise foi realizada através da comparação entre a média dos volumes dos tumores dos animais do grupo de estudo e a média dos volumes dos tumores dos animais do grupo controle. Os resultados foram expressos em percentual (%) como média. ....38

**Figura 13:** Quantificação de IL-10 liberada no sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais, após a aderência, de camundongos Swiss. As células foram cultivadas na presença da zeólita natural (0,5 mg/mL), zeólita comercial (0,5 mg/mL), LPS e apenas com meio de cultura RPMI-C (controle negativo). As concentrações de IL-10 foram determinadas através de teste ELISA com o kit BD OptEIA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Os resultados foram expressos em pg/mL, a análise estatística foi feita por intermédio do teste 2way ANOVA do programa GraphPad Prism como média  $\pm$  desvio padrão.....39

**Figura 14:** Quantificação de IL-1 $\beta$  liberada no sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais, após a aderência, de camundongos Swiss. As células foram cultivadas na presença da zeólita natural (0,5 mg/mL), zeólita comercial (0,5 mg/mL), LPS e apenas com meio de cultura RPMI-C (controle negativo). As concentrações de IL-1 $\beta$  foram determinadas através de teste ELISA com o kit BD OptEIA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Os resultados foram expressos em pg/mL, a análise estatística foi feita

por intermédio do teste 2way ANOVA do programa GraphPad Prism, como média  $\pm$  desvio padrão (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) .....41

**Figura 15:** Quantificação de TNF- $\alpha$  liberada no sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais, após a aderência, de camundongos Swiss. As células foram cultivadas na presença da zeólita natural (0,5 mg/mL), zeólita comercial (0,5 mg/mL), LPS e apenas com meio de cultura RPMI-C (controle negativo). As concentrações de TNF- $\alpha$  foram determinadas através de teste ELISA com o kit BD OptEIA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Os resultados foram expressos em pg/mL, a análise estatística foi feita por intermédio do teste 2way ANOVA do programa GraphPad Prism, como média  $\pm$  desvio padrão.....42

**Figura 16:** Peritônio de animal tratado com zeólita natural apresentando alta vascularização.....43

## Lista de Abreviaturas e Siglas

5-FU	5-Fluorouracil
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
ATB	Antibiótico
ICAM-1	Molécula-1 de Adesão Intercelular
IL-10	Interleucina 10
IL-1R	Receptor de Interleucina-1
IL-1ra	Receptor Antagonista de Interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
iNOS	Enzima oxido sintase
LPS	Lipopolissacarídeo de Parede Bacteriana
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
MZ	Zeólita Clinoptilolita Micronizada
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
PEC	Células do Exsudato Peritoneal
PMA	Meristato Acetato de Forbol
SOD	Superóxido dismutase
Th1	Linfócito T Helper tipo 1
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
W256	Tumor de Walker 256
ZSM-5	Zeolite Socony Mobil-5

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	8
1.1 Câncer.....	8
1.2 Sistema Imunológico .....	9
1.3 Citocinas .....	11
1.4 Tumor de Ehrlich .....	13
1.5 Terapias Antitumorais Atuais .....	13
1.6 Zeólita .....	14
2. OBJETIVOS DO PROJETO .....	19
2.1 Geral .....	19
2.2 Específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
3.1 Amostras .....	20
3.1.1 Caracterização da Clinoptilolita .....	20
3.1.2 Determinação do tamanho de partículas da Clinoptilolita.....	21
3.2 Animais .....	21
3.3 Linhagem celular tumoral utilizada e manutenção do tumor de Ehrlich <i>in vivo</i>	22
3.4 Isolamento das células tumorais de Ehrlich para testes <i>in vitro</i> .....	22
3.4.1 Avaliação da citotoxicidade contra células de Ehrlich pelo método de MTT	23
3.5 Inoculação das células tumorais .....	24
3.6 Grupos de Estudo .....	24
3.6.1 Obtenção de Macrófagos Peritoneais .....	25
3.6.2 Avaliação da Citotoxicidade contra Macrófagos Peritoneais .....	25
3.6.3 Obtenção de Sobrenadante das Culturas de Macrófagos Peritoneais ....	26
3.7 Determinação de Óxido Nítrico (NO).....	27

3.8	Obtenção dos Tumores.....	27
3.9	Avaliação do Crescimento Tumoral .....	28
3.10	Quantificação de Citocinas.....	28
3.11	Análise Estatística .....	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1	Caracterização da Clinoptilolita.....	29
4.1.1	Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	29
4.1.2	Distribuição do tamanho de partículas .....	30
4.1.3	Difração de raio X.....	31
4.2	Avaliação da Citotoxicidade contra células de Ehrlich pelo método de MTT.....	34
4.3	Avaliação da Citotoxicidade contra Macrófagos Peritoneais.....	35
4.4	Determinação de Óxido Nítrico (NO).....	36
4.5	Inibição Tumoral.....	38
4.6	Quantificação de Citocinas.....	39
4.6.1	Quantificação de IL-10 .....	39
4.6.2	Quantificação de IL-1 $\beta$ .....	40
4.6.3	Quantificação de TNF- $\alpha$ .....	41
5.	CONCLUSÃO .....	44
6.	REFERÊNCIAS.....	45

## Resumo

O câncer destaca-se pela alta incidência e mortalidade. Os tratamentos atualmente usados são agressivos e não específicos, com isso cresce a busca por novas drogas. Uma substância que vem despertando muito interesse são as zeólitas, minerais com característica porosa e estrutura conhecida. Estas possuem ações como adjuvante de vacinas, imunomoduladores e imunoestimuladores, o que desperta o interesse em estudá-las no modelo antitumoral. O presente estudo avaliou o efeito antitumoral e imunomodulador da zeólita natural clinoptilolita e da zeólita comercial, utilizando um modelo de câncer mamário (Tumor de Ehrlich). Para tanto a zeólita natural foi caracterizada (Microscopia Eletrônica de Varredura e Difração de raio X), realizada avaliação da viabilidade celular (ensaio de MTT), determinada a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais, quantificação de citocinas (ELISA) e avaliação do crescimento tumoral. As zeólitas natural e comercial apresentaram elevada ativação de macrófagos, e não produziram quantidades significativas de NO. A zeólita natural apresentou citotoxicidade frente ao Tumor de Ehrlich em duas concentrações testadas (5 e 25 mg/ml). Não houve liberação significativa da citocina IL-10, no entanto os grupos que foram reestimulados com zeólita natural apresentaram maior liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Nos testes *in vivo*, a zeólita comercial foi a única que apresentou inibição tumoral frente ao Tumor de Ehrlich, sendo necessários estudos mais aprofundados para definir a sua atividade antitumoral nesse tipo celular.

**Palavras-chave:** câncer; tumor de ehrlich; zeólita; clinoptilolita; citocinas; antitumoral.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

O câncer corresponde ao crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase), e conforme vão sendo invadidos estes vão perdendo suas funções (INCA, 2015). Sendo o câncer de mama o segundo tipo mais frequente no mundo e o mais incidente entre as mulheres (FERLAY et al., 2010).

A progressão do câncer é um processo complexo e de vários passos, onde as células normais vão adquirindo progressivamente um fenótipo neoplásico (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Estas células geralmente têm capacidade para formar novos vasos sanguíneos (angiogênese) que as nutrirão e manterão as atividades de crescimento descontrolado (INCA, 2015).

A partir da década de 70, o uso de terapias alternativas para pacientes oncológicos se popularizou, um dos motivos foi para minimizar os efeitos adversos desagradáveis dos tratamentos convencionais (JACONODINO; AMESTOY; THOFEHRN, 2008). Alopecia, mielotoxicidade, cardiotoxicidade, linfopenia, cistite hemorrágica, fotosensibilidade, hiperqueratose, náuseas, vômitos estão entre os efeitos adversos mais comuns nos tratamentos convencionais (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2015; GARRIDO et al., 2015).

A utilização ou associação das terapias alternativas com outras medidas terapêuticas veio com o objetivo de minimizar esses efeitos adversos. Assim, começou a busca por produtos naturais, visto que a natureza tem sido uma fonte de

produtos medicinais, muitas drogas foram obtidas dessa forma (JACONODINO; AMESTOY; THOFEHRN, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Atualmente, os estudos sobre as novas terapias visam conhecer melhor as vias de sinalização, devido à versatilidade das células cancerosas em adquirir capacidades funcionais como instabilidade genômica, habilidade em produzir fatores de crescimento e reprogramar sua energia metabólica permitindo sua sobrevivência e proliferação (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2015).

## **1.2 Sistema Imunológico**

Células do sistema imunológico possuem um duplo efeito sobre as células tumorais, podendo estar envolvidas na angiogênese patológica, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, mas também no processo de vigilância imunológica do tumor, eliminando essas células com a expressão de antígenos associados a tumores (VISSER et al., 2006).

Sabemos que a inflamação se dá de muitas formas e por diferentes mecanismos de indução, regulamentação e resolução. Nas últimas décadas, o espectro de condições inflamatórias mudou de reações inflamatórias agudas a doenças inflamatórias crônicas, como diabetes tipo 2, aterosclerose, asma, doenças neurodegenerativas e câncer. Sendo difícil superestimar o papel dos processos inflamatórios na saúde humana e doenças (MEDZHITOV, 2010).

Uma das manifestações da resposta do hospedeiro à infecção ou lesão é a inflamação aguda que caracteriza-se por uma resposta vascular com recrutamento de leucócitos, seguido por monócitos, que se diferenciam em macrófagos localmente (KARIN; LAWRENCE; NIZET, 2006).

Macrófagos são derivados a partir de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, estes exercem um papel central na fagocitose, interrompendo o crescimento e a morte intracelular de patógenos (DRIESSCHE et al., 2013; RAWJI; YONG, 2013). Eles têm muitas funções tróficas que são essenciais para a manutenção dos tecidos e da homeostase (POLLARD, 2009). Dependendo da natureza e extensão do problema, os macrófagos do tecido residente podem recrutar células adicionais (diferentes tipos de monócitos) para o tecido afetado, mesmo quando o problema não está associado com a infecção ou lesão (SCHENK et al., 2008; MEDZHITOV, 2010).

Existem dois fenótipos de macrófagos, os clássicos "M1" que estão associados com a secreção de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); e os alternativos "M2" que por outro lado, estão associadas com a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. A maioria das células na medula espinhal lesionada, particularmente nas fases iniciais da lesão, são M1 que promovem inflamação (DRIESSCHE et al., 2013; RAWJI; YONG, 2013). Essa inflamação em excesso está envolvida em diferentes condições patológicas, incluindo doenças autoimunes, doenças cardiovasculares e câncer (MONTFORT et al., 2009).

A complexa interação entre células cancerígenas e resposta imune do hospedeiro é de suma importância na progressão do câncer de mama. Ou seja, muitos cânceres podem subverter as funções das células dentro do microambiente do tumor para limitar respostas imunes mediadas por células específicas do câncer e para promover a angiogênese (MADERA et al., 2015).

A inflamação e o câncer também podem ser considerados processos interferentes, pois ambos compartilham dois mecanismos patofisiológicos em comum: o stress oxidativo e a rede de citocinas (ZARKOVIC et al., 2003).

### **1.3 Citocinas**

Citocinas são proteínas regulatórias de baixo peso molecular ou glicoproteínas que modulam a intensidade e a duração da resposta imune através da estimulação ou inibição da ativação, proliferação e/ou diferenciação de células alvo. Diferentes citocinas são conhecidas por terem papel diversificado na iniciação e progressão do câncer da mama (HAMIDULLAH; CHANGKIJA; KONWAR, 2012).

A interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória pleiotrópica, induz imunossupressão, supressão da angiogênese e modulação da apoptose, auxilia na fuga de vigilância imunológica do tumor e também pode exercer um efeito proliferativo ou inibitório sobre as células de tumor da mama. Inibe a síntese de citocinas de células T/macrófagos e inibe sua capacidade de apresentar antígenos (HAMIDULLAH; CHANGKIJA; KONWAR, 2012; ABDIN; SOLIMAN; SAIED, 2014). Isso porque a IL-10 regula negativamente a expressão de superfície de MHC de classe II e de várias moléculas co-estimuladoras sobre a APC, tais como CD80/86 e ICAM-1. Além disso, ela influencia a produção de diversos mediadores solúveis, incluindo IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e TNF- $\alpha$ , que suportam a ativação das células T e diferenciam em Th1 (NAUNDORF et al., 2009).

