

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

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTITUMORAL DOS
CONSTITUINTES DE *Qualea grandiflora* NO TUMOR DE
EHRlich

Marcela Bassi Quilles

Outubro
2013

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

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTITUMORAL DOS
CONSTITUINTES DE *Qualea grandiflora* NO TUMOR DE EHRLICH

Doutoranda: Marcela Bassi Quilles

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Tese apresentada ao Programa em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (área de Imunologia), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Outubro
2013

Ficha Catalográfica

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

Quilles, Marcela Bassi

R484 Efeitos anti-inflamatórios e antitumorais dos constituintes de *Qualea grandiflora* no tumor De Ehrlich / Marcela Bassi Quiles. – Araraquara, 2013
112 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. Câncer de mama. 2. Angiogênese. 3. *Qualea grandiflora*. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título.

Apresentação

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara com auxílio de bolsa CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Dedicatória

*Sei que de onde estás,
sempre me guiou pelo melhor caminho que julgaste
E hoje estou aqui, mesmo com a distância
e a saudade, esta conquista
é tão sua quanto minha
Obrigada minha estrela, aquela que nunca deixou meu caminho sem luz
Pai sem o seu apoio, nada eu seria **EU AMO VC!***

Agradecimientos

*A **Deus**, que desde o início dessa caminhada, Tu estavas presente.
Vitórias foram conquistadas. Derrotas foram superadas. Amizades foram
criadas. Conhecimentos foram adquiridos.
..e agora que alcancei meu objetivo, venho
lhe agradecer humildemente a vitória desse momento.
Obrigada Senhor !*

*Agradeço a minha mãe, amigos e ao meu marido, que sempre estiveram ao meu lado
Agradeço pelo seu apoio quando mais precisei de paciência, compreensão, atenção e
amor. Esta conquista sem dúvida também é de vocês. Obrigada por tudo!!!*

*A minha Querida orientadora **Iracilda Zeppone Carlos**, pela confiança depositada e
pela paciência dispensada.
Obrigada !*

*Aos colegas de trabalho que fizeram os momentos difíceis mais agradáveis com
palavras de conforto e ânimo, e por toda ajuda para término deste trabalho.*

*A **Marisa Campos Polesi Placeres** por toda a ajuda e amizade.*

*Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa
concedida*

RESUMO

O câncer de mama é uma das maiores causas de morte dentre as mulheres, seguido pelo câncer de colo de útero. Os tratamentos geralmente utilizados são extremamente agressivos e na maioria das vezes causando efeitos deletérios as células do hospedeiro. Os macrófagos são as primeiras células a serem ativadas para participar de uma resposta imunológica propriamente dita, são células capazes de secretar mais de cem produtos biologicamente ativos, entre esses, espécies reativas de nitrogênio e citocinas que atuam no contexto da resposta imunológica e/ou inflamatória. *Qualea grandiflora* Mart (*Q. grandiflora*) da família Vochysiaceae é uma planta do cerrado brasileiro, utilizada na medicina popular no tratamento de úlceras, gastrites, amebíase, diarreia com sangue, cólicas intestinais e inflamações. Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório demonstraram que espécies de *Qualea* sp. apresentou atividade antitumoral *in vitro* extremamente seletiva para tumor de mama murino (linhagem LM3) e ainda apresenta características anti-inflamatórias através da inibição expressiva da produção dos mediadores imunológicos NO, IL-1 e IL-12 pelos macrófagos peritoneais murinos ativados com LPS. A partir destes resultados, propusemos avaliar neste trabalho uma forma alternativa de tratamento contra o câncer de mama experimental empregando-se um extrato bruto (EH), uma fração terpênica (FT) derivada do extrato hexânico de *Q. grandiflora* e a substância isolada β -sitosterol (BS), em modelo experimental de Ehrlich concomitante à avaliação dos efeitos imunológicos das substâncias testadas, no animal. Como droga padrão dos experimentos realizados, utilizou-se o Taxol® (Paclitaxel- TX). Foi determinado *in vitro* a citotoxicidade celular de células do exsudado peritoneal de camundongos e células tumorais de Ehrlich, após incubação com os diferentes tratamentos pela técnica de MTT, análise da angiogênese pela dosagem de VEGF, a ocorrência de apoptose nas células tumorais pelas técnicas de Tunel e Anexina V, assim como, a inibição de óxido nítrico (NO) e das citocinas TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6. Além disso, foi determinado *in vivo* a taxa de inibição tumoral e a análise histológica através de microscopia óptica avaliando células que se encontravam em mitose e a angiogênese pelo sistema de gradação por microscopia MAGS. Os resultados demonstraram que EH, FT, BS e TX apresentaram uma alta viabilidade frente aos macrófagos ($93,58 \pm 5,98$; $75,27 \pm 2,78$; $63,38 \pm 8,90$; $78,76 \pm 7,91\%$ respectivamente) e um excelente efeito citotóxico contra a linhagem tumoral testada ($1,71 \pm 1,38$; $35,56 \pm 3,78$; $54,12 \pm 6,78$; $46,32 \pm 2,36$, respectivamente). Foram assim determinadas as concentrações ideais de tratamento de todas as substâncias e posteriormente avaliada a angiogênese pela dosagem de VEGF nas células tumorais de Ehrlich onde o EH, FT, BS não apresentaram uma produção significativa desta proteína ($5000,3 \pm 8000,39$ pg/mL, $5000,9 \pm 6000,34$ pg/mL, $5000,6 \pm 2,42$ pg/mL, respectivamente) quando comparada com o controle negativo ($2000,8 \pm 5,23$ pg/mL), diferente da droga padrão TX que apresentou uma produção equivalente a $17000,5 \pm 3,25$ pg/mL de VEGF. Na detecção da apoptose houve maior quantidade de células em estágio apoptótico nos animais que receberam o tratamento com EH, quando comparados com o controle PBS e a droga padrão utilizada TX ($73,9 \pm 0,98\%$; $20,0 \pm 1,78\%$; $40,7 \pm 1,98\%$) para anexina V e ($56,2 \pm 1,98\%$; $7,4 \pm 0,74\%$; $28,3 \pm 0,74\%$) para técnica do TUNEL, respectivamente. Foi possível observar ainda, em relação a atividade imunomoduladora das substâncias testadas, que estas apresentaram atividade inibitória sobre os macrófagos, importante assim, para a contenção tumoral, através da inibição expressiva da produção de NO e das citocinas TNF- α , IL-1, IL-12 quando comparados com o controle positivo (LPS) e a droga padrão TX. Nos testes *in vivo*, os resultados mostraram expressiva inibição do volume tumoral quando os animais foram tratados, variando de 91,44 (EH) a 61,3 (TX).

% de inibição. A análise histológica tumoral demonstrou elevado pleomorfismo celular, estroma escasso, infiltrado composto predominantemente por células mononucleares além de numerosas figuras mitóticas em diversas regiões. Quanto às análises sobre a presença do número de mitoses por campo, houve significativa inibição das mitoses com os tratamentos realizados se comparado com o controle PBS. Por fim a determinação da angiogênese nos tumores mostrou que não houve diferença estatística entre a droga padrão TX e os tratamentos com os derivados de *Q. grandiflora*, no entanto os tumores tratados com o controle PBS apresentaram grande aumento de proliferação de vasos se comparado às substâncias testadas. Baseados nesses resultados foi possível verificar uma importante atividade anti-inflamatória e antitumoral do uso dos constituintes de *Q. grandiflora* frente a droga padrão padrão TX, principalmente o EH.

Palavras chave: *Qualea grandiflora*, câncer de mama, apoptose, angiogênese.

ABSTRACT

Breast cancer is a leading cause of death among women, followed by cervix cancer. The treatments normally used are highly aggressive, and most often causing deleterious effects on host cells. Macrophages are the first cells to be activated to participate in an immune response itself, cells are able to secrete more than hundred biologically active products, among these, reactive nitrogen species and cytokines that act in the context of immune and / or inflammatory. *Qualea grandiflora* Mart (*Q. grandiflora*) family Vochysiaceae is a plant of the Brazilian Cerrado, used in folk medicine in the treatment of ulcers, gastritis, amebiasis, bloody diarrhea, intestinal cramps and inflammation. Previous studies in our laboratory have shown that species *Qualea sp.* showed *in vitro* antitumor activity extremely selective murine breast tumor (line LM3) and also has anti-inflammatory characteristics by the significant inhibition of the production of immune mediators NO, IL-1 and IL-12 by murine peritoneal macrophages activated with LPS. From these results, we propose to evaluate this work an alternative form of treatment for breast cancer by employing a crude extract (EH), a fraction terpene (FT) derived from the hexane extract of *Q. grandiflora* and substance isolated β -sitosterol (BS) in an experimental model of Ehrlich concomitant evaluation of the immunological effects of the tested substances in the animal. As standard drug of experiments, we used Taxol® (Paclitaxel-TX). It has been determined *in vitro* cytotoxicity of peritoneal exudate cells of mice and Ehrlich tumor cells after incubation with the different treatments using the technique of MTT analysis of VEGF angiogenesis by measuring the occurrence apoptosis in tumor cells by techniques Tunel and annexin V as well as the inhibition of nitric oxide (NO) and TNF- α , IL-1, IL-12 and IL-6. In addition, it was determined the rate of *in vivo* tumor inhibition and histological analysis by light microscopy assessing cells that were arrested in mitosis and angiogenesis by microscopic grading system MAGS. The results showed that EH, FT, BS and TX showed a high viability against macrophages (93.58 ± 5.98 , 75.27 ± 2.78 , 63.38 ± 8.90 , 78.76 ± 7.91 respectively) and an excellent cytotoxic effect against tumor cell line tested (1.71 ± 1.38 , 35.56 ± 3.78 , 54.12 ± 6.78 , 46.32 ± 2.36 , respectively). There were thus determined optimum concentrations of all substances treatment and then held angiogenesis by VEGF dose of the Ehrlich tumor cells where the EH FT BS showed no significant production of this protein (5000.3 ± 8.39 pg / mL, 5000.9 ± 6.34 pg / mL 5000.6 ± 2000.42 pg / mL, respectively) when compared to the negative control (2000.8 ± 5.23 pg / mL) than the standard drug TX who presented a production equivalent to 17000.5 ± 3.25 pg / mL VEGF. In the detection of apoptosis was greater amount of stage apoptotic cells in animals that received treatment with EH compared to the PBS control and the standard drugs used TX ($73.9\% \pm 0.98$, $20.0 \pm 1.78\%$, $40.7 \pm 1.98\%$) annexin V and ($56.2\% \pm 1.98$, $7.4 \pm 0.74\%$, $28.3 \pm 0.74\%$) for the TUNEL technique, respectively. It was observed also in relation to the immunomodulatory activity of the tested substances showed that these inhibitory activity on macrophages, which is important therefore to contain tumor by significant inhibition of NO production and cytokine TNF- α , IL-1, IL-12 when compared to positive control (LPS) and the drug default TX. In *in vivo* tests, the results showed a significant inhibition of tumor volume when the animals were treated with varying 91.44 (EH) to 61.3 (TX) % inhibition. Histological analysis demonstrated high tumor cell pleomorphism, scant stroma, infiltrate composed predominantly mononuclear cells and numerous mitotic figures in various regions. As for the analysis on the presence of the number of mitoses per field, this showed significant inhibition of mitosis with treatments performed compared with the PBS

control. Finally the determination of angiogenesis in tumors showed no statistical difference between the TX and the standard drug treatments derivatives of *Q. grandiflora*, however the tumors treated with PBS control showed a large increase in vessel proliferation compared to the tested substances. Based on these results we observed a significant anti-inflammatory activity and the use of antitumor constituents of *Q. grandiflora* against standard drug TX standard, especially the EH.

Keywords: *Qualea grandiflora*, breast cancer, apoptosis, angiogenesis.