Sua produção, proporcional ao grau de inflamação, fornece feedback negativo contra respostas excessivas. E sua superexpressão por tumores, pode promover tolerância ou rejeição (LIU et al., 2012).

Existem duas formas conhecidas de IL-1, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que são codificadas por dois genes distintos (DINARELLO; SAVAGE, 1989; DINARELLO, 1996).

A IL-1 $\beta$  é expressa por muitas células, incluindo macrófagos, células NK, monócitos e neutrófilos (HU; MITCHO; RATH, 1988). Segundo Miller (2000), células de tumor de mama expressam IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1ra.

Considera-se que a ativação de IL-1/IL-1R conduz a uma cascata de citocinas secundárias que contribuem para a angiogênese, proliferação e invasão do tumor (JIN et al., 1997; PANTSCHENKO et al., 2003).

Alguns estudos comprovaram efeitos contraditórios da IL-1 $\beta$  no crescimento de células de tumor de mama (BURROWS et al., 1991; WU et al., 1994). Verifica-se que a concentração do peptídeo de IL-1 $\beta$  determina o seu sinal estimulador ou inibidor que regula o crescimento de tumores estrógeno-dependentes. Diferentes sinalizações celulares podem operar em resposta a diferentes níveis de IL-1 $\beta$  levando a dano genotóxico e apoptose celular ou crescimento celular (ROY; SARKAR; FELTY, 2006).

TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica envolvida na morte celular, migração celular e inflamação. Esta desempenha um papel central nas respostas inflamatórias envolvidas em respostas imunes inatas e específicas (MONTFORT et al., 2009; REGO; HELMS; DRÉAU, 2014; WANG et al., 2015).

TNF- $\alpha$  tem a capacidade de induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-1 (IL-1) e várias citocinas quimiotáticas (quimiocinas) (PALLADINO et al., 2003).

Atividades migratórias como direcionamento de leucócitos para o local do tumor e processos de migração para formação de novos vasos são controladas por citocinas inflamatórias e potencializadas pela ação do TNF- $\alpha$ . Paralelo a essas

atividades, esta, também é responsável pela mobilidade das células tumorais e formação de metástases em órgãos remotos (BARUCH, 2012).

IL-1 e TNF estimulam a si mesmas e a produção de umas as outras, amplificando a resposta inflamatória, induzem a adesão de moléculas (SMYTH et al., 2004), e estão muitas vezes presentes no meio inflamatório de muitos tumores (KATANOV et al., 2015).

O TNF- $\alpha$  atua como um importante alvo terapêutico em uma gama de doenças inflamatórias crônicas (FELDMANN; MAINI, 2003) e fornecendo um elo importante entre a inflamação e o câncer (KARIN; GRETEN, 2005; KARIN; LAWRENCE; NIZET, 2006).

#### **1.4 Tumor de Ehrlich**

Um modelo que tem sido utilizado em pesquisas é o tumor de Ehrlich, por ser um tumor de fácil manuseio, de proliferação rápida e capacidade de invasão (AZEVEDO et al., 2014). O tumor de Ehrlich é uma linha de células tumorais transplantável utilizado para avaliações experimentais, é uma neoplasia de origem epitelial maligna, correspondente ao adenocarcinoma mamário de camundongos, que possui características agressivas. Esse tumor se desenvolve em forma ascítica ou sólida, dependendo do local de inoculação (VERÇOSA et al., 2007; OSIPOV et al., 2014; AZEVEDO et al., 2014).

#### **1.5 Terapias Antitumorais Atuais**

Dentre as terapias antitumorais convencionais, algumas muito utilizadas atualmente são a quimioterapia e radioterapia.

O Tratamento quimioterápico no câncer de mama é geralmente utilizado após realização de algum procedimento cirúrgico, quando o tumor está com uma dimensão elevada, promovendo a diminuição desse tumor para permitir uma cirurgia conservadora, ou no caso de doença metastática.

Essa terapia atua no processo de divisão celular, matando todas as células que encontram-se em divisão. Porém, a terapia afeta também as células normais do organismo que estão nessa fase do ciclo celular, ocasionando em diversos efeitos colaterais como queda de cabelo, aftas (mucosite), vômitos, diarreia, anemia, baixa da imunidade (baixa dos glóbulos brancos), risco de sangramento (baixa de plaquetas) entre outros.

A radioterapia faz uso de radiações ionizantes (raio X, gama, elétrons) para inibir o crescimento de células anormais. Essa terapia é utilizada geralmente após cirurgia ou quimioterapia, ou quando há comprometimento de muitos linfonodos, no tratamento paliativo.

O efeito mais comum da radioterapia é a queimadura da pele na área irradiada, também pode ocorrer fadiga, desconforto na axila, raramente dor torácica ou problemas cardíacos, queda temporária na produção de sangue (anemia, baixa de glóbulos brancos e de plaquetas) (ONCOGUIA, 2015).

## **1.6 Zeólita**

Devido à necessidade em desenvolver novas terapias antitumorais, as zeólitas vêm sendo bastante estudadas recentemente por suas diversas atividades biológicas, entre elas, a de apresentar um papel de estimulante do sistema imunológico, agindo como um superantígeno, e ativar fatores de transcrição que expressam citocinas pró-inflamatórias (PAVELIC et al., 2001).

Zeólitas são aluminossilicatos hidratados formados por estruturas cristalinas tridimensionais de tetraedros de  $\text{SiO}_4$  e de  $\text{AlO}_4$ , ligados entre si pelos quatro vértices de oxigênio. Nessa configuração, as cargas negativas dos tetraedros de  $\text{AlO}_4$  são compensadas por cátions intersticiais ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Ba}^{2+}$ ) e formam uma estrutura aberta, com grandes canais, por onde a água e outras moléculas podem se alojar e apresentar considerável liberdade de movimento, permitindo a troca iônica e uma hidratação reversível (DANA, 1981; SHINZATO, 2007).

A capacidade de adsorção das zeólitas depende do seu volume poroso e do diâmetro dos poros (daí o nome peneiras moleculares). Isto permite que elas sejam utilizadas como adsorventes, tanto em processos de purificação como em processos de separação. As zeólitas sintéticas, como por exemplo as zeólitas A, X, Y, L, F e ZSM-5, são utilizadas como catalisadores devido à sua grande uniformidade na composição e elevado teor de pureza (AGUIAR; NOVAES; GUARINO, 2002).

Zeólitas naturais são formadas a partir da precipitação de fluidos, como em ocorrências hidrotermais, ou pela alteração de vidros vulcânicos (LUZ, 1995). Podem ocorrer em amígdalas e fendas de rochas ígneas, principalmente em vulcânicas básicas, e também como constituintes de rochas metamórficas de baixo grau e sedimentares (HAY; SHEPPARD, 2001).

As zeólitas têm inúmeras atividades como imuno-estimuladora, adjuvante de vacinas, antihiperlipemizante, antidiarreico, adsorventes, absorventes, catalisadores, princípios ativos cosméticos e farmacêuticos, corretivos de solo (PAVELIC et al., 2001; JUNG et al., 2010; ZITO et al., 2012; JURKIC et al., 2013). Também pode ser utilizada para hemodiálises, cartuchos em hemoperfusão, cicatrizações, incisões cirúrgicas, detoxificantes e descontaminantes quando adicionadas em dietas animais

para reduzir metais pesados, poluentes orgânicos, radionuclídeos e antibióticos (JURKIC et al., 2013).

Uma vez que no Brasil as jazidas de zeólitas naturais ainda não vêm sendo exploradas, este tipo de material não se encontra disponível no mercado nacional.

As principais zeólitas exploradas no mundo são a clinoptilolita, cabazita, mordenita e phillipsita (REZENDE, 2002), sendo, provavelmente, a clinoptilolita a mais abundante de todas as espécies de zeólitas (MING; DIXON, 1987; SHINZATO, 2007). A Clinoptilolita é uma substância inerte, porém algumas zeólitas podem ser muito perigosas para a saúde humana como a erionite, um tipo fibroso de zeólita natural, que causa um alto incidente de mesoteliomas e fibroses em humanos e animais experimentais (JURKIC et al., 2013).

A clinoptilolita altera a composição dos íons, porém não é a causa principal de morte celular. O seu efeito, em parte, é devido à adsorção de fatores de crescimento do soro no meio. Propriedades em influenciar as vias de sinalização e induzir a imunidade podem explicar os seus efeitos na cicatrização (KATIC et al., 2006).

Em estudos recentes sobre câncer colorretal foi utilizada a terapia com 5-Fluorouracil (5-FU), um dos agentes quimioterápicos mais efetivos em câncer colorretal, de estômago, mama, cabeça e pescoço. Porém, essa terapia tem alguns pontos negativos como múltiplos efeitos adversos tóxicos, variável absorção gastrointestinal e rápida degradação, o que impede sua administração via oral. A zeólita por ser um promissor carregador via oral foi utilizada no presente estudo. Dois tipos de zeólitas com diferentes perfis de liberação e tamanhos de partículas foram utilizadas promovendo a encapsulação do 5-FU. Essa combinação possibilitou a administração desse agente quimioterápico via oral e contribuiu para um aumento

significativo da biodisponibilidade da droga e conseqüentemente da sua eficiência (VILAÇA et al., 2013; SPANAKIS et al., 2014).

Experimentos realizados por ZARKOVIC e colaboradores (2003) em várias culturas de células tumorais mostrou que a MZ (zeólita clinoptilolita micronizada) reduziu a taxa metabólica das células tumorais e aumentou a ligação de HNE com a albumina in vitro, o que atenuou seus efeitos citotóxicos. Um reduzido nível de peroxidação lipídica através do aumento de SOD (superóxido dismutase) no fígado, possivelmente resultou no seu potencial antioxidante. E mostrou que a MZ pode ter um efeito antioxidante e antitumoral ao mesmo tempo, visto que células tumorais e normais respondem diferente à esse efeito. No carcinoma W256 tratado com Doxorrubicina, pôde-se observar um efeito antioxidante no estroma, mas não nas células tumorais. Notou-se também um aumento dos efeitos antimetastáticos da Doxorrubicina mostrando que a MZ pode ser utilizada como suplemento alimentar durante a quimioterapia do câncer.

Para confirmar o efeito imunomodulatório da MZ, PAVELIC e seus colaboradores (2002) examinaram o processo após a administração de MZ via intraperitoneal. Observou que o efeito de MZ era dose dependente, doses maiores que 3 mg/camundongo eram tóxicas, entretanto, doses menores apresentaram efeito pró-inflamatório. Notou-se que a depleção de NO pelos macrófagos peritoneais acumulados no peritônio pode ter um aumento significativo de geração de superóxido e nesse caso pode intensificar o efeito de MZ.

Clinoptilolita mostrou também um potencial na terapia antiviral tanto para aplicações locais na pele contra infecções de herpes vírus quanto no tratamento oral de adenovírus ou infecções por enterovirus. Esse efeito é baseado na adsorção de

partículas virais em cavidades externas da superfície da clinoptilolita (JURKIC et al., 2013).

As zeólitas, por possuírem um papel de estimuladoras do sistema imunológico, podem agir diminuindo/interrompendo o crescimento tumoral com a ativação de macrófagos e expressão de citocinas no microambiente tumoral. Para isso, este trabalho foi baseado no tratamento de camundongos inoculados com Tumor de Ehrlich com os compostos estudados (zeólita natural e comercial) com o objetivo de avaliar a sua atividade antitumoral e imunomoduladora.

## 2. OBJETIVOS DO PROJETO

### 2.1 Geral

Avaliar o efeito antitumoral e imunomodulador de uma zeólita natural (clinoptilolita) e outra comercial.

### 2.2 Específicos

- I. Caracterizar e padronizar uma suspensão a base de zeólita natural.
- II. Avaliar a toxicidade *in vitro* das zeólitas natural e comercial em macrófagos peritoneais e no Tumor de Ehrlich.
- III. Determinar o efeito da zeólita natural na ativação de macrófagos peritoneais em comparação com uma zeólita comercial.
- IV. Determinar o efeito antitumoral *in vivo* das zeólitas natural e comercial no modelo de tumor de Ehrlich transplantados em camundongos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostras**

No referido projeto foram utilizados dois tipos de zeólita (natural e comercial) administradas via oral por gavagem.

A zeólita natural (clinoptilolita) foi coletada da jazida mineral de San Andrés, localizada na cidade de Holguín da região oriental de Cuba, a qual foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Alexander Batista Duharte, do Centro de Toxicología y Biomedicina, da Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba, Cuba.

A zeólita comercial utilizada foi a CBV-100 de Sódio, que foi cedida pelo professor Doutor Leandro Martins, do Grupo de Pesquisa em Catálise, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Araraquara.

##### **3.1.1 Caracterização da Clinoptilolita**

A caracterização foi realizada em colaboração com o Instituto de Química de Araraquara, em que foram realizados os testes de difração de raio X e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Na MEV foi possível analisar as características do pó de clinoptilolita em um aumento de 18kx, com escala de 1  $\mu\text{m}$ .

Os dados de difração de raios X foram coletados com varredura contínua de  $0,02^\circ/\text{s}$  entre  $5 < 2\theta < 45^\circ$ . Os padrões de difração de raios X (DRX) foram medidos com a radiação  $\text{CuK}\alpha$  em um difratômetro automático de pó.

As fases presentes nas amostras foram identificadas fazendo uso do software POWDERCELL 2.3 e base de dados Inorganic Centre StructureDatabase (ICSD). Foram identificadas várias fases possíveis, mas algumas foram descartadas.

### 3.1.2 Determinação do tamanho de partículas da Clinoptilolita

Devido ao elevado tamanho das partículas, a zeólita foi submetida a processos como de trituração em moinho de bolas de ágata e de alumina e sedimentação em coluna, para separação do sobrenadante, seguido de evaporação para ficar com partículas de tamanho inferior a 10  $\mu\text{m}$ .

Para determinar o tamanho de partículas, os testes foram realizados no laboratório de cerâmica, do Departamento de Engenharia de Materiais, da UFSCar.

Para a determinação do tamanho de partículas é necessário ter a densidade do material, que foi realizado através de um picnômetro de gás hélio (AccuPyc 1330, Micromeritics (USA)).

A análise de distribuição do tamanho de partículas foi realizada no equipamento Sedigraph 5000ET (Micromeritics, USA), utilizando 2 g do material, mais 20 g de água e 5 gotas de um defloculante (no caso, poli-acrilato de amônio).

## 3.2 Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongo da linhagem Swiss, pesando entre 25-30g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Câmpus de Araraquara. Estes animais foram mantidos em gaiolas em grupos de três, 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*.

Estes foram sacrificados em câmara de  $\text{CO}_2$ . Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Parecer CEUA/FCF/CAr. 17/2013).

### **3.3 Linhagem celular tumoral utilizada e manutenção do tumor de Ehrlich *in vivo***

A manutenção das células tumorais no laboratório se deu na forma ascítica *in vivo* através de repiques semanais. Foi realizada a eutanásia do camundongo com tumor ascítico, em câmara de CO<sub>2</sub>, em seguida faz-se a punção do líquido ascítico com uma seringa de insulina de 1,0 mL e agulha de diâmetro 0,7 x 25 mm com o bisel voltado para baixo. Observa se há formação de bolhas na seringa e remoção das mesmas. Em seguida, com o bisel da agulha voltado para cima, é feita a inoculação intraperitonealmente de 10<sup>7</sup> células tumorais em um volume de 0,2 mL em camundongos receptores a cada sete dias, segundo metodologia descrita na literatura (FECCHIO et al., 1990, MIRANDA-VILELA et al., 2011).

Os repiques devem ser realizados semanalmente devido à viabilidade das células tumorais, após esse período o camundongo fica muito debilitado; estes sobrevivem em média duas semanas após o repique.

### **3.4 Isolamento das células tumorais de Ehrlich para testes *in vitro***

Após 5 dias de evolução do tumor, período no qual ainda não há influxo significativo de células inflamatórias (FECCHIO et al., 1990), houve a eutanásia dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma ascítica em câmara de CO<sub>2</sub> e estes tiveram o líquido ascítico retirado assepticamente em fluxo laminar Classe 100 (Veco, Ind. Bras.).

Destes animais foram retirados 2 mL do líquido ascítico contendo as células de tumor de Ehrlich da cavidade intraperitoneal, e mantidos em tubo Falcon em banho de gelo. Adicionou-se 9,0 mL de NH<sub>4</sub>Cl e homogenizou para lisar as hemácias. Centrifugou por 5 minutos a 300G. O sobrenadante foi desprezado e

adicionado 9,0 mL de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) para lavar as células, homogeneizou e centrifugou novamente o tubo (repete-se duas vezes essa lavagem). Após a lavagem com PBS, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 1,0 mL de meio NCTC completo (meio NCTC, soro fetal bovino e ATB), homogeneizando após a adição. Retirou-se 10 µL do tubo para ajustar a concentração de células com diluições em Azul de Trypan e foi feita a contagem em Câmara de Neubauer. Adicionou a quantidade necessária de meio NCTC para obter a concentração de células necessária. Homogeneizou e pipetou-se 200 µl em cada poço da placa de 96 poços, incubou em estufa por 24h.

#### **3.4.1 Avaliação da citotoxicidade contra células de Ehrlich pelo método de MTT**

Para a determinação da viabilidade celular, foi empregada a técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) de acordo com Mossman (1983). O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

Após plaquear as células tumorais de Ehrlich, as amostras de clinoptilolita e zeólita comercial foram preparadas em concentrações de 50, 25, 5 e 0,5 mg/mL, e mantidas em mesa agitadora por 24h.

Após incubação de 24h das células, o sobrenadante da placa foi desprezado e as amostras adicionadas nas diversas concentrações, pipetando um volume de 200 µl em cada poço; e outra parte da placa foi pipetada apenas com meio de

cultura para utilizar como controle negativo. Todas as amostras foram feitas em triplicata. A placa foi incubada em estufa por mais 24h.

Em seguida, a solução de MTT foi preparada no escuro, pois esse composto sofre oxidação em contato com a luz. Foi obtida pela adição de 10,0 mg de MTT e 2,0 mL de PBS, homogeneizando até total dissolução. Adicionou-se 8,0 mL de meio NCTC incompleto e homogeneizou-se. Pipetou-se 100 µl da solução de MTT, no escuro, em cada poço da placa e incubou durante 3h. Para revelar a reação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µl de álcool isopropílico em cada poço da placa. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm com filtro de referência de 620 nm, com agitação por dois minutos.

### **3.5 Inoculação das células tumorais**

Após assepsia local com álcool 70%, foram inoculados subcutaneamente 0,2 mL da suspensão tumoral ajustada na concentração de  $10^7$  células tumorais/mL em meio NCTC completo.

### **3.6 Grupos de Estudo**

Os animais foram distribuídos em grupos, com três animais em cada, e receberam o tratamento durante 15 dias:

**Grupo I:** controle tumoral – foram inoculadas as células tumorais no camundongo e realizou-se a administração de PBS por gavagem duas vezes ao dia.

**Grupo II:** foram inoculadas as células tumorais no camundongo e realizou-se a administração da zeólita natural por gavagem 50 mg/animal/duas vezes ao dia, cada animal pesando 25-30g (PAVELIC et al., 2002).

**Grupo III:** foram inoculadas as células tumorais no camundongo e realizou-se a administração da zeólita comercial por gavagem 50 mg/animal/duas vezes ao dia, cada animal pesando 25-30g (PAVELIC et al., 2002).

Observação: Os animais receberam o tratamento duas vezes ao dia (manhã e tarde), devido ao elevado volume a ser administrado para solubilizar esse mineral. E foi administrado um volume de 500 µL por dia por animal.

### **3.6.1 Obtenção de Macrófagos Peritoneais**

Os animais inoculados com células tumorais, tratados ou não, foram inoculados (por via intraperitoneal) com 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3% (Difco Lab. LTDA) três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. Dentro de um fluxo laminar, após a antissepsia do abdômen do animal com álcool 70%, o peritônio dos camundongos foi exposto e foi inoculado 5,0 mL de PBS estéril, pH 7,4; gelado, na cavidade abdominal, aplicando-se leve massagem para estimular a liberação das células peritoneais. As células do exsudato peritoneal (PEC) foram retiradas com a mesma seringa e mantidas em banho de gelo em tubo Falcon. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 300G, lavados com PBS e centrifugados novamente. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1,0 mL de meio RPMI completo em cada tubo. Foram retirados 10 µL de cada tubo e realizado a diluição com Azul de Lázaro, as células contadas em Câmara de Neubauer e ajustadas a uma concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL em meio de cultura.

### **3.6.2 Avaliação da Citotoxicidade contra Macrófagos Peritoneais**

A partir dos macrófagos peritoneais obtidos, foi realizado o plaqueamento de 100 µl de célula + 100 µl de meio RPMI completo (meio RPMI, 2β-mercaptoetanol

(Sigma) a  $2 \times 10^{-5} \text{M}$ , penicilina 100U/mL (Sigma), estreptomicina 100 U/mL (Sigma), L-glutamina 2 mM (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab)) em cada poço da placa de 96 poços. Incubou-se em estufa durante 1h para adesão das células.

Após a incubação, as culturas foram tratadas com amostras de zeólita natural e zeólita comercial (0,5 mg/mL), LPS (controle positivo) (5  $\mu\text{g/mL}$ ), e meio de cultura (controle negativo). Foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de amostra (zeólitas, LPS e meio de cultura) + 100  $\mu\text{l}$  de meio de cultura em cada poço da placa. As culturas foram incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5%  $\text{CO}_2$ .

Foram adicionados à placa 100  $\mu\text{l}$  de solução de MTT, preparada de acordo com o item 3.4.1, e incubados por 3h.

Após o período de incubação foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico para revelação e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm com filtro de 620 nm e agitação por dois minutos.

### **3.6.3 Obtenção de Sobrenadante das Culturas de Macrófagos Peritoneais**

A partir dos macrófagos peritoneais obtidos em 3.6.1, foi realizado o plaqueamento, em placa de 48 poços, de 300  $\mu\text{L}$  de célula + 300  $\mu\text{L}$  de meio RPMI completo em cada poço da placa. Incubou-se em estufa durante 1h para adesão das células, assim como no item anterior.

Após a incubação em estufa por 1h, as culturas foram tratadas com amostras de zeólita natural, zeólita comercial (0,5 mg/mL), LPS (controle positivo) (5  $\mu\text{g/mL}$ ) e meio de cultura (controle negativo). Foram adicionados 300  $\mu\text{l}$  de amostra (zeólitas, LPS e meio de cultura) + 300  $\mu\text{l}$  de meio de cultura em cada poço da placa. As culturas foram incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5%  $\text{CO}_2$ .

Essas culturas foram transferidas para Eppendorfs e centrifugadas a 1400 G por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi retirado (tomando cuidado para não encostar no pellet formado no fundo do Eppendorf) e dividido em outros dois Eppendorfs, que posteriormente foram utilizados para quantificar as citocinas IL-10, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

### **3.7 Determinação de Óxido Nítrico (NO)**

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais através da reação de diazotação com o reagente de Griess, conforme descrito por Green e colaboradores (1982). Após as células do exsudato peritoneal serem plaqueadas, tratadas com as amostras e colocadas para incubar por 24 horas, segundo o item 3.6.2, alíquotas de 50  $\mu$ L do sobrenadante da cultura destas células foram transferidas para outra placa de cultura de células estéril contendo 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.) e acrescentou-se 50  $\mu$ L da solução de Griess. Após 10 min de incubação a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm sem agitação. As concentrações de NO liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares de nitrito de sódio conhecidas e os valores foram expressos em  $\mu$ mols de nitrito/mL.

### **3.8 Obtenção dos Tumores**

O peso dos camundongos e o tamanho dos tumores foram acompanhados e medidos por 15 dias, durante o tratamento, e então, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Os tumores foram retirados com auxílio de material cirúrgico.