Índices

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore de <i>Qualea grandiflora</i>	40
Figura 2: Viabilidade de macrófagos e células tumorais de Ehrlich frente ao extrato hexânico (EH).....	53
Figura 3: Viabilidade de macrófagos e células tumorais de Ehrlich frente a fração terpênica (FT).....	54
Figura 4: Viabilidade de macrófagos e células tumorais de Ehrlich frente ao β -sitosterol (BS).....	56
Figura 5: Viabilidade de macrófagos e células tumorais de Ehrlich frente ao taxol (TX).....	58
Figura 6: Produção de fator de crescimento vascular endotelial nas células tumorais de Ehrlich expostos as substâncias.....	60
Figura 7: Porcentagem de células em apoptose no tumor de Ehrlich pelo teste de ANEXINA V.....	62
Figura 8: Porcentagem de células em apoptose no tumor de Ehrlich pelo teste de ANEXINA V.....	63
Figura 9: Porcentagem de células em apoptose no tumor de Ehrlich pelo teste de TUNEL.....	64
Figura 10: Porcentagem de células em apoptose no tumor de Ehrlich pelo teste de TUNEL.....	65
Figura 11: Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos as substâncias.....	66
Figura 12: Inibição da produção de TNF- α em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos as substâncias.....	67
Figura 13: Inibição da produção de IL-1 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos as substâncias.....	68
Figura 14: Inibição da produção de IL-12 em macrófagos peritoneais estimulados	

com LPS e expostos as substâncias.....	69
Figura 15: Inibição da produção de IL-6 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos as substâncias.....	71
Figura 16: Inibição do crescimento tumoral de Ehrlich após os diferentes tratamentos.....	72
Figura 17: Análise Macroscópica do tumor de Ehrlich.....	73
Figura 18: Microscopia do tumor de Ehrlich.....	74
Figura 19: Análise microscópica do tumor de Ehrlich.....	75
Figura 20: Quantidade de células em mitose nos tumores após os diferentes tratamentos.....	77
Figura 21: Grau de angiogênese tumoral dos tumores após os diferentes tratamentos.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de EH.....	55
Tabela 2. Viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de FT.....	54
Tabela 3. Viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de BS.....	56
Tabela 4. Viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de TX.....	58
Tabela 5. Produção de VEGF nas células tumoral de Ehrlich.....	40
Tabela 6. Produção de NO em macrófagos peritoneais ativados com LPS.....	66
Tabela 7. Produção de citocinas em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos ao EH, FT, BS e TX, concentrações expressa em pg/mL	71
Tabela 8. Parâmetros tumorais após tratamento.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µmols	Micromols
ANOVA	Análise de variância
BS	B-sitosterol
BSA	Bovine serum albumin
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EH	Extrato Hexânico
FT	Fração Terpênica
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
iNOS/NOS2	Óxido nítrico sintetase induzível
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
KeE	Hiperplasia de células endoteliais
KnN	Vasoproliferação

KxX	Citologia endotelial
LPS	Lipopolissacarídeo
MAGS	Sistema de gradação para angiogênese por microscopia
mL	Mililitros
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MDA-MB-23	Human breast carcinoma cells
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
NCTC-132	Natioml Collection of Type Cultures
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NHCO ₃	Bicarbonato de sódio
ng/mL	Nanogramas por mililitro
NK	Natural killer
Nm	Nanometro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
pH	Potencial hidrogeniônico
PMA	Acetato de forbol miristato
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura – série 1640)
ROI	Intermediários reativos do oxigênio
T47D	Human ductal breast epithelial tumor cell line
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
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase
UV	Ultravioleta
VEGF	Vascular endothelial growth factor

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Câncer de mama.....	25
1.2 Tumor de Ehrlich.....	26
1.3 Imunologia Tumoral.....	27
1.4 <i>Qualea grandiflora</i>	32
2. OBJETIVO.....	36
2.1 Gerais.....	36
2.2 Específicos.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Delineamento experimental.....	37
3.2 Obtenção do extrato bruto e fração terpênica de <i>Qualea grandiflora</i>	38
3.3 Obtenção das Soluções a serem utilizadas nos Ensaios Biológicos.....	38
3.4 Animais.....	38
3.5 Obtenção de macrófagos do exsudato peritoneal.....	39
3.6 Linhagem celular tumoral utilizada e manutenção do tumor de Ehrlich <i>in vivo</i> ..	40
3.7 Inoculação das células tumorais para formação do tumor sólido.....	40
3.8 Obtenção das células tumorais de Ehrlich para os ensaios <i>in vitro</i>	41
3.9 Avaliação da citotoxicidade em cultura de macrófagos.....	41
3.10 Avaliação da citotoxicidade em linhagem tumoral de Ehrlich.....	42
3.11 Análise da angiogênese pela dosagem de VEGF por Teste Imunoenzimático (ELISA).....	43
3.12 Determinação da ocorrência de apoptose em células tumorais por TUNEL.....	43
3.13 Determinação da ocorrência de apoptose em células tumorais por Anexina V...	44
3.14 Determinação de Óxido Nítrico (NO).....	45
3.15 Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	46
3.16 Determinação das citocinas TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6.....	47
3.17 Protocolo Terapêutico.....	48
3.18 Grupos de Estudo.....	49
3.19 Avaliação do volume e inibição tumoral.....	49
3.20 Análise Histopatológica dos Tumores.....	50
3.21 Determinação da presença de mitoses.....	50
3.22 Análise da angiogênese pelo Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia (MAGS).....	50
3.23 Análise dos Resultados.....	51
4. RESULTADOS.....	52
4.1 Avaliação da citotoxicidade de macrófagos peritoneais e células tumorais de	

Ehrlich pela técnica de MTT (MOSSMAN, 1983).....	52
4.2 Determinação da produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).....	59
4.3 Quantidade de células apoptóticas nos tumores ANEXINA V e TUNEL.....	61
4.4 Determinação da inibição de óxido nítrico (NO).....	65
4.5 Determinação da inibição de TNF- α	67
4.6 Determinação da inibição de IL-1.....	68
4.7 Determinação da inibição de IL-12.....	69
4.8 Determinação da inibição de IL-6.....	70
4.9 Determinação do volume tumoral.....	72
4.10 Análise macroscópica e microscópica do tumor.....	72
4.11 Determinação de mitoses nos tumores.....	75
4.12 Determinação do grau de angiogênese nos tumores.....	76
5. DISCUSSÃO.....	78
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS.....	91

CAPÍTULO 2

ARTIGO

Capítulo 01

1. INTRODUÇÃO

Uma das maiores causas de morte por câncer se deve ao câncer de mama, mais comum do que o câncer de colo e de útero é relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. Estatísticas indicam aumento de sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 52.680 novos casos de câncer de mama foram estimados para 2012 valendo para 2013, com um risco de 52 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2013).

Diversos modelos experimentais, utilizando linhagens de células tumorais humanas ou murinas, têm sido usados na pesquisa de novos medicamentos para o tratamento dos mais diversos tipos de cânceres, dentre eles o tumor de Ehrlich. (DAWE, 1982; MEI et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; SARASWATI et al., 2013).

Nos tratamentos geralmente utilizados incluem a cirurgia, radioterapia e a quimioterapia que são extremamente agressivas podendo até mesmo provocar efeitos deletérios às células do sistema imunológico essenciais ao desenvolvimento de uma resposta imune efetiva (MALIK et al., 2009; FRAZIER et al., 2010). Desta maneira, existe um interesse crescente na descoberta de novos medicamentos destinados ao combate seletivo às células tumorais associados à atividade imunomodulatória (ISRAILIDES et al., 2008; DOUKAS, et al., 2012; CARLI et al., 2013; QUILLES et al., 2013).

Dados recentes expandiram o conceito de que a inflamação é um componente crítico na progressão de tumores, sendo o microambiente tumoral, contendo células tumorais, estromais e leucócitos da linhagem mielóide e linfóide, um participante indispensável no processo neoplásico (DENARDO & COUSSENS, 2007). Nesse

contexto, a resposta imunológica é de fundamental importância no desenvolvimento e/ou erradicação de tumores.

Sendo o grande alvo deste estudo, *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae), popularmente conhecida como pau-terra, pau-terra-do-campo ou ariauá segundo Lorenzi (2002) é uma árvore do cerrado brasileiro de aproximadamente 12 metros de altura, com caule de até 40 cm de diâmetro.

Estudos realizados em nosso laboratório, financiados pelo temático Biotafapesp, através de triagem *in vitro* da atividade farmacológica do extrato clorofórmico de *Qualea* sp. mostraram que a planta apresenta características anti-inflamatórias através da inibição expressiva da produção dos mediadores imunológicos NO, IL-1 e IL-12 pelos macrófagos peritoneais murinos ativados com LPS e apresenta potencial tóxico às células tumorais (CARLI et al., 2013).

A partir destes resultados, pretendemos dar continuidade ao estudo, através de ensaios *in vivo*, utilizando modelo experimental de câncer de mama murino, tumor de Ehrlich (FECCHIO et al., 1990, ROCHA et al., 2007; QUILLES et al., 2013), administrando intratumoralmente extrato hexânico de *Q. grandiflora* (EH), fração terpênica (FT), β -sitosterol (BS) e a droga padrão Taxol (Paclitaxel- TX).

1.1 Câncer de mama

De acordo com o a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que, no ano 2030 ocorrerá 27 milhões de novos casos de câncer, sendo 17 milhões de mortes. No Brasil, as estimativas para os anos de 2012 e 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, sendo um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma (134.000 casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60.000), mama feminina (53.000), cólon e reto (30.000), pulmão (27.000), estômago (20.000) e colo do útero (18.000) (INCA, 2013).

O câncer de mama, relativamente raro antes dos 35 anos de idade, podem levar alterações na autoimagem, perda funcional, mudanças de nível psíquico, emocional e social nas mulheres acometidas por este (MAKLUF et al., 2006). A doença muitas vezes proporciona uma perda de papéis relacionada ao trabalho, à família e à sexualidade (REDIVO et al., 2008).

O câncer é caracterizado por um acúmulo de alterações genéticas, conferindo à célula a propriedade de evasão dos mecanismos de controle homeostáticos, garantindo sua própria sobrevivência e proliferação (HAHN & WEINBERG, 2002; LEROI et al., 2003). Para o seu surgimento se faz necessário que ocorra todo um processo composto de várias etapas, denominado carcinogênese. O processo de carcinogênese pode ser dividido em quatro fases: iniciação, promoção, manutenção e progressão (FARBER, 1984; CHAMMAS, 2005).

O tratamento primário do câncer de mama é a mastectomia, intervenção cirúrgica que pode ser restrita ao tumor, atingir tecidos circundantes ou até a retirada da mama, dos linfonodos da região axilar e de ambos os músculos peitorais. Tratamentos

complementares geralmente são necessários, como a radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia o que aumenta a possibilidade de cura, e baseiam-se na busca por destruição das células neoplásicas, que têm como característica o fato de se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais. Contudo, podem ocorrer efeitos secundários importantes naquelas células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior suscetibilidade às infecções (MALIK et al., 2009; FRAZIER et al., 2010).

Devido à relativa semelhança entre células malignas e normais do corpo, o grande desafio para o tratamento de cânceres é a distinção entre essas células, desta maneira, existe um interesse crescente na descoberta de novos medicamentos destinados ao combate seletivo às células tumorais (ISRILIDES et al., 2008; DOUKAS, et al., 2012; QUILLES et al., 2013).

1.2 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi descrito por Ehrlich em 1905 (EHRlich & APOLANT, 1905) e classificado em 1906, como um adenocarcinoma mamário espontâneo de camundongo fêmea. Inicialmente, o tumor foi mantido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Loewenthal & Jahn, descreveram pela primeira vez que células obtidas do tumor de Ehrlich, quando implantadas na cavidade peritoneal de camundongos eram capazes de crescer em suspensão e em fluido ascítico (LOEWENTHAL & JAHN, 1932).

Pode ocorrer na forma ascítica, quando as células tumorais são inoculadas intraperitonealmente, ou na forma sólida mediante inoculação das células tumorais no subcutâneo, possibilita também a quantificação do número de células aplicadas nos

animais (GUERRA, 1983). Sendo assim, devido a suas características e fácil manuseio experimental, o tumor de Ehrlich tem sido extensamente aplicado para a chamada oncologia experimental, um ramo da oncologia dedicado ao desenvolvimento dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis, procurando melhorar o conhecimento das neoplasias que afetam o homem e até mesmo os animais (DAWE, 1982; MEI et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; SARASWATI et al., 2013).

Este tumor tem sido utilizado como um modelo para vários estudos, tais como a influência do estresse sobre câncer (PALERMO-NETO et al., 2001, PALERMO-NETO et al., 2003), resposta imunológica ao tumor (SEGURA et al. 2000; PINTO, 2003), efeito antiangiogênico e antiproliferativo (KUMAR et al., 2009; ISLAM, et al., 2012 CHOUGULE et al., 2013), marcadores de proliferação celular (SILVA et al., 2006), na avaliação do crescimento tumoral sob o efeito de toxinas (MADY, 2002), extratos vegetais (RAJESHKUMAR et al., 2002; RADHIKA et al., 2012), drogas antiinflamatórias e agentes proteicos (PAL et al., 2001; KAR et al., 2012), neurotransmissores (MONSHKOV et al., 2013).

1.3 Resposta imunológica e evolução tumoral

O sistema imunológico tem um papel importante na prevenção do desenvolvimento tumoral, sendo capaz de reconhecer os antígenos tumorais, promovendo a morte de células neoplásicas e rejeição tumoral (ABBAS et al., 2003).

A associação entre as células do sistema imune e o câncer é conhecida há tempos, embora os mecanismos que envolvam tal interação ainda não estejam completamente elucidados. Inicialmente, acreditava-se que os infiltrados de leucócitos encontrados ao redor de neoplasias representavam uma tentativa do hospedeiro em erradicar as células neoplásicas. De fato, o extenso infiltrado de células matadoras

naturais (NK- do inglês, Natural Killer) em cânceres gástricos ou colorretais está associado a um melhor prognóstico (COCA et al., 1997; ISHIGAMI et al., 2000). Entretanto, estudos populacionais revelam que pacientes que mantêm um estado inflamatório crônico apresentam maior risco de desenvolver câncer (KARIN & GRETEN, 2005).

Acredita-se que o processo de eliminação do tumor compreende tanto a imunidade inata quanto adquirida, formando um sistema integrado de defesas do hospedeiro contra tumores, no qual diversas células e moléculas se relacionam mutuamente. Quanto à imunidade celular, processo eficaz na destruição dos tumores, é composta por células imunológicas que são capazes de liberar milhares de substâncias que tem como objetivo conter o processo inflamatório e/ou infeccioso (MILLS, et.al, 2004).

Dentre estas células os macrófagos desempenham papel chave na contenção do agente agressor, sendo uma das principais células que compõe o sistema imune inato. Possui papel de destaque na imunidade inata, e se comportam como células intermediadoras 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 & KRAAL et al., 2012).

São células com extensa participação em eventos regulatórios, dentre eles a promoção ou inibição da inflamação, atuação no reparo e renovação dos tecidos, ação tumoricida e microbicida (KLIMP et al., 2002). Infiltrados de macrófagos são frequentemente observados nos tecidos neoplásicos, podendo destruir células tumorais através da produção dos intermediários reativos do oxigênio (ROIs) e do TNF- α , quando ativados por diversos fatores, como os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, e citocinas (KLIMP et al., 2002).