### 3.9 Avaliação do Crescimento Tumoral

Foram medidos os diâmetros maior e menor dos tumores retirados, utilizando paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper. Os tumores também foram pesados 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.,1995):

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

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

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

$V_2$  = Média dos volumes dos tumores tratados com PBS (controle)

### 3.10 Quantificação de Citocinas

As citocinas IL-10, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais por meio do teste ELISA, utilizando o BD OptEIA Kit (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.11 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad Prism 6.0 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 três animais e cada determinação foi executada em triplicata.

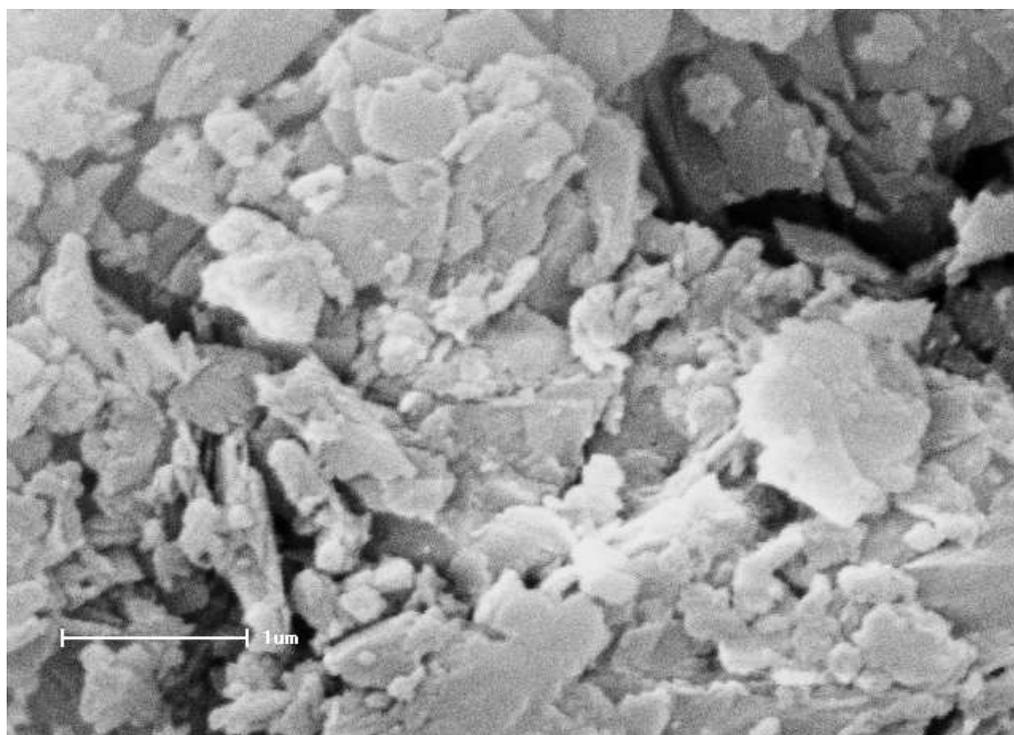
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da Clinoptilolita

#### 4.1.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Observando a imagem abaixo (Figura 1) capturada através da MEV, realizada antes da trituração para ajuste do tamanho de partículas, podemos analisar o pó e suas características.

A principal característica que deve ser analisada é a presença de fibras devido à contaminação com outros tipos de zeólitas e minerais como erionita e asbestos com propriedades carcinogênicas (PAVELIC et al., 2001; CARBONE; YANG, 2012). Portanto, realizando a MEV com a clinoptilolita do atual estudo, é possível perceber que não há presença de fibras, sendo potencialmente inócua.



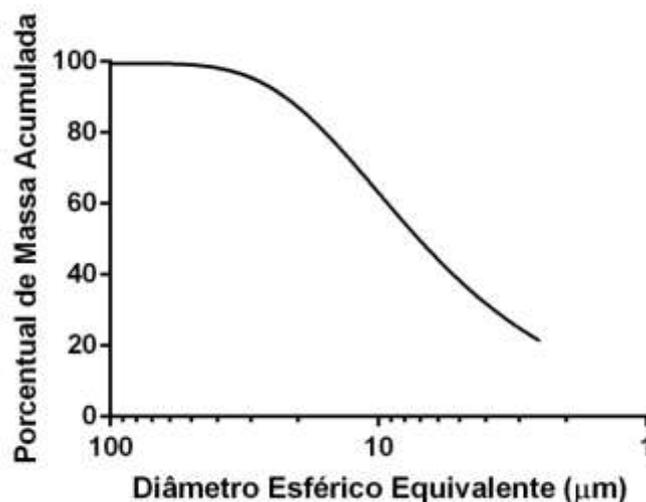
**Figura 1:** Microscopia eletrônica de varredura da clinoptilolita natural em aumento de 18kx, com escala de 1 µm, sendo possível observar a ausência de fibras.

#### 4.1.2 Distribuição do tamanho de partículas

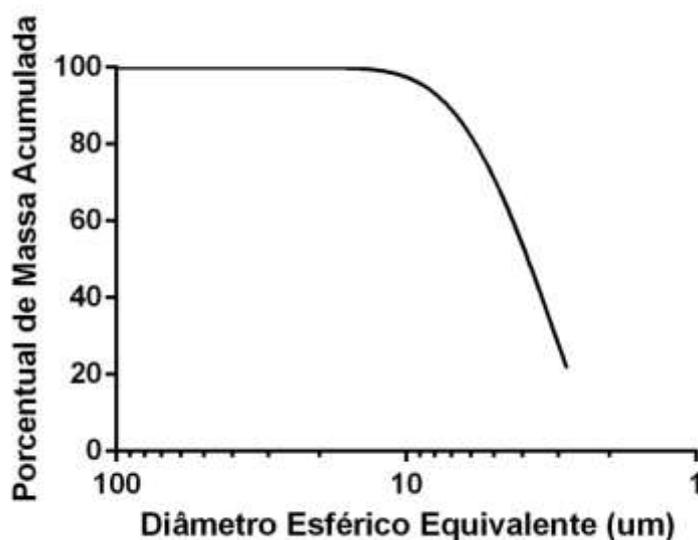
A escolha do tamanho de partículas foi em observação a vários artigos publicados em que o tamanho ideal varia de 1,5 a 3  $\mu\text{m}$  (PAVELIC et al., 2001; KATIC et al., 2006; KIM et al., 2013).

Para a determinação do tamanho de partículas foi necessário determinar a densidade da clinoptilolita, que foi de 2,2064 g/cm<sup>3</sup>.

Para a clinoptilolita chegar ao tamanho de partículas desejado, primeiramente a amostra foi triturada em um moinho de bola de ágata por 6 horas em temperatura ambiente, em que a moagem não foi tão eficiente como pode ser observado na Figura 2, onde o tamanho mediano das partículas foi de 7  $\mu\text{m}$ , com todas as partículas abaixo de 40  $\mu\text{m}$ . Já em um segundo momento a amostra foi triturada em um moinho de bolas de alumina por 1 hora em temperatura ambiente, apresentando 50% das partículas menores que 3,7  $\mu\text{m}$ , chegando ao tamanho desejável (Figura 3).



**Figura 2:** Distribuição do tamanho de partículas da clinoptilolita quando triturada por 6 horas, em temperatura ambiente, em moinho de bola de ágata apresentando partículas com tamanho mediano de 7  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3:** Distribuição do tamanho de partículas da clinoptilolita quando triturada por 1 hora, em temperatura ambiente, em moinho de bola de alumina apresentando partículas com tamanho mediano menor que 3,7  $\mu\text{m}$ .

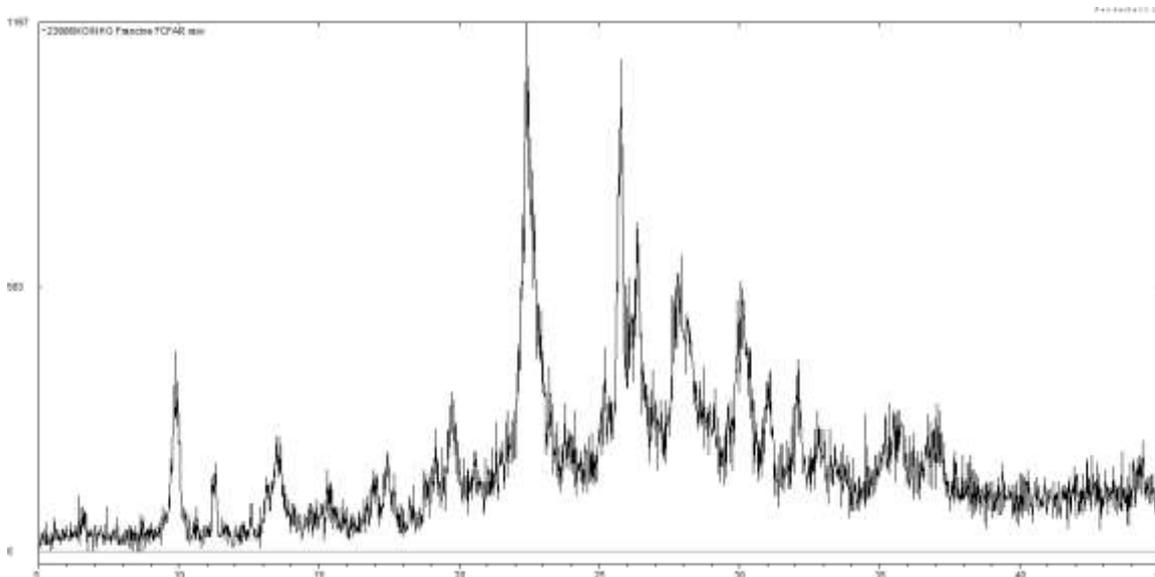
#### 4.1.3 Difração de raio X

O teste de difração de raio x foi realizado para determinar a possível estrutura da clinoptilolita natural. Após a realização da análise, foi utilizada uma base de dados (Inorganic Centre Structure Database (ICSD)) para realizar comparações com as estruturas de clinoptilolita já descritas, e assim, determinar a estrutura da clinoptilolita de estudo e a sua projeção cristalográfica.

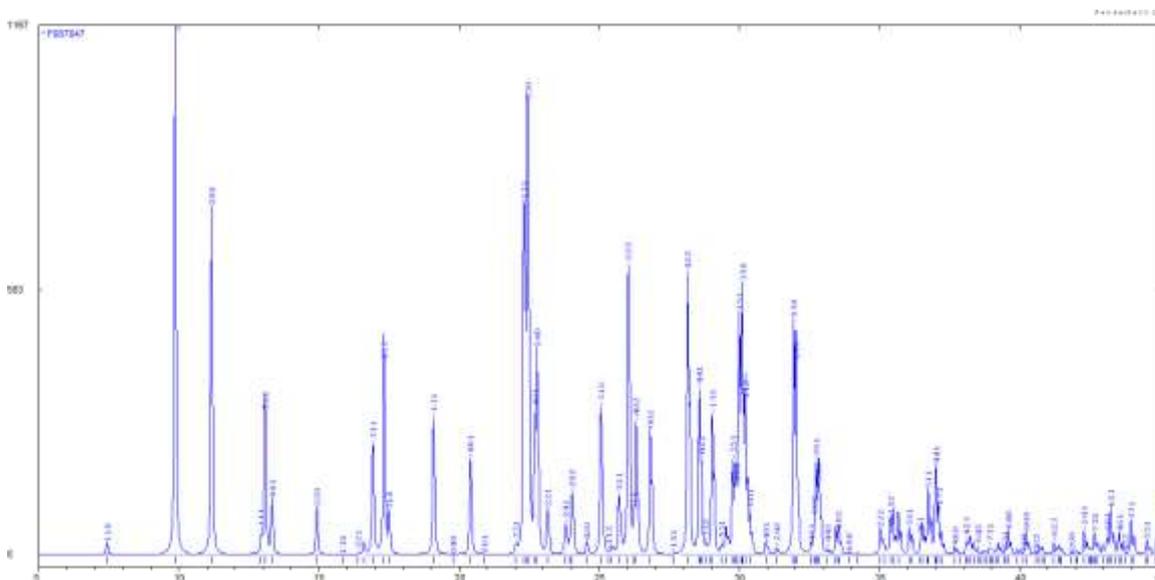
Abaixo está o difratograma da amostra (Figura 4) e através da sobreposição de difratogramas de fichas coletadas da base de dados foi possível encontrar aquelas que mais se aproximaram com a clinoptilolita do estudo, que estão apresentadas nas Figuras 5 e 7, e sugerir uma provável projeção cristalográfica (Figuras 6 e 8) de acordo com as posições atômicas da ficha escolhida.