Enzimas como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO), através da conversão de L-arginina em L-citrulina, desempenha um papel central nas reações inflamatórias (MACMICKING et al., 1997). Níveis elevados de iNOS promovem a carcinogênese, incluindo iniciação, promoção, progressão, metástase e angiogênese tumoral (GOCHMAN et al., 2012).

O microambiente tumoral está imerso por citocinas que afetam a proliferação e diferenciação de células do sistema imune. Citocinas são peptídeos endógenos de pequeno peso molecular amplamente envolvidas 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 (DUBIN et al., 2012). Além disso, possuem um importante papel na patogênese de uma variedade de doenças inflamatórias e auto-imunes (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) podendo induzir morte por necrose ou apoptose em algumas células tumorais humanas primárias e em linhagens celulares tumorais (PALLADINO et al., 2003).

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 e indução de proteínas de fase aguda (FALKOFF et al., 1983; TRINCHIERI, 2012). A IL-6, por sua vez, é uma citocina que funciona em ambas as imunidades adaptativa e inata. Esta molécula é sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares e

fibroblastos. Na imunidade inata, esta molécula estimula a síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos contribuindo desta maneira com o efeito sistêmico da inflamação. Na imunidade adaptativa, esta estimula a diferenciação de linfócito B em células produtoras de anticorpos (plasmócitos) (ABBAS et al., 2003; NAUGLER et al., 2007).

A 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). (TRINCHIERI & SCOTT, 1999; CHEN et al., 2012). Estimula a atividade antitumoral *in vivo* em diversos modelos de tumores murinos, utilizando mecanismos efetores da imunidade inata e adaptativa para mediar a resistência antitumoral (COLOMBO & TRINCHIERI, 2002).

Assim, o estudo *in vitro* de macrófagos nos permite analisar os prováveis mecanismos de defesa do hospedeiro para o controle e erradicação de doença neoplásica (GALDIERO et al., 2013; LAMEIJER et al., 2013).

Outro aspecto importante a ser analisado é o efeito de substâncias antitumorais sobre a angiogênese, uma vez que os tumores apresentam vascularização bastante proeminente em relação aos tecidos normais. A angiogênese e a metástase tumoral são processos funcionalmente relacionados, pois ambos envolvem uma tríade de eventos fisiopatológicos: mobilidade celular, proteólise tecidual e proliferação celular, e é controlada por diversos reguladores (PINHO, 2005).

Dentre os reguladores da angiogênese, o padrão de crescimento tumoral é dependente do desenvolvimento de uma neovascularização específica, a qual ocorre em decorrência de diversos fatores locais estimulantes de angiogênese como a hipóxia e a

elevação de CO₂ ou óxido nítrico, proteínas como VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) e a enzima COX-2 (ciclooxigenase-2) (PINHO, 2005).

O VEGF assim como outros fatores, é conhecido por possuir um papel central na promoção da angiogênese e é um dos mais potentes indutores de permeabilidade vascular sendo 50.000 vezes mais potente que a histamina. Sua síntese e liberação resultam em vasodilatação na rede vascular mais próxima e a permeabilidade vascular aumenta a partir da formação de fenestrações nesta rede capilar que possibilita a fuga de macromoléculas, proteínas e diversos fatores que retardam a absorção do edema intersticial e transformam um estroma normalmente antiangiogênico em um ambiente pró-angiogênico (HICKLIN, 2005).

Recentemente testes envolvendo drogas antitumorais com a propriedade de inibir o VEGF, ou seu receptor, apresentaram resultados promissores destinados à terapia oncológica como antiangiogênicos. Bates (2002) demonstrou que o incremento da condução de fluidos é mediado por aumento do influxo de cálcio através da membrana plasmática possivelmente decorrente da ativação da óxido nítrico sintetase (iNOS) e pelo próprio VEGF, já que inibidores da iNOS bloqueiam a permeabilidade vascular em processos crônicos e agudos mediados por VEGF.

Embora o câncer exiba características muito heterogêneas, todos os tumores malignos adquiriram a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. Portanto, apesar da enorme variabilidade de cânceres, evidências demonstram que a resistência a apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (OKADA, et al., 2004; BUNDSCHERER, et al., 2013).

Atualmente os tratamentos possuem baixa eficácia em virtude do mecanismo de ação que as drogas supressoras possuem, inibindo o crescimento ou matando as células malignas. A maior parte desses quimioterápicos são genotóxicos, produzindo dano ao DNA e mutações, que podem induzir a formação de novas células neoplásicas. Os princípios ativos mais procurados são aqueles que induzem a apoptose, levando apenas células malignas à morte (SUBHASHIN et al., 2005; SUK et al., 2013; WOZNIAK et al., 2013).

1.4 *Qualea grandiflora* Mart.

As plantas medicinais correspondem às mais antigas fontes empregadas pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos, ou seja, a utilização de plantas na prevenção e/ou na cura de doenças é um hábito que sempre existiu na história da humanidade. Segundo Duarte (2005), os primeiros registros sobre a utilização de plantas medicinais é datado de 500 a. C., no texto chinês que relata nomes, doses e indicações de uso de plantas para tratamento de doenças. Outros registros foram encontrados no manuscrito egípcio “Ebers Papyrus”, de 1.500 a. C., em que continham informações sobre 811 prescrições e 700 drogas. E algumas dessas plantas ainda são utilizadas, como Ginseng (*Panax* spp.), *Ephedra* spp., *Cassia* spp. e *Rheum palmatum* L., inclusive como matérias primas para indústrias farmacêuticas.

O aumento do consumo de plantas medicinais está provavelmente relacionado à deterioração das condições econômicas nos países do terceiro mundo (HERSCHMARTÍNEZ, 1995). Devido a este fator, as plantas medicinais continuam ocupando lugar de destaque no arsenal terapêutico. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial usam recursos das medicinas populares para

suprir necessidades de assistência médica privada (YUNES et al., 2001; DONG et al., 2013; PEĆANAC et al., 2013).

Os estudos envolvendo plantas, principalmente a partir dos anos 80, tiveram uma reorientação, inclusive no Brasil, devido ao surgimento de novos métodos analíticos de alta tecnologia, os quais permitem isolar componentes presentes nas plantas mesmo que em baixas quantidades (LIRA, 2007). O desenvolvimento de bioensaios simplificados, novos métodos de *screening*, introdução de testes *in vitro* que mimetizam situações análogas *in vivo*, entre tantos outros, também determinaram o ressurgimento do interesse na investigação de produtos naturais, perdido durante a década de 60, como possível fonte de novos protótipos para indústria farmacêutica (YUNES et al., 2001; SCHENKEL et al., 2003).

O gênero *Qualea* é constituído por árvores típicas da zona tropical e distribuído em, aproximadamente, 200 espécies, ocorre em toda a América tropical, desde o México, passando pelo Peru e Guianas, e o Brasil onde três espécies são predominantes no Cerrado: *Qualea grandiflora*, *Qualea parviflora* e *Qualea multiflora*, e são conhecidas popularmente como mandioqueira ou quaruba (CÔRREA, 1974).

As cascas, entrecascas e folhas de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae), popularmente conhecida como pau-terra, são usadas para limpeza de úlceras externas, como anti-inflamatório e no tratamento de distúrbios gastrintestinais (ALMEIDA et al., 1998) outros estudos indicam que esta age no sistema nervoso central, com ação analgésica e se comporta como um anticonvulsivante (GASPI, et al., 2006). Hiruma-Lima et al. (2006) relataram a presença de terpenóides, taninos, catequinas, quercetina e outros polifenóis no extrato alcoólico de cascas dessa espécie, o qual também apresentou atividade antiulcerogênica.

Q. grandiflora, é uma árvore do cerrado brasileiro de aproximadamente 12 metros de altura, com caule de até 40 cm de diâmetro. Foi estudada em projetos temáticos BIOTA-FAPESP, apresenta folhas simples, opostas e rígidas com 10-14 cm de comprimento. Sua ocorrência abrange desde o Amazonas até São Paulo, sendo encontrada geralmente em terrenos altos, bem drenados e secos. Seu florescimento ocorre nos meses de novembro-janeiro e a maturação dos frutos ocorre geralmente nos meses de agosto-setembro, quando a planta está quase totalmente despida de sua folhagem (Figura 1) (LORENZI et al., 2002).



Figura 1: Árvore de *Qualea grandiflora*

Fonte: <http://plantecerrado.webnode.com.br/products/pau-terra-grande-qualea-grandiflora>

Várias pesquisas vêm sendo realizadas em nosso laboratório demonstrando os efeitos desta planta avaliando a atividade farmacológica *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Qualea* sp. demonstrando que a planta apresenta características anti-inflamatórias e

atividade inibitória do crescimento tumoral frente à linhagem de câncer murino LM3 ativados com LPS (CARLI, et al., 2013).

Embora grandes avanços foram feitos no tratamento de câncer ao longo dos últimos 50 anos, continua sendo uma preocupação de saúde, por isso, grandes esforços têm sido voltados a favor da busca de novas abordagens terapêuticas. Desta maneira, existe um interesse crescente na descoberta de novos medicamentos destinados ao combate seletivo às células tumorais associado à atividade imunomodulatória.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar o efeito do extrato bruto hexânico (EH) e de sua fração terpênica (FT) e como a substância isolada β -sitosterol (BS) e Taxol® (Paclitaxel- TX), como droga padrão em modelo de câncer mamário murino, concomitante com a avaliação da produção de mediadores pró-inflamatórios no animal após esses tratamentos.

2.2 Específicos

- Obtenção do extrato hexânico (EH) e fração terpênica (FT) de *Q. grandiflora*

Testes *in vitro*

- Determinar a viabilidade de células do exsudato peritoneal de camundongos e células tumorais de Ehrlich, após incubação com os diferentes tratamentos
- Verificar a angiogênese pela presença de VEGF na célula tumoral de Ehrlich pelo teste imunoenzimático ELISA
- Determinar a ocorrência de apoptose em células tumorais frente às substâncias testadas pelas técnicas de Tunel e Anexina V
- Determinar a inibição de NO em sobrenadantes de culturas de células do exsudato peritoneal de camundongos
- Determinar a inibição das citocinas TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6 em sobrenadantes de culturas de células do exsudato peritoneal de camundongos

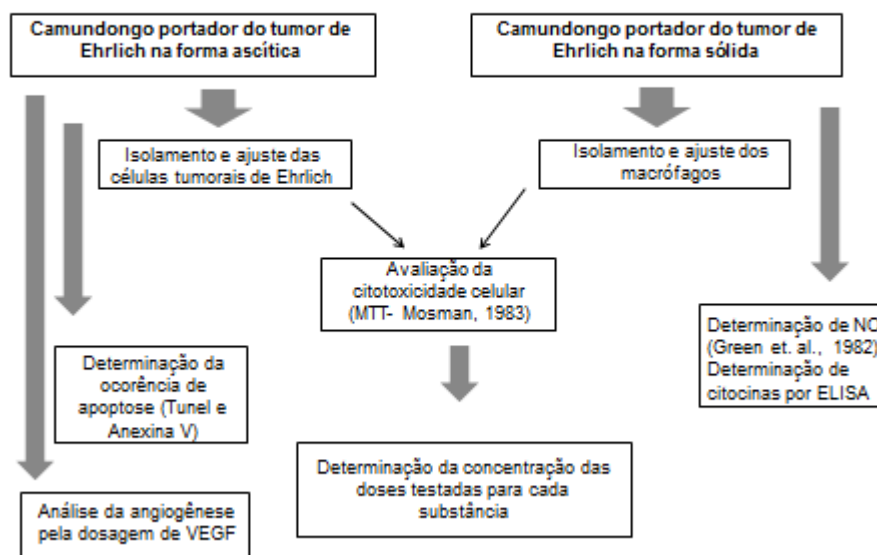
Testes *in vivo*

- Verificar o volume tumoral
- Avaliar a taxa de inibição do crescimento dos tumores após os diferentes tratamentos
- Avaliar número células em mitose
- Avaliar número de células em processo de angiogênese

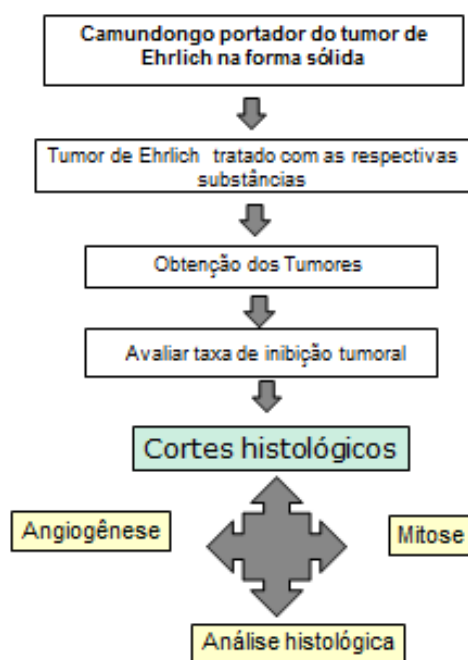
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

- Testes *in vitro*



- Testes *in vivo*



3.2 Obtenção do extrato bruto e fração terpênica de *Qualea grandiflora*.

As cascas de *Q. grandiflora*, foram coletadas em Pedro Afonso (Estado do Tocantins, TO, Brasil), por Cristiano Borges Pereira em 25 de Outubro de 2003. O voucher da espécie foi identificado por Dr. S. F. Lolis, no herbário pertencente à UNITINS (Fundação Universidade do Tocantins) sob o nº 3379.

O preparo de EH e FT obtida de *Qualea grandiflora* foi realizado, no Instituto de Química (IQ) da UNESP, sob a orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas. As cascas do tronco foram secas em estufa a 40 °C, triturada em moinho de facas, e extraída exaustivamente com hexano (48h-3L) (três vezes) à temperatura ambiente. A destilação foi feita em evaporador rotatório. Após essa etapa, o extrato hexânico foi fracionado em coluna sílica gel utilizando um gradiente crescente de polaridade (hexano→acetato→metanol), fornecendo a fração terpênica estudada neste projeto.

3.3 Obtenção das Soluções a serem utilizadas nos Ensaios Biológicos

EH, FT e BS foram primeiramente diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO- Merk, Alemanha) 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- Sigma, Chemical Co., EUA). No máximo, 4% de DMSO foi utilizado (concentração anteriormente testada em ensaio de citotoxicidade).

A substância isolada β -sitosterol (BS) (lot# 0001448346) e a droga padrão utilizada Taxol (TX) (lot# BCBB4101) foram compradas da Sigma-Aldrich®.

3.4 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem Swiss pesando entre 18 a 25g, procedentes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Câmpus de

Araraquara, São Paulo, 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 realizados segundo parecer emitido pela Comissão Local de Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (CEUA/FCF/Car nº 01/2010).

Testes *in vitro*

3.5 Obtenção de macrófagos do exsudato peritoneal

Os animais dos diferentes grupos, após o desenvolvimento da massa tumoral, foram previamente estimulados através da inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3% (Difco Lab. Ltda, EUA), 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, Ind. Bras.). O líquido peritoneal foi coletado com tampão fosfato PBS pH 7,2 em seringa e agulha e transferido para tubo estéril (Corning, Inc., EUA) para lavagem das células, centrifugando-se três vezes a 200 xg durante 5 minutos em centrífuga (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.), a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e as células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., EUA) suplementado com 5% soro fetal bovino (Sigma Chemical Co., EUA), 100 μL de estreptomicina, 100 μL de penicilina (Sigma Chemical Co., EUA) e 2 mM de L – glutamina (Sigma Chemical Co., EUA). O meio assim composto denominou-se RPMI-1640 Completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Alemanha), sendo ajustado à concentração desejada para cada ensaio em meio RPMI-

1640-C, suplementado com L-glutamina, sem NHCO_3 (Sigma Chemical Co., EUA), acrescido de soro fetal bovino, estreptomicina e penicilina. O meio assim composto denominou-se NCTC-135-Completo (NCTC-135-C).

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

As células tumorais de Ehrlich foram gentilmente cedidas pela Dra. Denise Fecchio do Departamento de Patologia da UNESP, Botucatu, Brasil. A manutenção das células tumorais no laboratório se deu na forma ascítica *in vivo* através de repiques semanais. Para manutenção do tumor *in vivo*, 1×10^7 células tumorais em um volume de 0,2 mL foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos receptores, a cada 7 dias, segundo metodologia descrita na literatura (FECCHIO et al., 1990).

3.7 Inoculação das células tumorais para formação do tumor sólido

Os camundongos, após assepsia local com álcool iodado, foram inoculados subcutaneamente no coxim plantar com 0,1 mL da suspensão tumoral ajustada na concentração de 1×10^7 células tumorais/mL em meio de cultura NCTC-135 (Sigma Chemical Co., EUA) suplementado com L-glutamina, sem NHCO_3 (Sigma Chemical Co., EUA), acrescido de soro fetal bovino (Sigma Chemical Co., EUA), estreptomicina e penicilina (Sigma Chemical Co., EUA). O meio assim composto denominou-se NCTC-135-Completo (NCTC-135-C). O ajuste das células foi realizado por contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer utilizando-se o corante azul de Tripan.

3.8 Obtenção das células tumorais de Ehrlich para os ensaios *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 o sacrifício dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma ascítica em câmara de CO₂ e estes tiveram o fluido ascítico retirado assepticamente em fluxo laminar Classe 100 (Veco, Ind. Bras.).

Para o preparo da suspensão celular, esta foi centrifugada duas vezes com 5 volumes de cloreto de amônio (NH₄Cl, Labsynth Ind. Bras. Ltda), caso o fluido ascítico estivesse hemorrágico, e depois duas vezes com solução salina tamponada de fosfatos de pH 7,2, estéril (PBS) a 200xg durante 5 min.

As células tumorais sedimentadas foram ressuspendidas em 1,0 mL de meio NCTC-135-C para os ensaios de citotoxicidade e/ou viabilidade celular *in vitro*, sendo ajustadas à concentração de 1×10^6 células/mL. O número de células foi determinado por contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer utilizando-se o corante azul de Tripán.

3.9 Avaliação da citotoxicidade em cultura de macrófagos

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade que as células viáveis têm de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) (Across Organics) 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 100µL 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 100µL de EH, FT, BS e TX em diferentes

concentrações, além de 100µL de LPS a 0,5 µg/mL (Lipopolissacarídio de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma Chemical. Co, EUA) (controle positivo) ou somente 100µL meio de cultura RPMI-1640-C, em triplicata. As placas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Após essa incubação, o sobrenadante foi descartado e as células aderentes lavadas com PBS e depois tratadas com 100µL de uma solução de MTT 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 100µL de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (Multiskan *Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620nm.

3.10 Avaliação da citotoxicidade em linhagem tumoral de Erhlich

O crescimento celular foi quantificado através do ensaio de MTT, previamente descrito. As células foram obtidas de acordo com o item 4.8 100 µL da suspensão celular tumoral foram adicionadas aos poços juntamente com 100 µL de EH, FT, BS e TX em diversas concentrações posteriormente incubadas a 37 °C com pressão constante de 5% CO₂. Apenas meio de cultura NCTC-135- C foi usado como controle negativo e considerado 100% de viabilidade. Após a cultura o meio foi trocado por outro contendo 1mg/mL de MTT em NCTC-135. Após 3h, o meio foi removido e 100µL de isopropanol 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 (MOSMANN, 1983).

3.11 Análise da angiogênese pela dosagem de VEGF por Teste Imunoenzimático (ELISA)

A produção de VEGF foi quantificada nos sobrenadantes obtidos das culturas de célula tumoral de Ehrlich, conforme descrito no item 4.8 através do teste imunoenzimático ELISA de captura de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience – BMS277/2TEN). As microplacas foram lavadas duas vezes com 300 µL de tampão de lavagem (PBS com 1% Tween 20) (Sigma Chemical Co., EUA). Após a lavagem, foi adicionado as placas 100 µL das amostras e padrão em cada cavidade e incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos sob agitação a 100 rpm. Em seguida, foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e adicionados 100 µL/cavidade do conjugado peroxidase-streptavidina diluído em PBS/BSA e incubadas novamente à temperatura ambiente por 60 minutos. Após esse processo, as placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e 100 µL do substrato (Tetrametilbenzidina) foram adicionados a cada cavidade e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de H₃PO₄ 1M (Stop Solution). A absorvância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan *Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki) e as concentrações foram quantificadas utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de VEGF padrão. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em picogramas/mL.

3.12 Determinação da ocorrência de apoptose em células tumorais por TUNEL

A técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*) avalia a estrutura da cromatina e integridade do DNA das células, detectando com confiabilidade fragmentações de DNA em amostras. Baseia-se

na incorporação de nucleotídeos (d-UTP = 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com o corante fluorescente FITC (Isotiocianato de fluoresceína) na região livre 3'OH das quebras do DNA fita simples ou fita dupla (KOCKX et al., 1998; GORCZYCA et al., 1993).

A técnica foi realizada utilizando-se o kit *In Situ Cell Death Detection Kit* (Roche), conforme instruções do fabricante. Foi adicionado às placas de 96 wells (Falcon cód. 353046) 2 mL de células tumorais ajustadas à 5.10^5 células/mL em NCTC-C, juntamente com 2 ml das substâncias testadas nas concentrações pré-estabelecidas em mg/ml (EH: 1, FT: 1, BS: 0,125 e TX: 0,125) e como controle foi utilizado somente NCTC-C. Após 24 hr de incubação em estufa a 37°C contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA), a linhagem celular foi então recolhida e colocada em um tubo falcon. Foram expostas à 100 µL de tampão de fixação, e incubadas por 60 minutos. As células foram lavadas com tampão de lavagem e ressuspensas em 100 µL de tampão de permeabilização. A seguir, às amostras foram acrescentados 50 µL do reagente de TUNEL; e no controle negativo, 50 µL da solução de ligação, somente. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C em câmara úmida, ao abrigo da luz. A seguir, foram adicionados 5 µL de iodeto de propídio a 2 µg/mL e foi realizada uma incubação de 10 minutos nas mesmas condições anteriores. A leitura foi feita em citômetro de fluxo BD FACSCanto (BD Biosciences).

3.13 Determinação da ocorrência de apoptose em células tumorais por Anexina V

A dosagem de Anexina V é destinada para detecção de apoptose, pela dosagem de fosfatidilserina (PS). PS é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica. Nas células no início da apoptose, onde a membrana celular ainda permanece intacta mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície

exterior da bicamada. Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolípidos e possui alta afinidade por PS na presença de íons de cálcio. Mudanças nesta assimetria da membrana, que é analisada através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana (BOERSMA et al., 2005; BRUMATTI, 2008; VAN GENDEREN, et al., 2008).

A dosagem de Anexina foi realizada pelo FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen), de acordo com as instruções do fabricante. Foi adicionado às placas de 96 poços (Falcon cód. 353046) 2 mL de células tumorais ajustadas à 5.10^5 células/mL em NCTC-135-C, juntamente com 2 mL das substâncias testadas nas concentrações pré-estabelecidas em mg/mL (EH: 1, FT: 1, BS: 0,125 e TX: 0,125) e como controle foi utilizado somente NCTC-135-C. Após 24 hr de incubação em estufa a 37°C contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA), as células foram recolhidas em tubo falcon e adicionadas de 400 µL de tampão de ligação, 5 µL de anexina V-FITC e 5 µL de iodeto de propídio (2 µg/mL). Após incubação de 10 minutos, foram adicionados 100 µL de paraformaldeído a 1% na mistura e esta foi mantida a 4°C. No momento da leitura, foram adicionados 400 µL de tampão de ligação a cada tubo e as células analisadas por citometria de fluxo em Citômetro BD FACSCanto (BD Biosciences).

3.14 Determinação 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 NaNO₂ 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 100µL dessa suspensão celular em placas de 96 cavidades estéreis (Corning Inc.). Na placa foram adicionados 100µL de EH (1mg/mL), FT (1mg/mL), BS (0,125 mg/mL) e TX (0,125 mg/mL) + 100µL de uma solução de LPS a 0,5 µg/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 hr em estufa a 37°C com tensão constante de CO₂ a 5% . Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 50µL de cada amostra, transferidas para 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 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/ 5.10^5 células.

3.15 Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram utilizados na determinação da inibição da produção das citocinas TNF-α, IL-1, IL-12 e IL-6. As células peritoneais foram ajustadas à concentração de 5.10^6 células/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 TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6 foi adicionado às células aderentes 1mL de RPMI-1640-C, 1mL de EB, FT, BS 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 24hr. Após esta incubação, o conteúdo das placas foi transferido para tubos do tipo *ependorfs* 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 *ependorfs* e armazenados em freezer a -80° C até o momento da determinação das citocinas através do teste imunoenzimático, ELISA.

3.16 Determinação das citocinas TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6

As citocinas 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- TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6 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) (Sigma Chemical Co., EUA) 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- TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6 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) (Sigma Chemical Co., EUA). 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 TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6 padrão. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em picogramas/mL.

Testes *in vivo*

3.17 Protocolo Terapêutico

As células tumorais foram ajustadas na concentração de 1.10^7 cel/mL e inoculadas na região do coxim plantar dos camundongos previamente identificados. Após 30 dias, o animais portadores de tumor receberam o tratamento intratumoral com as substâncias testes ajustadas nas concentrações adequadas em PBS (mg/mL) com

auxílio de seringa e agulha (0,70 x 25mm- BD PrecisionGlideTM) após assepsia local. Foram realizadas 2 aplicações no interior da massa tumoral, com intervalos de 5 dias entre cada uma. Cada animal recebeu o tratamento, de acordo com as especificações dos grupos de estudo (4.18).

3.18 Grupos de Estudo

Os camundongos foram distribuídos em grupos de 5 animais/grupo:

Grupo I: inoculados com células tumorais de Ehrlich e tratados com PBS.

Grupo II: inoculados com células tumorais de Ehrlich e tratados com EH.

Grupo III: inoculados com células tumorais de Ehrlich e tratados com FT.

Grupo IV: inoculados com células tumorais de Ehrlich e tratados com BS.

Grupo V: inoculados com células tumorais de Ehrlich e tratados com de TX.

3.19 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 Sul Americana Ltda, Ind. Bras.). O tumor também foi pesado com auxílio de uma balança não analítica (Boeco, Alemanha). O volume do tumor foi calculado pela fórmula (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 PBS (controle)

3.20 Análise Histopatológica dos Tumores

Os tumores removidos dos animais de estudos foram fixados em parafina e corados com eosina e hematoxilina. As lâminas foram então analisadas histopatologicamente e fotografadas com auxílio de microscópio com captura de imagem (Nikon Eclipse E200).

3.21 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 fixado 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.