Definida a estrutura da clinoptilolita, foi possível escolher uma zeólita sintética com estrutura próxima a natural para dar continuidade aos testes e ter um parâmetro

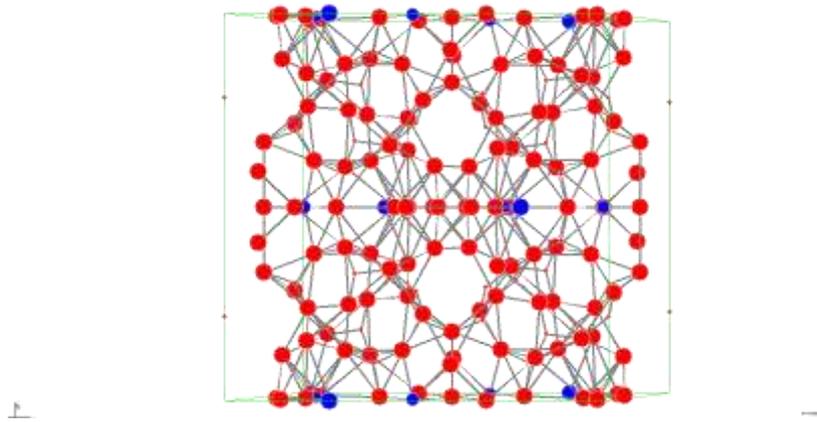
de comparação. A escolhida foi a zeólita Y CBV100 (Zeolyst) com o cátion sódio na estrutura.



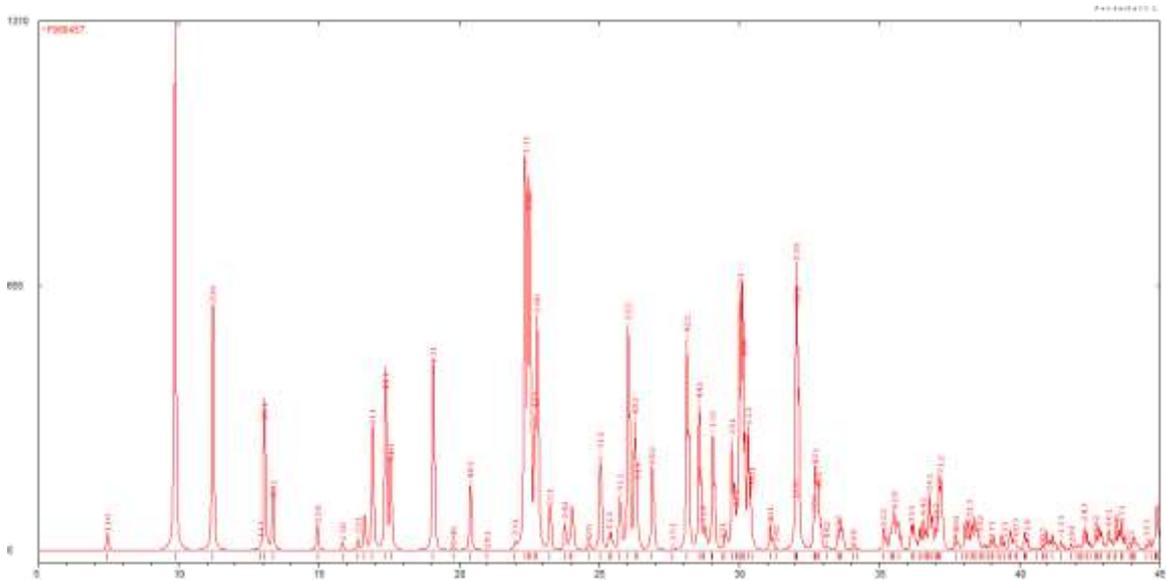
**Figura 4:** Difratoograma de raio X obtido pelo método do pó, com varredura contínua de  $0,02^\circ/\text{s}$  entre  $5 < 2\theta < 45^\circ$  para a zeólita natural. Os padrões de difração de raios X (DRX) foram medidos com a radiação  $\text{CuK}\alpha$  em um difratômetro automático de pó.



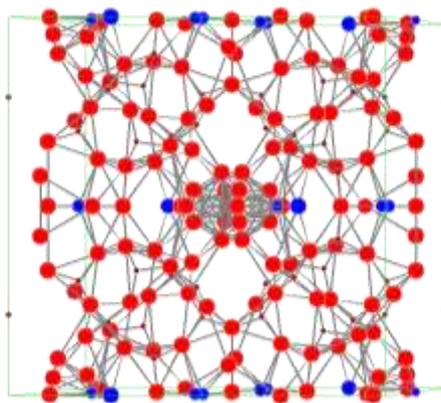
**Figura 5:** Difratoograma de raio X calculado para a zeólita natural de acordo com ficha 87847 da base de dados Inorganic Centre Structure Database (ICSD).



**Figura 6:** Projeção cristalográfica da zeólita natural utilizando as posições atômicas da ficha 87847 da base de dados Inorganic Centre Structure Database (ICSD).



**Figura 7:** Difratograma de raio X calculado para a zeólita natural de acordo com ficha 66457 da base de dados Inorganic Centre Structure Database (ICSD).

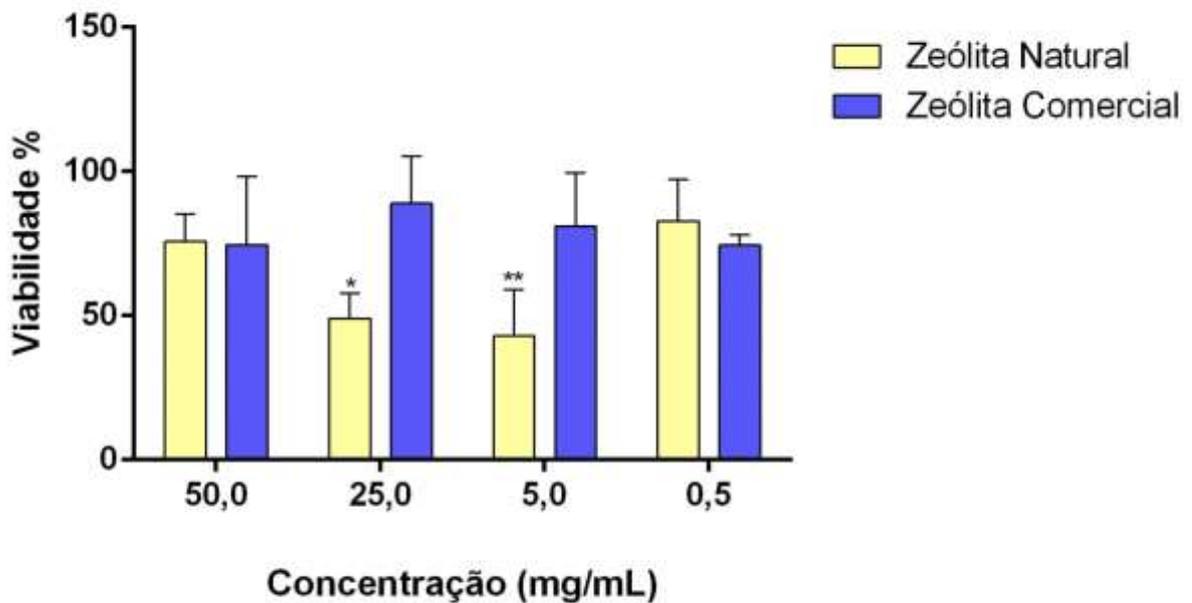


**Figura 8:** Projeção cristalográfica da zeólita natural utilizando as posições atômicas da ficha 66457 da base de dados Inorganic Centre Structure Database (ICSD).

## **4.2 Avaliação da Citotoxicidade contra células de Ehrlich pelo método de MTT**

Analisando a viabilidade celular frente às células do tumor de Ehrlich, não foram observadas diferenças significativas no teste de MTT entre a zeólita natural e a zeólita comercial nas concentrações testadas, porém observou-se diferença significativa da zeólita natural em relação ao controle negativo nas concentrações de 25 mg/mL e 5 mg/mL.

Assim como PAVELIC (2001), cujo efeito da zeólita natural (MZ) na concentração de 50 mg/mL mostrou inibição significativa em células MCF-7, no estudo foi utilizado o mesmo tipo de zeólita natural (clinoptilolita) com tamanho médio de 2,9  $\mu\text{m}$ .



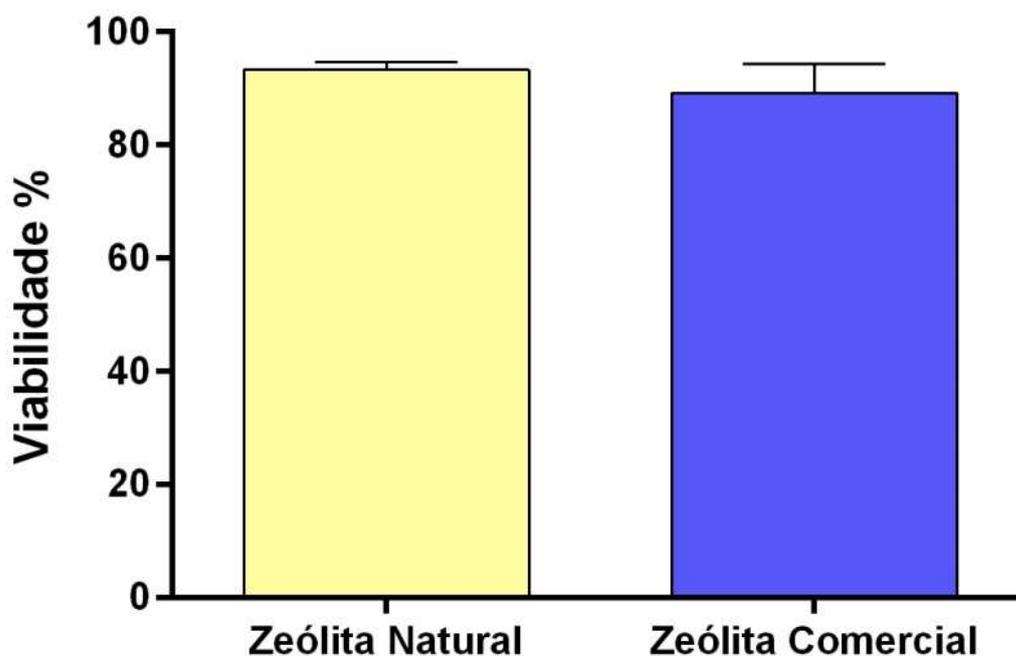
**Figura 9:** Avaliação da citotoxicidade contra células de Ehrlich, após aderência, de camundongos Swiss portadores do tumor ascítico de Ehrlich, pelo método de MTT. Foi utilizada diferentes concentrações da zeólita natural e zeólita comercial (50, 25, 5 e 0,5 mg/mL). A avaliação foi realizada em triplicata e esses resultados apresentam valores de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos em percentual (%) através do teste 2way ANOVA pelo programa GraphPad Prism, como média  $\pm$  desvio padrão. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

#### 4.3 Avaliação da Citotoxicidade contra Macrófagos Peritoneais

Nos ensaios de viabilidade para macrófagos foram testadas diversas concentrações e foi adotada a concentração de 0,5 mg/mL para obtenção de sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais, pois através de testes anteriores com diferentes concentrações de zeólitas, esta foi a maior concentração que não foi citotóxica para o macrófago.

Os macrófagos são uma das primeiras células a serem ativadas na resposta imunológica e liberam mais de cem compostos ao meio extracelular, entre eles podemos observar os reativos intermediários de nitrogênio (NO) (LOPES et al., 2003).

Nas amostras testadas na concentração de 0,5 mg/mL, a viabilidade celular observada foi próxima de 100%, mostrando que as amostras não foram citotóxicas em macrófagos peritoneais nas concentrações testadas.