3.22 Análise da angiogênese pelo Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia (MAGS)

O sistema de gradação para angiogênese por microscopia (MAGS) foi desenvolvido seguindo a técnica de Brem e colaboradores (1972), modificado por Shankar e colaboradores (2006). A vasoproliferação (KnN), a hiperplasia de células endoteliais (KeE) e a citologia endotelial (KxX) foram observadas estereometricamente em microscópio óptico em cortes de 5 μ m do tecido tumoral mamário fixado 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: $MAGS = K_nN + K_eE + K_xX$, onde as constantes são: $K_n = 1$, $K_e = 3$ e $K_x = 6$.

A vasoproliferação (K_nN) 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 (K_eE) 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 (K_xX) 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, 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 gradação 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.

3.23 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.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da citotoxicidade de macrófagos peritoneais e células tumorais de Ehrlich pela técnica de MTT (MOSSMAN, 1983)

Por meio do teste de MTT, foram estabelecidas as concentrações utilizadas para o tratamento do animal portador de tumor (*in vivo*), concentrações estas que deve ser seletivas, ou seja, apresentarem baixa citotoxicidade frente às células imunológicas e alto efeito tóxico às células tumorais.

Na figura 2 e Tabela 1 podemos observar que na concentração de 1 mg/mL de EH houve alta viabilidade para os macrófagos e alta citotoxicidade frente as células tumorais ($93,58 \pm 5,98\%$; $1,71 \pm 1,38\%$) respectivamente.

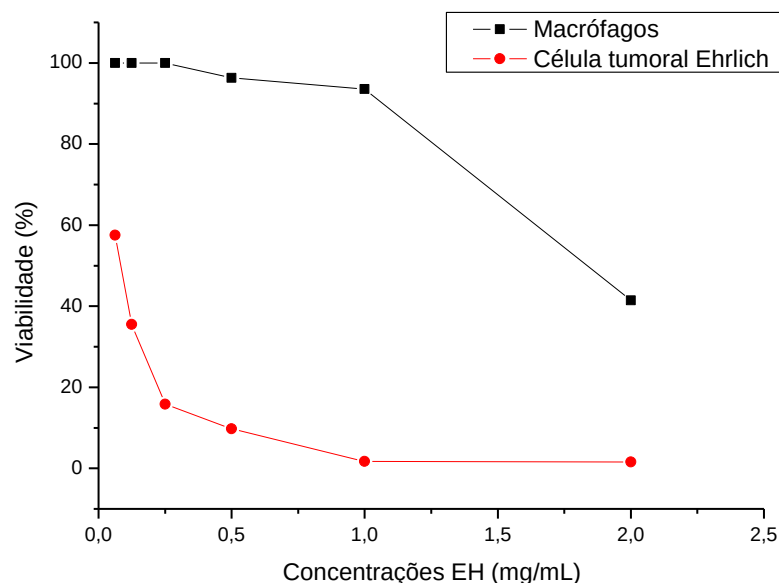


Figura 2: Viabilidade de macrófagos e células tumorais de Ehrlich frente ao extrato hexânico (EH). As células foram incubadas com as diferentes concentrações 2, 1, 0,5, 0,125, 0,5 e 0,0625 mg/mL de EH pelo período de 24h em estufa de CO₂ a 37°C. A viabilidade do controle negativo (apenas meio de cultura NCTC-135- C) foi considerada 100%. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais realizados em triplicata.

Tabela 1. Viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de EH

<i>EH (mg/mL)</i>	<i>Macrófagos^{1,3}</i>	<i>Ehrlich^{2,3}</i>
2	41,46 $\pm$ 6,89***	1,59 $\pm$ 0,99***
1	93,58 $\pm$ 5,98	1,71 $\pm$ 1,38***
0,5	96,32 $\pm$ 8,61	9,73 $\pm$ 1,67***
0,25	100 $\pm$ 7,99	15,85 $\pm$ 4,66***
0,125	100 $\pm$ 4,32	35,47 $\pm$ 8,56**
0,0625	100 $\pm$ 5,23	57,50 $\pm$ 5,78**
Controle Negativo	100	100

¹⁻ 5x10⁶ células / cavidade.

²⁻ 1x10⁶ células / cavidade.

³⁻ Valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em mg/mL.

Avaliação após 24 horas de incubação. Cada valor referente aos macrófagos representa a média $\pm$ desvio-padrão de seis animais realizados em triplicata. Os valores referentes às células tumorais de Ehrlich representam a média $\pm$ desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata. EH: extrato hexânico.

*** 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.

Foi demonstrado pela figura 3 e tabela 2, que a FT apresenta na concentração de 1 mg/mL alguma citotoxicidade aos macrófagos ($75,27 \pm 2,78\%$) e maior citotoxicidade frente às células tumorais de Ehrlich ($35,56 \pm 3,78\%$).

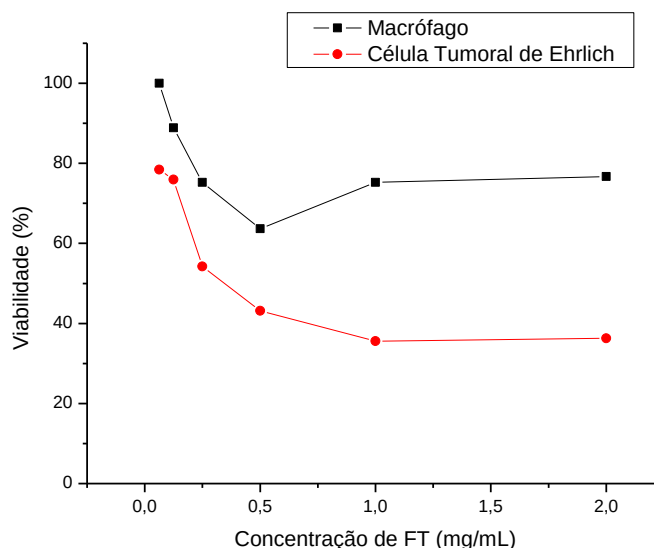


Figura 3: Viabilidade de macrófagos e células tumorais de Ehrlich frente à fração terpênica (FT). As células foram incubadas com as diferentes concentrações 2, 1, 0,5, 0,125 e 0,0625 mg/mL de FT pelo período de 24h em estufa de CO₂ a 37°C. A viabilidade do controle negativo (apenas meio de cultura NCTC-135- C) foi considerada 100%. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais realizados em triplicata.

Tabela 2. Viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de FT

<i>FT</i> (mg/mL)	<i>Macrófagos</i> ^{1,3}	<i>Ehrlich</i> ^{2,3}
2	76,73 $\pm$ 4,90*	36,30 $\pm$ 1,20***
1	75,27 $\pm$ 2,78*	35,56 $\pm$ 3,78***
0,5	63,68 $\pm$ 2,88**	43,17 $\pm$ 2,56**
0,25	75,27 $\pm$ 3,77*	54,21 $\pm$ 4,78**
0,125	88,84 $\pm$ 5,99	75,92 $\pm$ 4,65*
0,0625	100 $\pm$ 4,89	78,44 $\pm$ 5,89*
Controle Negativo	100	100

¹⁻ 5×10^6 células / cavidade.

²⁻ 1×10^6 células / cavidade.

³⁻ Valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em mg/mL.

Avaliação após 24 horas de incubação. Cada valor referente aos macrófagos representa a média $\pm$ desvio-padrão de seis animais realizados em triplicata. Os valores referentes às célula tumoral de Ehrlich representam a média $\pm$ desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata. FT : fração terpênica.

*** $p < 0,001$ 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.

Em relação ao β -sitosterol, a figura 4 e tabela 3 demonstraram que a concentração escolhida para realização dos testes foi de 0,125 mg/mL, pois apresenta alta viabilidade para macrófagos ($63,38 \pm 8,90\%$) enquanto que toxicidade intermediária para células tumorais de Ehrlich ($54,12 \pm 6,7\%$).

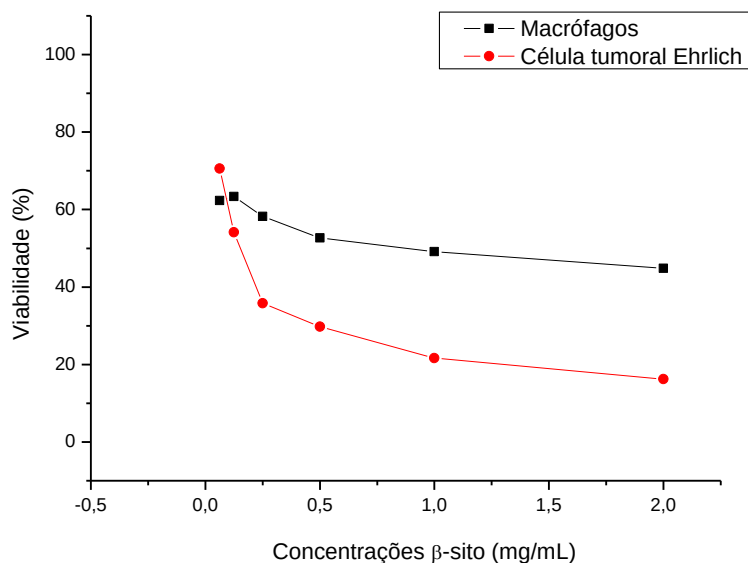


Figura 4: Viabilidade de macrófagos e células tumorais de Ehrlich frente ao β - sitosterol (BS). As células foram incubadas com as diferentes concentrações 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 mg/mL de BS pelo período de 24h em estufa de CO₂ a 37°C. A viabilidade do controle negativo (apenas meio de cultura NCTC-135- C) foi considerada 100%. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais realizados em triplicata. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais realizados em triplicata.

Tabela 3. Viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de BS

β - sito (mg/mL)	<i>Macrófagos</i> ^{1, 3}	<i>Ehrlich</i> ^{2,3}
2	44,81 $\pm$ 3,90***	16,25 $\pm$ 3,89***
1	49,13 $\pm$ 4,44***	21,65 $\pm$ 5,77***
0,5	52,67 $\pm$ 5,89***	29,74 $\pm$ 3,99***
0,25	58,24 $\pm$ 4,33***	35,81 $\pm$ 5,12***
0,125	63,38 $\pm$ 8,90**	54,12 $\pm$ 6,78***
0,0625	62,32 $\pm$ 6,76**	70,57 $\pm$ 4,88**
Controle Negativo	100	100

¹⁻ 5x10⁶ células / cavidade.

²⁻ 1x10⁶ células / cavidade.

³⁻ Valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em mg/mL.

Avaliação após 24 horas de incubação. Cada valor referente aos macrófagos representa a média $\pm$ desvio-padrão de seis animais realizados em triplicata. Os valores referentes as célula tumoral de Ehrlich representam a média $\pm$ desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata. BS: β - sitosterol.

*** 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 avaliação da droga padrão utilizada (Figura 5 e Tabela 4), podemos observar que a concentração de escolha 0,125 mg/mL demonstrou alta viabilidade para macrófagos ($78,76 \pm 7,91\%$) enquanto uma alta toxicidade para células tumorais de Ehrlich ($46,32 \pm 2,36\%$).

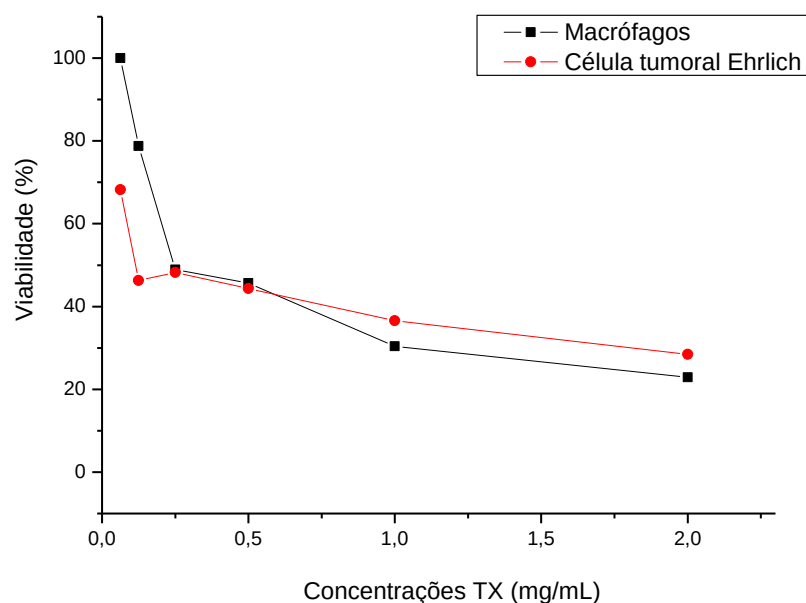


Figura 5: Viabilidade de macrófagos e células tumorais de Ehrlich frente ao taxol (TX). As células foram incubadas com as diferentes concentrações 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 mg/mL de TX pelo período de 24h em estufa de CO₂ a 37°C. A viabilidade do controle negativo (apenas meio de cultura NCTC-135- C) foi considerada 100%. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais realizados em triplicata.

Tabela 4. Viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de TX

TX (mg/mL)	Macrófagos ^{1,3}	Ehrlich ^{2,3}
2	22,87 $\pm$ 3,94***	28,42 $\pm$ 3,2***
1	30,41 $\pm$ 2,67***	36,56 $\pm$ 2,22***
0,5	45,65 $\pm$ 5,70***	44,36 $\pm$ 6,88***
0,25	48,91 $\pm$ 5,65***	48,23 $\pm$ 2,56***
0,125	78,76 $\pm$ 7,91*	46,32 $\pm$ 2,36***
0,0625	100	68,23 $\pm$ 1,25*
Controle Negativo	100	100

¹⁻ 5x10⁶ células / cavidade.