**Figura 10:** Avaliação da citotoxicidade contra macrófagos peritoneais, após aderência, de camundongos Swiss. As células foram cultivadas na presença da zeólita natural e zeólita comercial na concentração de 0,5 mg/mL. A avaliação foi realizada em duplicata com cinco animais e esses resultados apresentam valores de experimentos independentes. Os resultados foram expressos em percentual (%) como média  $\pm$  desvio padrão.

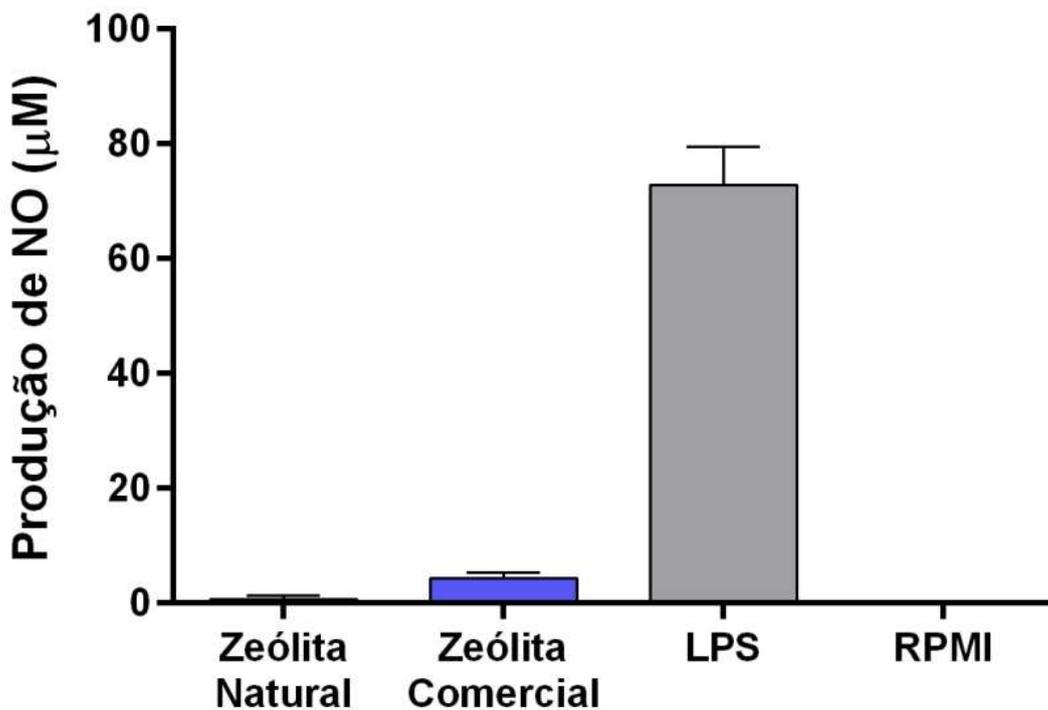
#### 4.4 Determinação de Óxido Nítrico (NO)

O NO é identificado como uma molécula multifuncional, sendo a regulação do sistema imune uma de suas funções. O aumento na produção de NO pelos macrófagos pode alterar o equilíbrio entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e a virulência do patógeno, diminuindo a suscetibilidade às infecções (LOPES et al., 2003).

O NO é produzido através da ativação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), e esse composto possui uma dupla atividade. Ao mesmo tempo em que protege

contra bactérias intracelulares, parasitas e algumas infecções virais, ele pode promover a angiogênese e metástase (BOGDAN, 1998). Segundo GALLI (2003), iNOS tem sido encontrada em tumores sólidos; porém NO também possui uma atividade antitumoral inibindo a proliferação, promovendo diferenciação e reduzindo a propagação metastática de alguns tipos de células tumorais.

Não foi observada produção significativa de NO em macrófagos peritoneais na concentração testada (0,5 mg/mL).

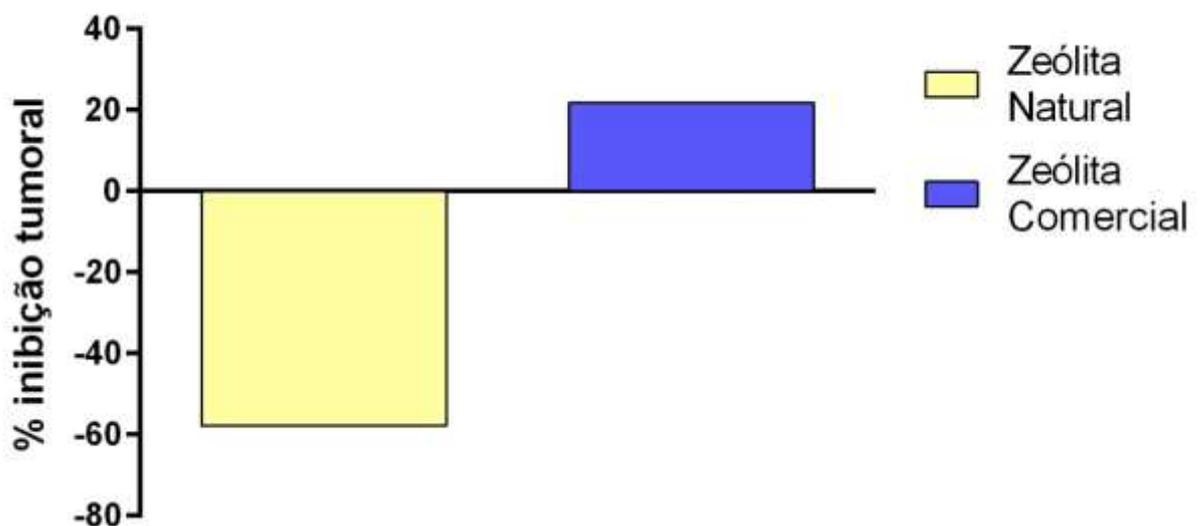


**Figura 11:** Avaliação da produção de NO (óxido nítrico) a partir de macrófagos peritoneais, após aderência, de camundongos Swiss. As células foram cultivadas na presença da zeólita natural e zeólita comercial na concentração de 0,5 mg/mL, LPS na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  como controle positivo e o meio RPMI como controle negativo. A avaliação foi realizada em duplicata com cinco animais e esses resultados apresentam valores de experimentos independentes. As concentrações de nitrito foram obtidas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de  $\text{NaNO}_2$  e os resultados expressos em  $\mu\text{mols}$  de nitrito/ $5 \times 10^5$  células, como média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.5 Inibição Tumoral

Observou-se que apenas a zeólita comercial apresentou inibição tumoral frente ao tumor de Ehrlich. Porém nem todos os tumores apresentaram o mesmo tamanho no início do tratamento, essas diferenças acarretaram em diferentes tamanhos após o tratamento ocasionando possivelmente uma maior ou menor inibição de um grupo.

Sendo assim, esse resultado deve ser interpretado com muito cuidado, devido à dificuldade em padronizar o tamanho dos tumores antes do início do tratamento. Outros estudos devem ser feitos no futuro para confirmar estes resultados, principalmente porque os resultados do efeito antitumoral *in vitro* mostraram o contrário, ou seja, um maior efeito antitumoral da zeólita natural.



**Figura 12:** Avaliação da inibição tumoral do Tumor de Ehrlich após a eutanásia de camundongos Swiss tratados com zeólita natural e comercial, por gavagem, 50mg/animal/duas vezes ao dia, em um período de 15 dias. A análise foi realizada através da comparação entre a média dos volumes dos tumores dos animais do grupo de estudo e a média dos volumes dos tumores dos animais do grupo controle. Os resultados foram expressos em percentual (%) como média.

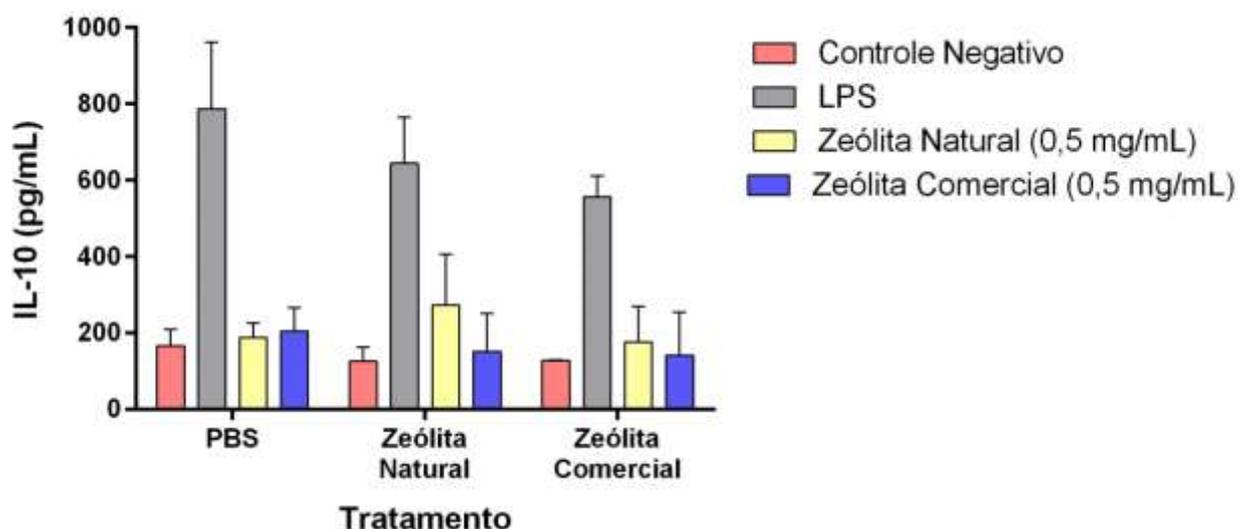
## 4.6 Quantificação de Citocinas

### 4.6.1 Quantificação de IL-10

Com a quantificação da IL-10 pode-se observar que não houve diferença significativa na liberação da mesma entre os grupos.

Essa citocina também apresentou baixa liberação na presença de todos os compostos nos diferentes tratamentos dos grupos.

Segundo ABDIN (2014), apesar da complexidade na atividade da IL-10, é observada a correlação negativa entre a progressão tumoral e seus níveis em tecidos tumorais, indicando no seu estudo que o aumento de IL-10 pelo propranolol é um dos mecanismos de melhoria na progressão do câncer de mama. E os efeitos favoráveis da IL-10 contra o câncer incluem supressão da angiogênese - diretamente sobre as células tumorais ou indiretamente aumentando a imunidade antitumoral com a infiltração de células imunes - e modulação da apoptose (ABDIN et al., 2014).



**Figura 13:** Quantificação de IL-10 liberada no sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais, após a aderência, de camundongos Swiss. As células foram cultivadas na presença da zeólita natural (0,5 mg/mL), zeólita comercial (0,5 mg/mL), LPS e apenas com meio de cultura RPMI-C (controle negativo). As concentrações de IL-10 foram determinadas através de teste ELISA com o kit BD

OptEIA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Os resultados foram expressos em pg/mL, a análise estatística foi feita por intermédio do teste 2way ANOVA do programa GraphPad Prism como média  $\pm$  desvio padrão.

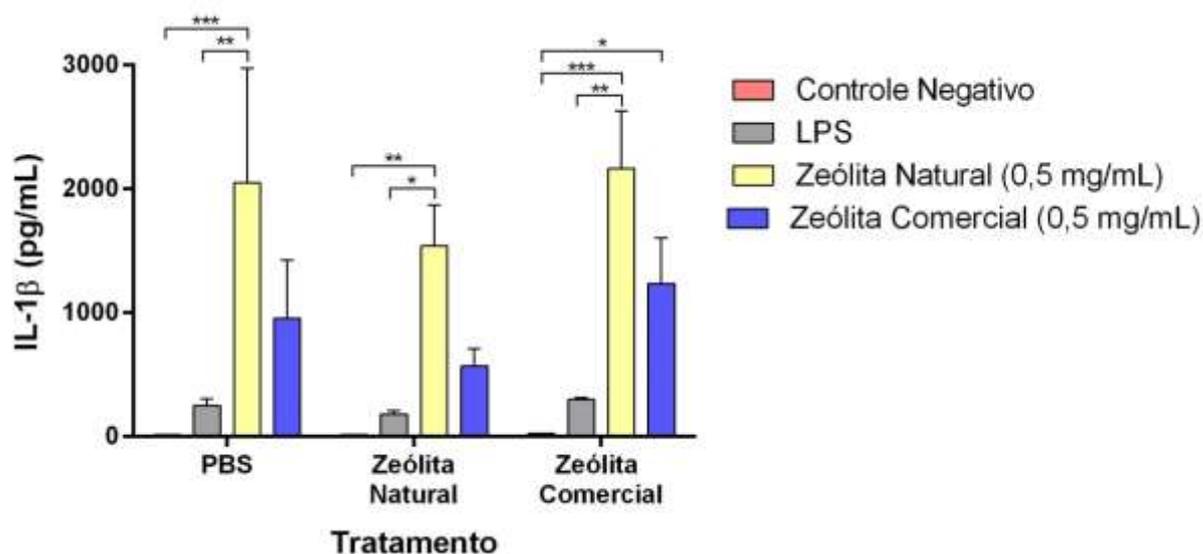
#### **4.6.2 Quantificação de IL-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  é uma das formas moleculares de IL-1, produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados, principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas, e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória (COSTA et al., 2008).