²⁻ 1x10⁶ células / cavidade.

³⁻ Valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em mg/mL.

Avaliação após 24 horas de incubação. Cada valor referente aos macrófagos representa a média $\pm$ desvio-padrão de seis animais realizados em triplicata. Os valores referentes às células tumorais de Ehrlich representam a média $\pm$ desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata. TX: taxol.

*** 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.

Desta maneira, foram escolhidas concentrações seletivas que apresentaram uma alta viabilidade para os macrófagos e alta citotoxicidade frente à célula tumoral. Para o extrato bruto – 1 mg/mL ($93,58 \pm 5,98\%$; $1,71 \pm 1,38\%$), fração terpênica – 1 mg/mL ($75,27 \pm 2,78\%$; $35,56 \pm 3,78\%$), β -sitosterol – 0,125 mg/mL ($63,38 \pm 8,90\%$; $54,12 \pm 6,78\%$) e taxol – 0,125 mg/mL ($78,76 \pm 7,91\%$; $46,32 \pm 2,36\%$) viabilidade de macrófagos e células tumorais respectivamente.

4.2 Determinação da produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)

Na avaliação da angiogênese pela dosagem de VEGF nas células tumorais de Ehrlich verificamos que o EH, FT, BS induziram uma produção significativa desta proteína ($5000,3 \pm 8,39$ pg/mL, $5000,9 \pm 6,34$ pg/mL, $5000,6 \pm 2,42$ pg/mL) respectivamente, quando comparada com o controle negativo ($2000,8 \pm 5,23$ pg/mL), mas apresentou um $p < 0,05$ quando comparada a droga padrão TX. Por outro lado, a droga padrão TX induziu uma produção significativa, equivalente a $17000,5 \pm 3,25$ pg/mL de VEGF pelas células tumorais de Ehrlich ($p < 0,01$) quando comparada ao controle negativo (Figura 6 e Tabela 5).

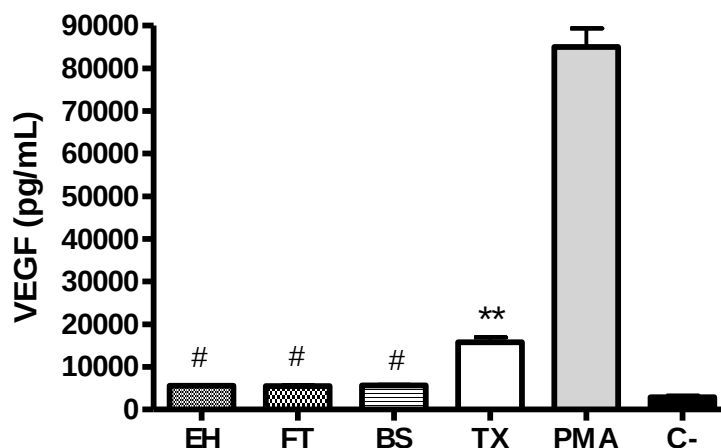


Figura 6: Produção de fator de crescimento vascular endotelial nas células tumorais de Ehrlich expostas as substâncias. As células tumorais foram incubadas com as diferentes concentrações dos compostos, somente PMA (controle positivo) ou somente célula (controle negativo), durante o período de 24 horas, em estufa de CO₂ a 37°C. As concentrações de VEGF foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de VEGF. Cada barra representa a média e desvio padrão de três experimentos realizados e triplicata. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β - sitosterol; TX: taxol; PMA: acetato de forbol miristato; C-: controle negativo.

** p<0,01 quando comparada ao tratamento com controle negativo.

p<0,05 quando comparado ao Taxol.

Tabela 5. Produção de VEGF nas células tumoral de Ehrlich

<i>Tratamentos</i>	<i>VEGF (pg/mL)</i>
<i>EH</i>	5000,3 $\pm$ 8,39
<i>FT</i>	5000,9 $\pm$ 6,34
<i>BS</i>	5000,6 $\pm$ 2,42
<i>TX</i>	17000,5 $\pm$ 3,25
<i>PMA</i>	84000,6 $\pm$ 2,84
<i>C-</i>	2000, 8 $\pm$ 5,23

Avaliação após 24 horas de incubação. Cada valor representa a média $\pm$ desvio-padrão de três ensaios consecutivos realizados em triplicata. Valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em pg/mL. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β - sitosterol; TX: taxol; PMA: acetato de forbol miristato; C-: controle negativo.

4.3 Quantidade de células apoptóticas nos tumores

A quantidade de células apoptóticas em cada tumor foi contada por citometria de fluxo utilizando duas metodologias, através da marcação de células com reagente de anexina V (Figuras 7 e 8) e através da marcação das células com reagente de TUNEL (Figuras 9 e 10), ambas associadas ao fluorocromo FITC.

Foi observada maior quantidade de células em estágio apoptótico nos animais que receberam o tratamento com EH, quando comparados com o controle PBS e a droga padrão utilizada TX ($73,9 \pm 0,98 \%$, $20,0 \pm 1,78 \%$, $40,7 \pm 1,98 \%$) para anexina V e ($56,2 \pm 1,98 \%$, $7,4 \pm 0,74 \%$, $28,3 \pm 0,74 \%$) para técnica do TUNEL respectivamente ($p < 0,001$ para todas as comparações).

Em relação à FT ($25,8 \pm 2,1\%$) e ao BS ($28,5 \pm 2,7\%$), ambos apresentaram menor quantidade de células em apoptose quando comparados ao TX ($40,7 \pm 1,98 \%$) no caso da anexina V ($p < 0,05$). Para técnica de TUNEL observou-se o mesmo padrão de apoptose, onde a FT ($13,4 \pm 2,64\%$) assim como o BS ($11,0 \pm 3,65\%$) apresentaram uma quantidade menor de células apoptóticas quando comparada à droga padrão TX ($28,3 \pm 0,74 \%$) ($p < 0,05$).

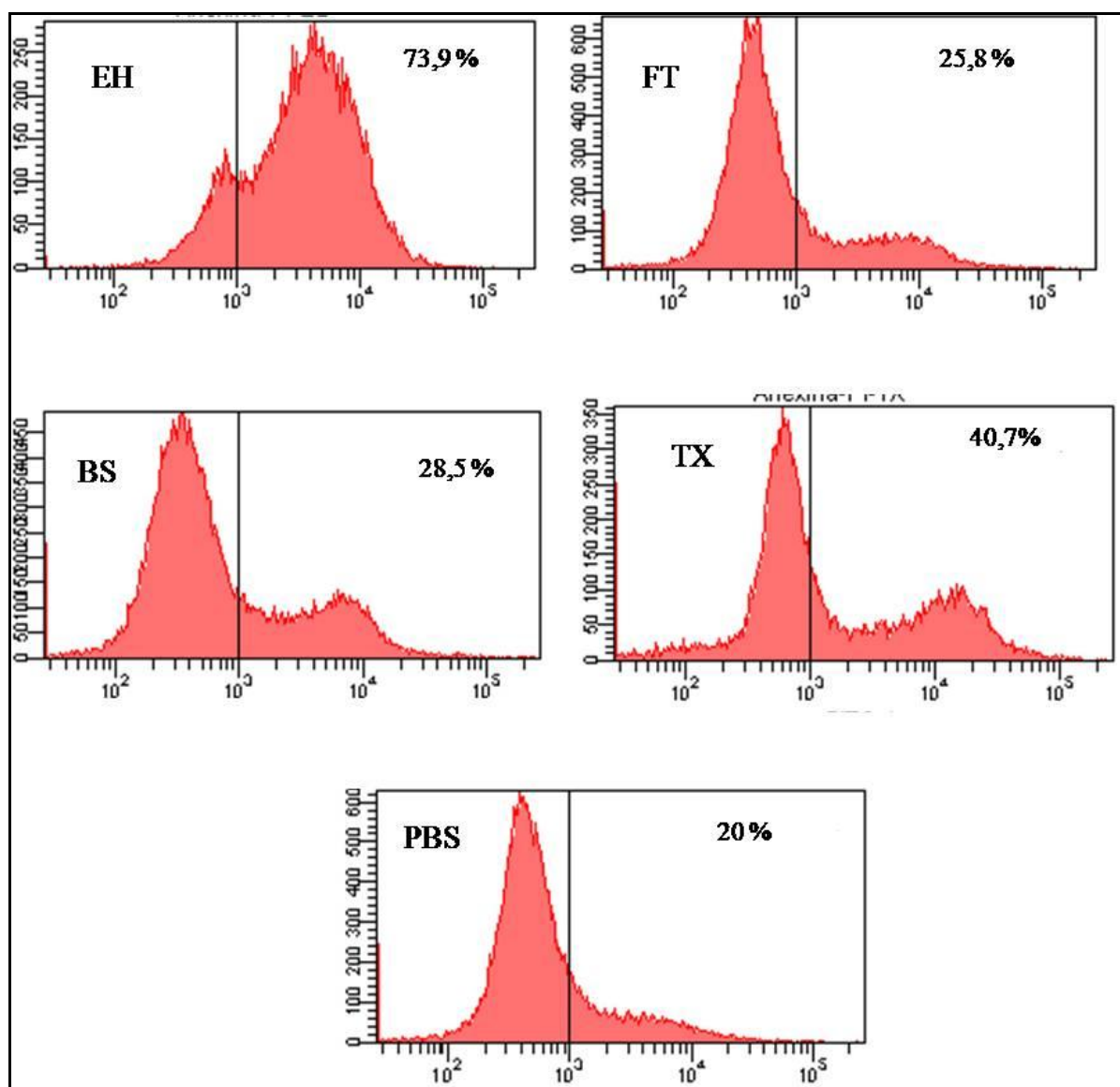


Figura 7: Porcentagem de células em apoptose no tumor de Ehrlich pelo teste de ANEXINA V. As células tumorais de Ehrlich em apoptose foram incubadas por 24 hr na presença das substâncias testadas pela técnica de citometria de fluxo coradas com reagente de anexina V e iodeto propídio. Histograma representativo de três experimentos. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β - sitosterol; TX: taxol; PBS: solução salina tamponada de fosfatos.

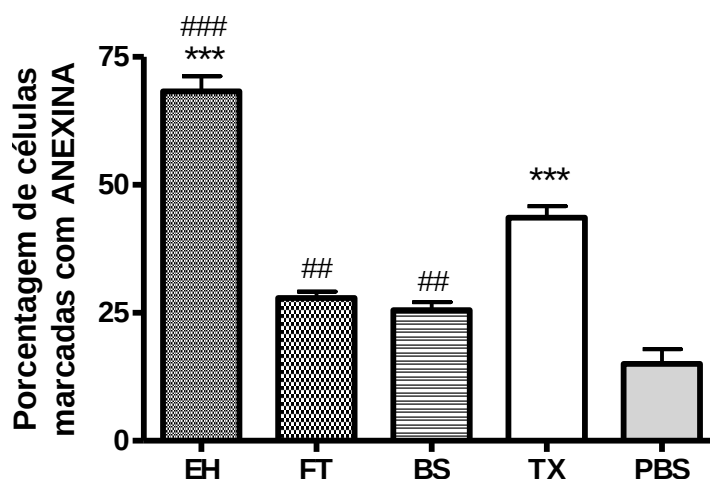


Figura 8: Porcentagem de células em apoptose no tumor de Ehrlich pelo teste de ANEXINA V. As células em apoptose foram incubadas por 24 hr na presença das substâncias testadas pela técnica de citometria coradas com reagente de anexina V e iodeto de propídio. Os resultados foram expressos com a média $\pm$ desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata. Como controle C- foi utilizado PBS. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β - sitosterol; TX: taxol; PBS: solução salina tamponada de fosfatos.

*** $p < 0,001$ quando comparada ao tratamento com controle.

$p < 0,001$ quando comparado ao Taxol.

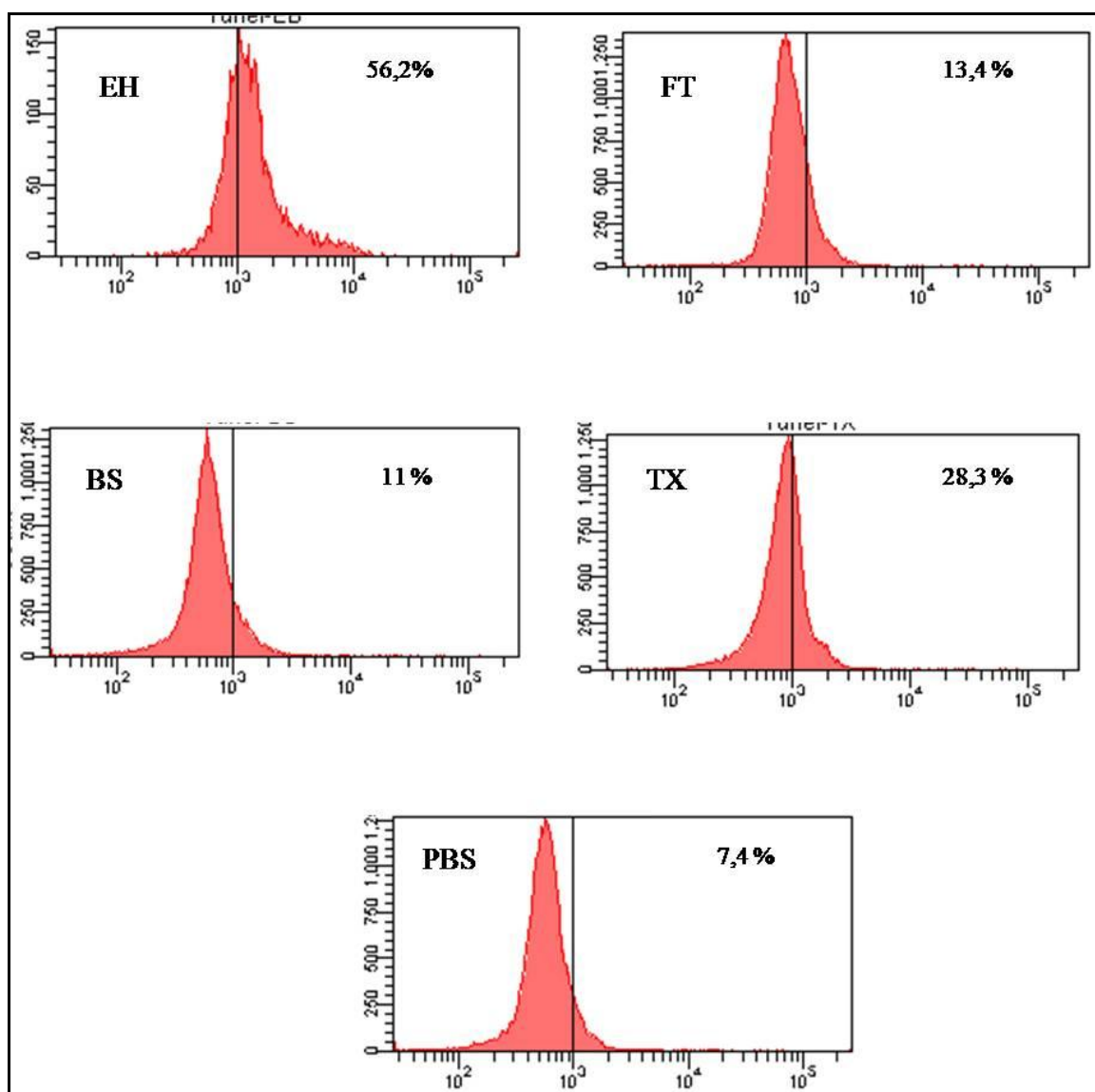


Figura 9: Porcentagem de células em apoptose no tumor de Ehrlich pelo teste de TUNEL. As células em apoptose foram incubadas por 24 hr na presença das substâncias testadas pela técnica de citometria de fluxo coradas com reagente de TUNEL e iodeto propídio. Histograma representativo de três experimentos EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β - sitosterol; TX: taxol; PBS: solução salina tamponada de fosfatos.

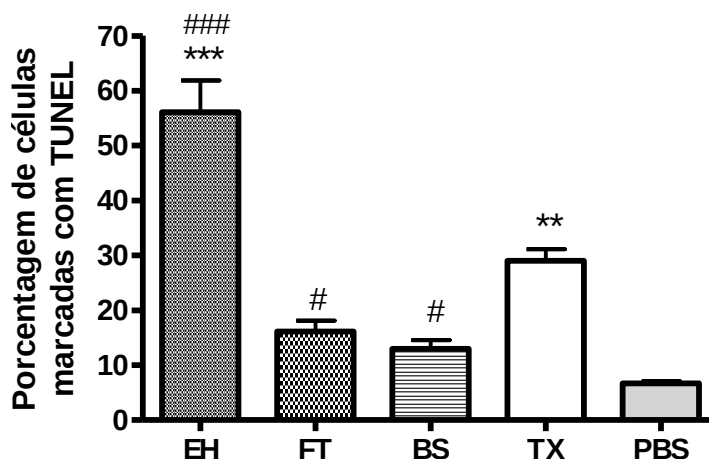


Figura 10: Porcentagem de células em apoptose no tumor de Ehrlich pelo teste de TUNEL.

As células em apoptose foram incubadas por 24 hr na presença das substâncias testadas pela técnica de citometria coradas com reagente de TUNEL e iodeto de propídio. Os resultados foram expressos com a média $\pm$ desvio-padrão de três ensaios realizados em triplicata. Como controle C- foi utilizado PBS. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β - sitosterol; TX: taxol; PBS: solução salina tamponada de fosfatos.

*** $p < 0,001$ quando comparada ao tratamento com controle.

** $p < 0,01$ quando comparada ao tratamento com controle.

$p < 0,001$ quando comparado ao Taxol.

4.4 Determinação da inibição de óxido nítrico (NO)

Em relação à atividade inibitória de NO em macrófagos peritoneais de camundongos portadores de tumor, podemos verificar inibição expressiva deste mediador imunológico, EH (98,15%), FT (62,98%), BS (38,80%) quando comparados com o controle positivo (LPS) e a droga padrão TX (10%) ($p < 0,001$ para EH e FT; $p < 0,05$ para BS). (Figura 11 e Tabela 6).

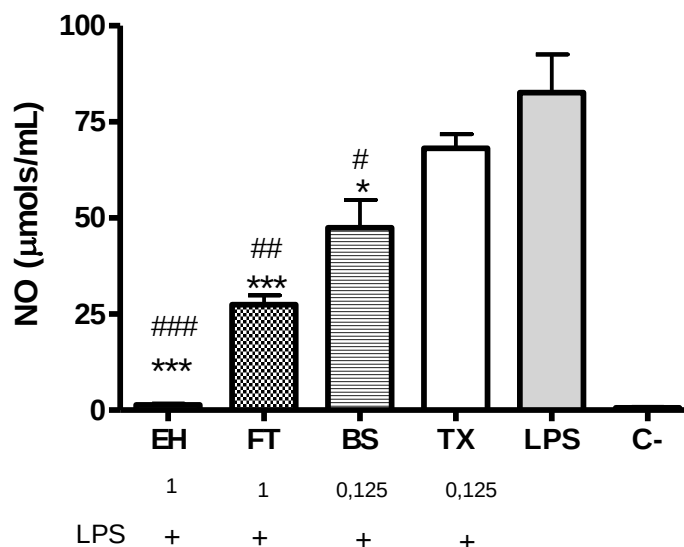


Figura 11: Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos as substâncias. Os macrófagos peritoneais foram incubados com concentração específica de cada composto + LPS (0,5 μg/mL), LPS (0,5 μg/mL- controle positivo) ou somente células (controle negativo), durante o período de 24 horas, em estufa de CO₂ a 37°C. Cada barra representa a média e desvio padrão de seis animais, sendo que cada determinação foi realizada em triplicata. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β- sitosterol; TX: taxol; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano C-: controle negativo.

***p<0,001 quando comparado ao LPS.

* p<0,05 quando comparado ao LPS.

p < 0,001 quando comparado ao Taxol.

p<0,01 quando comparado ao Taxol.

p<0,05 quando comparado ao Taxol.

Tabela 6. Produção de NO em macrófagos peritoneais ativados com LPS

<i>Tratamentos</i>	<i>NO (μmols/5x10⁵ células)</i>	<i>Inibição (%)</i>
<i>EH</i>	1,43 ± 1,11	98,15%
<i>FT</i>	28,69 ± 7,4	62,98%
<i>BS</i>	47,43 ± 16,18	38,80%
<i>TX</i>	69,61 ± 9,17	10%
<i>LPS</i>	66,99 ± 7,6	
<i>C -</i>	0,62 ± 0,55	

Avaliação após 24 horas de incubação. Cada valor representa a média ± desvio-padrão de experimento realizado com 06 animais em triplicata. Valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em μmols/5x10⁵células. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β- sitosterol; TX: taxol; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano C-: controle negativo.

4.5 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 EB (82,20%) apresentou uma intensa inibição deste mediador imunológico (Figura 12 e Tabela 7), seguido pela FT e BS, apesar de não apresentarem uma resposta tão proeminente, também apresentou importante atividade inibitória da produção de TNF- α com valores de 66,15% e 54,90%, respectivamente, quando comparados com o controle positivo (LPS) e a droga padrão (TX) ($p < 0,001$ para EH, FT e BS) Por outro lado, de maneira oposta aos derivados de *Q. grandiflora*, a droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de TNF- α pelos macrófagos peritoneais.

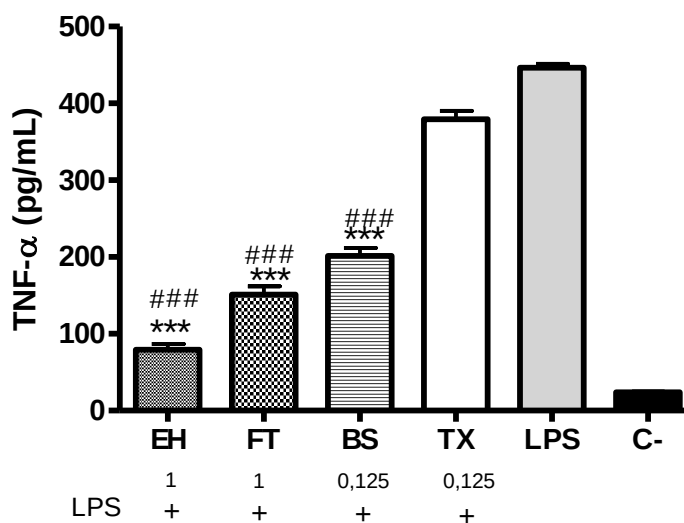


Figura 12: Inibição da produção de TNF- α em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos as substâncias. Os macrófagos peritoneais foram incubados com as diferentes concentrações dos compostos + LPS (0,5 μ g/mL), somente LPS (0,5 μ g/mL- controle positivo) ou somente células (controle negativo), durante o período de 24 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. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β - sitosterol; TX: taxol; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano C-: controle negativo.

*** $p < 0,001$ quando comparado ao LPS.

$p < 0,001$ quando comparado ao Taxol.

4.6 Determinação da inibição de IL-1

Na figura 13e tabela 7, referente à atividade inibitória da produção de IL-1 em macrófagos peritoneais de camundongos portadores de tumor, é possível notar que FT apresentou a maior inibição da produção desta citocina (73,51%). EH (33,19%) e BS (41,16%) apresentaram valores semelhantes de atividade inibitória desta citocina quando comparados com o LPS ($p<0,001$ para FT; $p<0,005$ para EH e BS) e quando comparada ao TX ($p<0,05$ para FT). A droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de IL-1 pelos macrófagos peritoneais estimulados com LPS.

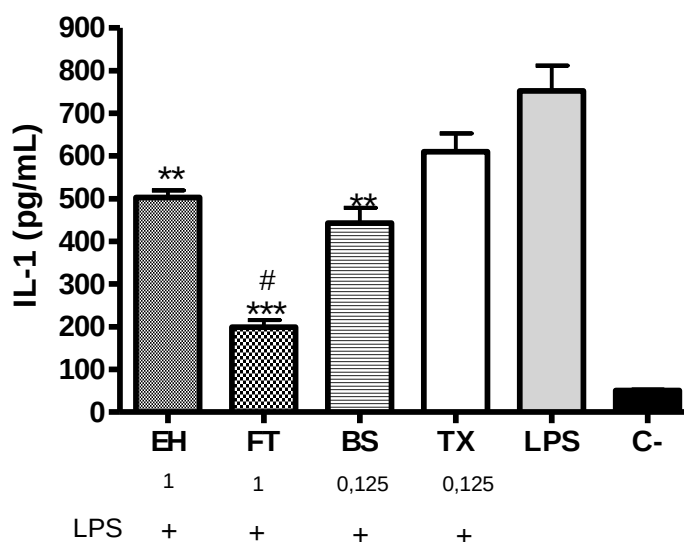


Figura 13: Inibição da produção de IL-1 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos as substâncias. Os macrófagos peritoneais foram incubados com as diferentes concentrações dos compostos + LPS (0,5 $\mu\text{g/mL}$), somente LPS (0,5 $\mu\text{g/mL}$ - controle positivo) ou somente células (controle negativo), durante o período de 24 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. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β - sitosterol; TX: taxol; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano C-: controle negativo.

*** $p<0,001$ quando comparado ao LPS.

** $p<0,01$ quando comparado ao LPS.

$p<0,05$ quando comparado ao Taxol.

4.7 Determinação da inibição de IL-12

Observando a figura 14 e tabela 7, podemos notar que todos os derivados de *Q. grandiflora* apresentaram grande atividade inibitória da produção de IL-12. Esta atividade foi de 78,95% (EH), 59,0% (FT) e 49,66 % (BS), quando comparados com o controle positivo (LPS) e a droga padrão (TX) ($p < 0,001$ para EH, FT e BS). Por outro lado, a droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de IL-12 pelos macrófagos peritoneais estimulados com LPS.

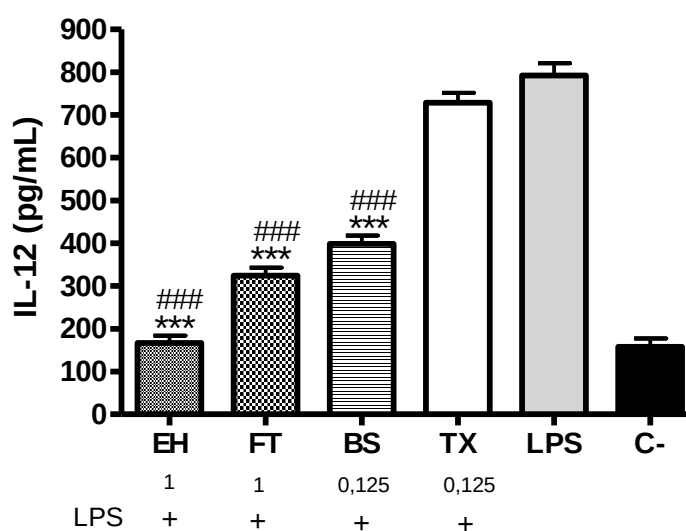


Figura 14: Inibição da produção de IL-12 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos as substâncias. Os macrófagos peritoneais foram incubados com as diferentes concentrações dos compostos + LPS (0,5 µg/mL), somente LPS (0,5 µg/mL- controle positivo) ou somente células (controle negativo), durante o período de 24 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. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β- sitosterol; TX: taxol; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano C-: controle negativo.