De acordo com ROY (2006), alguns estudos têm mostrado efeito estimulador da IL-1 $\beta$  no crescimento de células tumorais, enquanto outros mostraram uma atividade inibidora.

Assim como na quantificação da IL-10, pode-se observar que não houve diferença significativa na liberação de IL-1 $\beta$  entre os grupos. Porém é possível notar diferenças significativas na reestimulação dos compostos dentre de um mesmo grupo de tratamento.

O composto de zeólita natural, quando reestimulado, apresentou maior liberação de IL-1 $\beta$  comparado com os outros compostos em todos os grupos de tratamento. As duas zeólitas, tanto a natural como a comercial, apresentaram maior liberação que o composto de controle positivo (LPS).



**Figura 14:** Quantificação de IL-1 $\beta$  liberada no sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais, após a aderência, de camundongos Swiss. As células foram cultivadas na presença da zeólita natural (0,5 mg/mL), zeólita comercial (0,5 mg/mL), LPS e apenas com meio de cultura RPMI-C (controle negativo). As concentrações de IL-1 $\beta$  foram determinadas através de teste ELISA com o kit BD OptEIA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Os resultados foram expressos em pg/mL, a análise estatística foi feita por intermédio do teste 2way ANOVA do programa GraphPad Prism, como média  $\pm$  desvio padrão (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001)

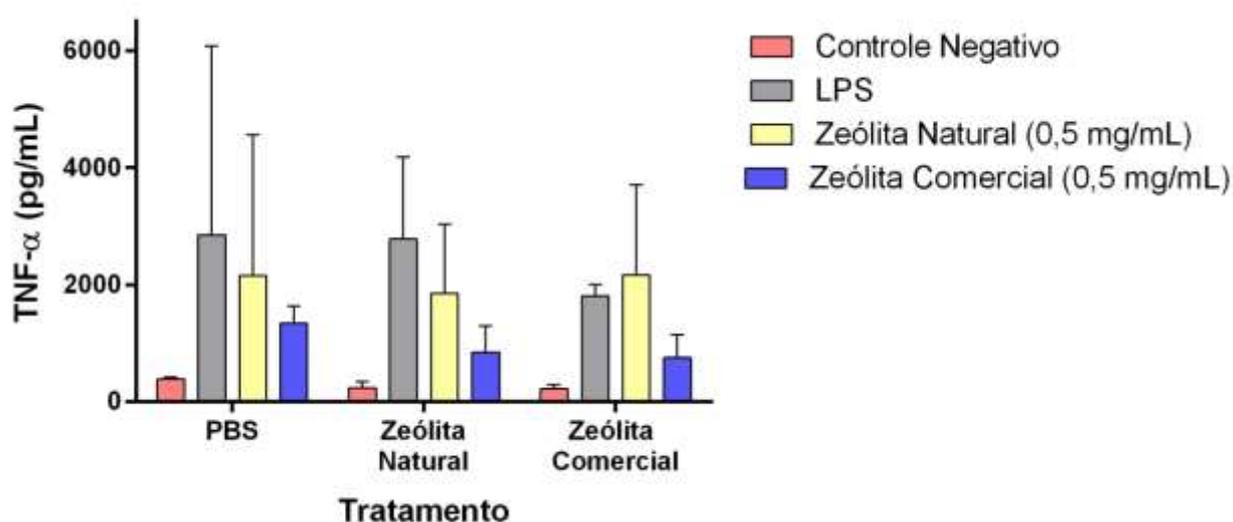
#### 4.6.3 Quantificação de TNF- $\alpha$

Também é possível observar que não houve diferença significativa na liberação de TNF- $\alpha$  entre os grupos, assim como as outras citocinas.

Na quantificação dessa citocina, podemos observar que o composto de zeólita natural, quando reestimulado, em todos os grupos de tratamento, apresentou maior média de liberação em relação aos outros compostos, apesar da análise estatística não constar significância.

Muitas células cancerosas secretam constitutivamente quantidades picogramas de TNF e isso parece estimular o crescimento do tumor (BALKWILL, 2009).

Segundo KATANOV (2015), TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram minimamente expressas por células epiteliais de mama normais, mas altamente expressas em biópsias de células tumorais da maioria dos pacientes com câncer da mama. Em tais indivíduos, a expressão elevada dessas citocinas foi significativamente correlacionada com recaídas e doença avançada.



**Figura 15:** Quantificação de TNF- $\alpha$  liberada no sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais, após a aderência, de camundongos Swiss. As células foram cultivadas na presença da zeólita natural (0,5 mg/mL), zeólita comercial (0,5 mg/mL), LPS e apenas com meio de cultura RPMI-C (controle negativo). As concentrações de TNF- $\alpha$  foram determinadas através de teste ELISA com o kit BD OptEIA e calculadas utilizando uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas. Os resultados foram expressos em pg/mL, a análise estatística foi feita por intermédio do teste 2way ANOVA do programa GraphPad Prism, como média  $\pm$  desvio padrão

Com esse trabalho foi possível observar que a zeólita natural apresentou toxicidade *in vitro*, contra as células tumorais – observada em duas concentrações do teste MTT – mas não foi observada toxicidade em células normais (macrófagos peritoneais). Porém, no estudo *in vivo* aconteceu o contrario, visto que após a eutanásia dos animais tratados com a zeólita natural, estes apresentaram o peritônio altamente vascularizado e com pontos hemorrágicos (Figura 16). Essa atividade pode ser correlacionada com uma possível angiogênese, atribuída à

atividades migratórias estimuladas por citocinas inflamatórias e potencializadas pelo TNF- $\alpha$ , que apresentou maior liberação quando reestimuladas com zeólita natural no teste ELISA.

A possível angiogênese observada nos animais tratados com a zeólita natural pode ter proporcionado uma alta vascularização que ocasionou em um aumento da nutrição ao tumor estimulando o crescimento tumoral (valores negativos de inibição tumoral). Este efeito poderia ser explicado pelas doses utilizadas de zeólita natural, o qual deve ser analisado em futuros estudos.



**Figura 16:** Peritônio de animal tratado com zeólita natural apresentando alta vascularização.

Os resultados deste trabalho mostraram que a zeólita comercial foi a substância que mostrou melhor efeito *in vivo*, apresentando uma inibição tumoral ao Tumor de Ehrlich nos grupos de estudo. No entanto, estudos adicionais sobre a citotoxicidade das zeólitas e experimentos que possibilitem uma padronização do tumor inoculado são necessários para afirmar esses resultados e atribuir a atividade antitumoral das zeólitas nesse modelo.

## 5. CONCLUSÃO

Através da caracterização da zeólita natural, determinou-se que segundo os parâmetros físico-químicos avaliados, corresponde com micropartículas de clinoptilolita carente de fibras sendo o tamanho adequado para nossos estudos.

Nos estudos *in vitro*, as zeólitas não exibiram citotoxicidade em macrófagos peritoneais, conservando a sua viabilidade celular.

A zeólita natural apresentou citotoxicidade em células do tumor de Ehrlich em duas concentrações, enquanto que a zeólita comercial não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas.

Não foram detectados efeitos imunomoduladores relevantes induzidos pelas zeólitas nos macrófagos peritoneais, exceto na liberação de IL-1 $\beta$ , onde os grupos tratados com zeólitas, principalmente a zeólita natural, estimularam maior liberação da citocina.

Nos estudos *in vivo*, foi possível observar que apenas a zeólita comercial apresentou efeito antitumoral frente ao Tumor de Ehrlich com a inibição do seu crescimento. Em tanto a zeólita natural mostrou menos efeito antitumoral, assim como sinais de toxicidade no peritônio dos animais tratados.

Portanto, a utilização da zeólita na terapia antitumoral é uma possibilidade de terapia alternativa para o câncer de mama, porém ainda são necessários outros estudos para melhor elucidar o mecanismo de ação dessas zeólitas e o efeito da zeólita natural *in vivo*.

## 6. REFERÊNCIAS

ABDIN, A.; SOLIMAN, N.; SAIED, E. Effect of propranolol on IL-10, visfatin, Hsp70, iNOS, TLR2, and survivin in amelioration of tumor progression and survival in Solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice. **Pharmacological Reports**, v.66, p.1114-1121, 2014.

AGUIAR, M.; NOVAES A.; GUARINO A. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1145-1154, 2002.

ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, C.; BRUSINT, B.; VICH, P.; DÍAZ-GARCÍA, N.; CUADRADO-ROUCO, C.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Update of breast cancer in primary care (IV/V). **Semergen**, v.41, n.1, p.34-47, 2015.

AZEVEDO M.; PALOS M.; OSUGUI L.; LAURINDO M.; MASUTANI D.; NONOGAKI S.; BACHI A.; MELO F.; MARIANO M. B-1 cells and concomitant immunity in Ehrlich tumour progression. **Immunobiology**, v.2014 p.1-3, 2014.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.5, p.361-371, 2009.

BARUCH, A. The Tumor-Promoting Flow of Cells Into, Within and Out of the Tumor Site: Regulation by the Inflammatory Axis of TNF $\alpha$  and Chemokines. **Cancer Microenvironment**, v.2, p.151-164, 2012.

BOGDAN, C. The multiplex function of nitric oxide in (Auto) immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v.187, n.9, p.1361-1365, 1998.

BURROWS, F.; HASKARD, D.; HART, I.; MARSHALL, J.; SELKIRK, S.; POOLE, S.; THORPE, P. Influence of tumor derived interleukin 1 on melanoma-endothelial cell interactions in vitro. **Cancer Research**, v.51, p.4768-4775, 1991.

CARBONE, M.; YANG, H. Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma. **Clinical Cancer Research**, v.18, n.3, p.598-604, 2012.

COSTA, R.; MENDONÇA, V.; LYON, S.; PENIDO, R.; COSTA, A.; COSTA, M.; NISHI, M.; TEIXEIRA, M.; TEIXEIRA, A.; ANTUNES, C. Evaluation of the expression of interleukin1 beta (IL-1 $\beta$ ) and interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) in leprosy patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.99-103, 2008.

DANA, J.D. Manual de Mineralogia (Dana-Hurlbut). São Paulo. **Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.**, p.642, 1981.

DINARELLO, C. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v.87, n.6, p.2095-2147, 1996.

DINARELLO, C.; SAVAGE, N. Interleukin-1 and its receptor. **Critical Reviews in Immunology**, v.9, p.1-20, 1989.

DRIESSCHE K.; PERSSON A.; MARAIS B.; FINK P.; URDAH K. Immune Vulnerability of Infants to Tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v.2013 p.4-6, 2013.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v.14, p.125-132, 1990.

FELDMANN, M.; MAINI, R. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Nature Medicine**, v.9, p.1245-1250, 2003.

FERLAY, J.; SHIN, H.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN D.

Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. **International Journal of Cancer**, v.127, p.2893-2917, 2010.

GALLI, S.; LABATO, M.; JOFFÉ, E.; CARRERAS, M.; PODEROSO, J. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behaviour. **Cancer Research**, v.63, p.6370-6377, 2003.

GARRIDO, M.; GUTIERREZ, C.; RIVEIRO-FALKENBACH, E.; ORTIZ, P.; RODRIGUEZ-PERALTO, J. **The American Journal of Dermatopathology**, v.37, n.10, p.795-798, 2015.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p.131-138, 1982.

HAMIDULLAH; CHANGKIJA B.; KONWAR R. Role of interleukin-10 in breast cancer. **Springer Science**, v.133, n.1, p.11-21, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, p.646-674, 2011.

HAY, R.; SHEPPARD, R. Occurrence of zeolites in sedimentary rocks: an overview. In: D.L. BISH; D.W. MING (ed.). **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v.45, p.217-234, 2001.

HU, S.; MITCHO, Y.; RATH, N. Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. **International Journal of Immunopharmacology**, v.10, n.3, p.247-252, 1988.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Incidência de Câncer no Brasil.

Disponível em: <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acessado em: 27 de setembro de 2015.

INSTITUTO ONCOGUIA. Tratamentos para câncer de mama. Disponível em: <[www.oncoguia.org.br](http://www.oncoguia.org.br)>. Acessado em: 21 de dezembro de 2015.

JACONODINO, C.; AMESTOY, S.; THOFEHRN, M. Alternative therapies for patients undergoing chemotherapy. **Cogitare Enferm**, v.13, n.1, p.61-66, 2008.

JIN, L.; YUAN, R.; FUCHS, A.; YAO, Y.; JOSEPH, A.; SCHWALL, R.; SCHNITT, S.; GUIDA, A.; HASTINGS, H.; ANDRES, J.; TURKEL, G.; POLVERINI, P.; GOLDBERG, I.; ROSEN, E. Expression of interleukin-1beta in human breast carcinoma. **Cancer**, v.80, n.3, p.421-434, 1997.

JUNG B.; TOAN N.; CHO S.; KO J.; JUNG Y.; LEE B. Dietary aluminosilicate supplement enhances immune activity in mice and reinforces clearance of porcine circovirus type 2 in experimentally infected pigs. **Veterinary Microbiology**, v.143 p.117-118, 2010.

JURKIC, L.; CEPANEC, I.; PAVELIC, S.; PAVELIC, K. Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: New perspectives for therapy. *Nutrition & Metabolism*, v.10, v.2, 2013.

KARIN, M.; GRETEN, F. NF- $\kappa$ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v.5, p.749-759, 2005.

KARIN, M.; LAWRENCE, T.; NIZET, V. Innate Immunity Gone Awry: Linking Microbial Infections to Chronic Inflammation and Cancer. **Cell**, v.124, p.823-835, 2006.

KATANOV, C.; LERRER, S.; LIUBOMIRSKI, Y.; LEIDER, L.; MESHEL, T.; BAR, J.; BARISH, R.; KAMER, I.; ARTZI, G.; KAHANI, H.; BANERJEE, D.; BARUCH, A. Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF- $\alpha$  and the NF- $\kappa$ B pathway. **Stem Cell Research & Therapy**, v.6, n.1, p.87, 2015.

KATIC, M.; BOSNJAK, B.; GALL-TROSELJ, K.; DIKIC, I.; PAVELIC, K. A clinoptilolite effect on cell media and the consequent effects on tumor cells in vitro. **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.1722-1732, 2006.

KATIC, M.; BOSNJAK, B.; GALL-TROSELJ, K.; DIKIC, I.; PAVELIC, K. A clinoptilolite effect on cell media and the consequent effects on tumor cells in vitro. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p.1722-1732, 2006.

KIM, E.; CAI, W.; BAIK, H.; CHOI, J. Uniform Si-CHA Zeolite Layers formed by a Selective Sonication-Assisted Deposition Method. **Angewandte Chemie International**, v. 52, p. 1-6, 2013.

LIU, X.; ALLI, R.; STEEVES, M.; NGUYEN, P.; VOGEL, P.; GEIGER, T. The T cell response to interleukin 10 alters cellular dynamics and paradoxically promotes CNS autoimmunity. **Journal of Immunology**, v.189, n.2, p.669–678, 2012.

LOPES, F.; PLACERES, M.; MOREIRA, R.; SANTOS, L; CARLOS, I. Avaliação da atividade imunológica de *Achillea millefolium* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.11-13, 2003.

LUZ, A. Zeólitas: propriedades e usos industriais. Rio de Janeiro. **CETEM/CNPq**, p.36, 1995.

LYMAN, G.H.; DALE, D.C.; TOMITA, D.; WHITTAKER, S.; CRAWFORD, J.A retrospective evaluation of chemotherapy dose intensity and supportive care for early-stage breast cancer in a curative setting. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.139, n.3, p.863-72, 2013.

MADERA, L.; GREENSHIELDS, A.; COOMBS, M.; HOSKIN, D. 4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells Enhance Macrophage-Mediated Innate Inflammatory Responses. **PLoS One**, v.10, 2015.

MAROOF, H.; HASSAN, Z.M.; MOBAREZ, A.M.; MOHAMADABADI, M.A. Lactobacillus acidophilus Could Modulate the Immune Response Against Breast Cancer in Murine Model. **Journal of Clinical Immunology**, v.32, p.1353–1359, 2012.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v.140, p.771-776, 2010.

MILLER, L.; KURTZMAN, S.; ANDERSON, K.; WANG, Y.; STANKUS, M.; RENNA, M.; LINDQUIST, R.; BARROWS, G.; KREUTZER, D. Interleukin-1 family expression in human breast cancer: interleukin-1 receptor antagonist. **Cancer Investigation**, v.18, n.4, p.293-302, 2000.

MING, D.; DIXON, J. Quantitative determination of clinoptilolite in soils by a cation-exchange capacity method. **Claysand Clay Minerals**, v.35, p.463-468, 1987.

MIRANDA-VILELA, A.L.; PORTILHO, F.A.; ARAUJO, V.G.B.; ESTEVANATO, L.L.C.; MEZZOMO, B.P.; SANTOS, M.F.M.A.; LACAVA, Z.G.M. The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor-bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p.1091–1098, 2011.

MONTFORT, A. et al. FAN Stimulates TNF -Induced Gene Expression, Leukocyte Recruitment, and Humoral Response. **The Journal of Immunology**, v.183, p.5369-5378, 2009.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

NAUNDORF, S.; SCHRÖDER, M.; HÖFLICH, C.; SUMAN, N.; VOLK, H.; GRÜTZ, G. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN- $\gamma$  but not IL-17 production in memory T cells. **European Journal of Immunology**, v.39, n.4, p.1066-1077, 2009.

OSIPOV A.; TERPINSKAYA T.; KRYUKOVA E.; ULASCHIK V.; PAULOVETS L.; PETROVA E.; BLAGUN E.; STARKOV V.; UTKIN Y. Nerve Growth Factor from Cobra Venom Inhibits the Growth of Ehrlich Tumor in Mice. **Toxins**, v.6 p.786, 2014.

PALLADINO, M.; BAHJAT, F.; THEODORAKIS, E.; MOLDAWER, L. Anti TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, p.736-746, 2003.

PANTSCHENKO, A.; PUSHKAR, I.; ANDERSON, K.; WANG, Y.; MILLER, L.; KURTZMAN, S.; BARROWS, G.; KREUTZER, D. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. **International Journal of Oncology**, v.23, n.2, p.269-284, 2003.

PAVELIC K.; HADŽIJA M.; BEDRICA L.; PAVELIC J.; DIKIC I.; KATIC M.; KRALJ M.; BOSNAR M.; KAPITANOVIC S.; POLJAK-BLAŽI M.; KRIŽANAC S.; STOJKOVIC R.; JURIN M.; SUBOTIC B.; COLIC M. Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. **Journal of Molecular Medicine**, v.78 p.708-709, 2001.

PAVELIC, K.; KATIC, M.; SVERKO, V.; MAROTTI, T.; BOSNJAK, B.; BALOG, T.; STOJKOVIC, R.; RADACIC, M.; COLIC, M.; POLJAK-BLAZI, M. Immunostimulatory effect of natural clinoptilolite as a possible mechanism of its antimetastatic ability. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.128, n.1, p.37-44, 2002.

PAVELIC, K.; KATIC, M.; SVERKO, V.; MAROTTI, T.; BOSNJAK, B.; BALOG, T.; STOJKOVIC, R.; RADACIC, M.; COLIC, M.; POLJAK-BLAZI, M. Immunostimulatory effect of natural clinoptilolite as a possible mechanism of its antimetastatic ability. **Clinical Oncology and Cancer Research**, v.128, p.37-44, 2002.

POLLARD, J. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Reviews Immunology**, v.9, p.259–270, 2009.

RAWJI K.; YONG V. The Benefits and Detriments of Macrophages/Microglia in Models of Multiple Sclerosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v.2013 p.2-3, 2013.

REGO, S.; HELMS, R.; DRÉAU, D. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme activities and tumor-associated macrophages in breast cancer. **Immunologic Research**, v.58, n.1, p.87-100, 2014.

REIRIZ, A.B. **Estudo da função cognitiva em camundongos submetidos ao agente quimioterápico ciclofosfamida**. Tese (Doutorado em medicina) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

REZENDE, N. A zona zeolítica da Formação Corda - Bacia do Parnaíba. **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará**, p.141, 2002.

ROY, D.; SARKAR, S.; FELTY, Q. Levels of IL-1 beta control stimulatory/inhibitory growth of cancer cells. **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.889-898, 2006.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. Insulin sensitivity: Modulation by nutrients and inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v.118, p.2992-3002, 2008.

SHINZATO, M.; Remoção de metais pesados em solução por zeólitas naturais: revisão crítica. **Revista do Instituto Geológico**, v.27/28, n.1/2, 2007.

SMYTH M.; CRETNEY E.; KERSHAW M.; HAYAKAWA Y. Cytokines in cancer immunity and Immunotherapy. **Immunological Reviews**, v.202 p.275-281, 2004.

SPANAKIS, M.; BOUROPOULOS, N.; THEODOROPOULOS, D.; SYGELLOU, L.; EWART, S.; MOSCHOVI, A.; SIOKOU, A.; NIOPAS, I.; KACHRIMANIS, K.; NIKOLAKIS, V.; COX, P.; VIZIRIANAKIS, I.; FATOUROS, I. Controlled release of 5-fluorouracil from microporous zeolites. **Nanomedicine**, v.10, n.1, p.197-205, 2014.

VERÇOSA, D.; MELOI, M.; CASSALIII, G.; DANTAS-BARROSIII, A.; SILVA P. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.150-154, 2007.

VILAÇA, N.; AMORIM, R.; MACHADO, A.; PARPOT, P.; PEREIRA, M.; SARDO, M.; ROCHA, J.; FONSECA, A.; NEVES, I.; BALTAZAR, F. Potentiation of 5-fluorouracil encapsulated in zeolites as drug delivery systems for in vitro models of colorectal carcinoma. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.112, p.237-244, 2013.

VISSER K.; EICHTEN A.; COUSSENS L. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature**, v.6, p. 24-26, 2006.

WANG, W.; TAN, M.; YU, J.; TAN, L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. **Annals of Translational Medicine**, v.10, p.136, 2015.

WU, S.; MEEKER, W.; WIENER, J.; BERCHUCK, A.; BAST, R.; BOYER, C. Transfection of ovarian cancer cells with tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) antisense mRNA abolishes the proliferative response to interleukin-1 (IL-1) but not TNF-alpha. **Gynecologic Oncology**, v.56, p.59-63, 1994.

ZARKOVIC, N.; ZARKOVIC, K.; KRALJ, M.; BOROVIC, S.; SABOLOVIC, S.; BLAZI, M.; CIPAK, A.; PAVELIC, K. Anticancer and antioxidative effects of micronized zeolite clinoptilolite. **Anticancer Research**, v.23, p.1589-1596, 2003.

ZHOU, P.; SIEVE, M. C.; BENNETT, J.; KWON-CHUNG, K. J.; TEWARI, R. P.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A.; SEDER, R. A. IL-12 prevents mortality in mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN-gamma. **Journal of Immunology**, v.155, p.785-795, 1995.

ZITO F.; DE BERNARDI E.; SOFFIENTINI C.; CANZI C.; CASATI R.; GERUNDINI P.; BASELLI G. The use of zeolites to generate PET phantoms for the validation of quantification strategies in oncology. **Medical Physics**, v.39 p.5354-5357, 2012.

## **DADOS FINAIS**

---

Gabriela Regina Silva Ferreira

De Acordo:

---

**Orientadora**

Profª Drª Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.