*** $p < 0,001$ quando comparado ao LPS.

$p < 0,001$ quando comparado ao Taxol.

4.8 Determinação da inibição de IL-6

De acordo com a figura 15 e tabela 7, foi possível observar que não houve inibição de níveis significativos de interleucina-6, quando comparados com o controle positivo (LPS) e com a droga padrão TX nas concentrações testadas.

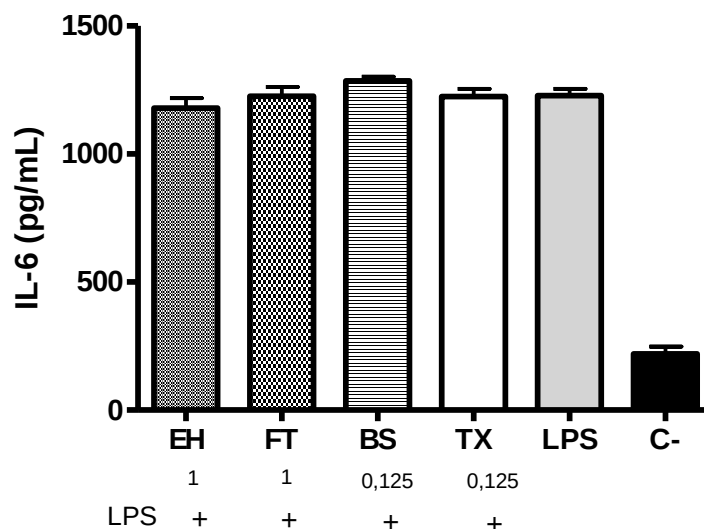


Figura 15: Inibição da produção de IL-6 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos as substâncias. Os macrófagos peritoneais foram incubados com as diferentes concentrações dos compostos + LPS (0,5 µg/mL), somente LPS (0,5 µg/mL- controle positivo) ou somente células (controle negativo), durante o período de 24 horas, em estufa de CO₂ a 37°C. Cada barra representa à média e desvio padrão de 06 animais portadores de tumor, sendo que cada determinação foi realizada em triplicata. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β- sitosterol; TX: taxol; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano C-: controle negativo.

De acordo com a dosagem de citocinas, foi possível calcular a porcentagem de inibição que cada uma apresenta quando comparada com o controle positivo (LPS) (Tabela 7).

Tabela 7. Produção de citocinas em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos ao EH, FT, BS e TX, concentrações expressa em pg/mL.

	TNF-α	IL-1β	IL-12	IL-6
<i>Extrato Hexânico</i> (1 mg/mL)	79.42 $\pm$ 15.19 (82,20%)	502.81 $\pm$ 28.14 (33,19%)	166.78 $\pm$ 30.16 (78,95%)	1234.9 $\pm$ 27.07 (0%)
<i>Fração Terpênica</i> (1 mg/mL)	151.07 $\pm$ 21.91 (66,15%)	199.34 $\pm$ 22.42 (73,51%)	324.31 $\pm$ 22.09 (59,0%)	1225.5 $\pm$ 22.01 (0%)
<i>β-sitosterol</i> (0.5 mg/mL)	201.29 $\pm$ 21.48 (54,90%)	442.81 $\pm$ 11.10 (41,16%)	398.93 $\pm$ 28.08 (49,66%)	1286.1 $\pm$ 28.51 (0%)
<i>Taxol</i> (0.5 mg/mL)	379.23 $\pm$ 21.12 (0%)	610.39 $\pm$ 34.01 (0%)	728.76 $\pm$ 15.30 (0%)	1208.0 $\pm$ 17.77 (0%)
<i>LPS</i>	446.40 $\pm$ 10.22	752.69 $\pm$ 19.42	792.57 $\pm$ 16.79	1176.9 $\pm$ 21.91
<i>C-</i>	23.78 $\pm$ 6.17	50.32 $\pm$ 6.17	157.98 $\pm$ 23.89	219.79 $\pm$ 13.92

Avaliação após 24 horas de incubação. Cada valor representa a média $\pm$ desvio-padrão. O valor entre parênteses é igual a porcentagem de inibição quando comparado ao controle LPS. O experimento foi realizado com seis animais em triplicata.

4.9 Determinação do volume tumoral

Os animais que foram tratados intratumoralmente com derivados de *Q. grandiflora*, EB ($91,44 \pm 0,34\%$), FT ($86,91 \pm 0,68\%$) tiveram maior inibição do crescimento tumoral em relação ao grupo que recebeu a droga padrão TX ($61,3 \pm 0,15\%$) ($p < 0,05$). O grupo tratado com BS ($45,13 \pm 0,37\%$) apresentou menor inibição quando comparada ao taxol, porém não apresenta uma diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (Figura 16).

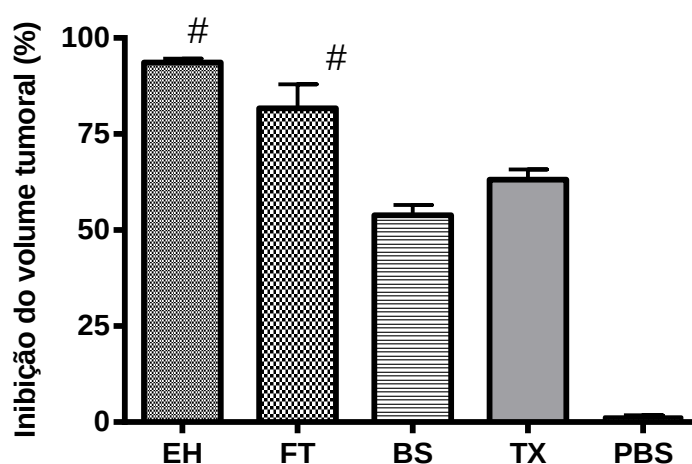


Figura 16: Inibição do crescimento tumoral de Ehrlich após os diferentes tratamentos. Os tumores dos animais foram extraídos ao término do tratamento, pesados e medidos para cálculo do volume tumoral. A partir destes resultados, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento tumoral de cada grupo tratado, sendo o grupo tratado com PBS equivalente a 0% de inibição. O valor foi expresso em média $\pm$ desvio padrão. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β -sitosterol; TX: taxol. Foram utilizados 5 animais/grupo.
$p < 0,05$ quando comparada ao tratamento TX.

4.10 Análise macroscópica e microscópica do tumor

A massa tumoral apresentou-se irregular, com superfície lisa e algumas vezes pequenas ondulações assim como ulcerações na pele, podendo crescer aderida ao músculo da pata traseira do animal ou de forma mais isolada em relação a este. A superfície de corte mostrou coloração esbranquiçada ou amarelada, com grande presença de vasos sanguíneos (Figura 17).

Microscopicamente, tanto nos animais dos grupos tratados com as substâncias como nos animais do grupo controle (tratados com PBS) o tumor apresentou crescimento exuberante da massa tumoral que invadiu o tecido conjuntivo, feixes musculares e anexos apresentando extensas áreas de necrose localizada na região central da massa tumoral (Figura 18), na periferia observou-se grande quantidade de vasos sanguíneos. A massa tumoral continha células atípicas com diferentes tamanhos celulares, diferentes tamanhos de núcleos, nucléolos evidentes e diferentes intensidades de coloração de citoplasma. No geral, apresentou elevado pleomorfismo celular, além de numerosas células mitóticas em diversas regiões (Figura 19). Apresentou também estroma escasso com pouca substância intercelular, assim como reação inflamatória moderada na derme papilar e infiltrado composto predominantemente por células mononucleares. Foram visualizadas células em padrões característicos de apoptose semelhantes aos padrões dessa neoplasia descritos por Guerra (1983), Dagli (1989) e Siva (2006).

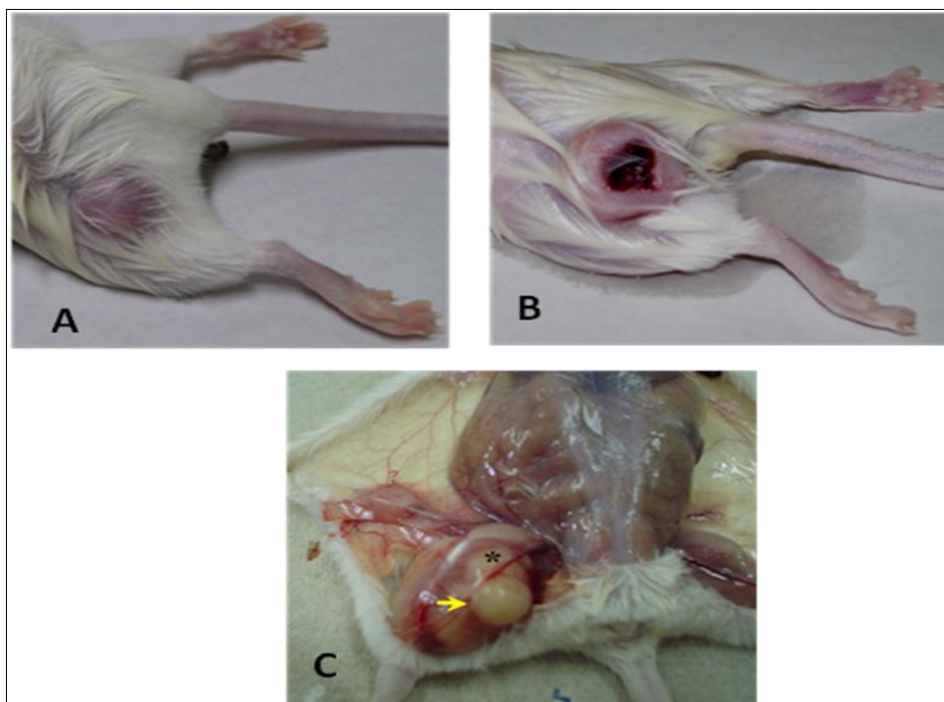


Figura 17: Análise Macroscópica do tumor de Ehrlich. Massa tumoral desenvolvida 30 dias após inoculação (A), mostrando ulceração na pele (B). Massa tumoral desenvolvida (*) com a presença de poplíteo (seta amarela) (C).

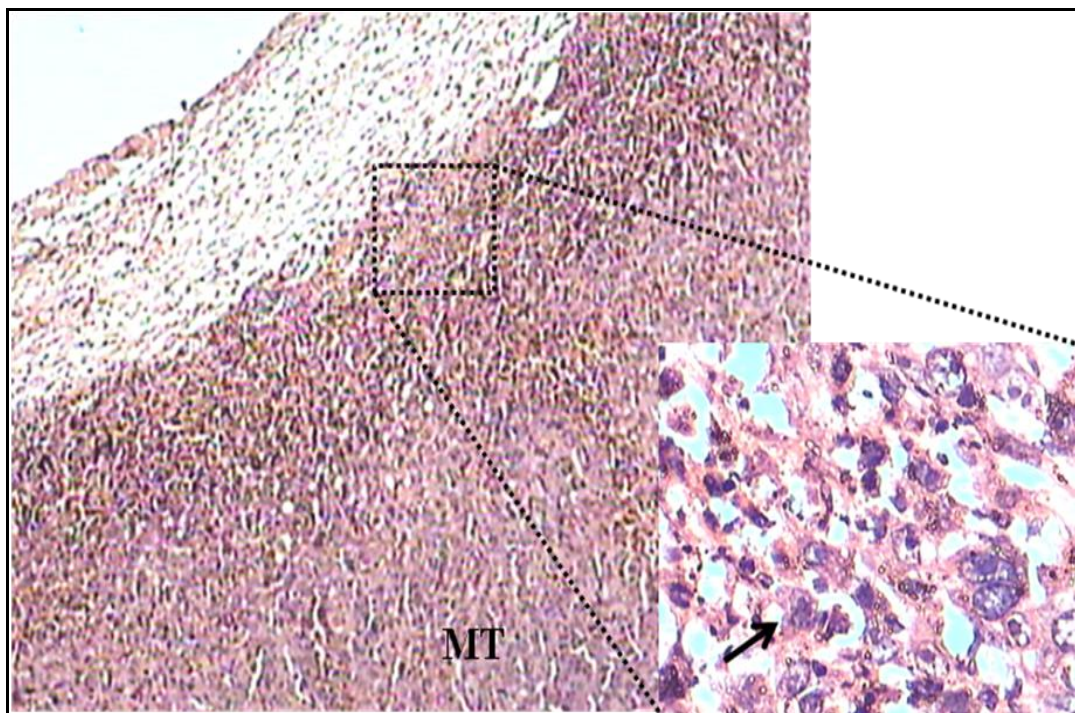


Figura 18: Microscopia do tumor de Ehrlich. Presença de uma vasta área de necrose na região central da massa tumoral (MT), células atípicas, com diferença no tamanho celular, dos núcleos e na intensidade de coloração do citoplasma (seta) em animal tratado com PBS. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) e observadas em microscópio óptico comum sob aumento de 400x.

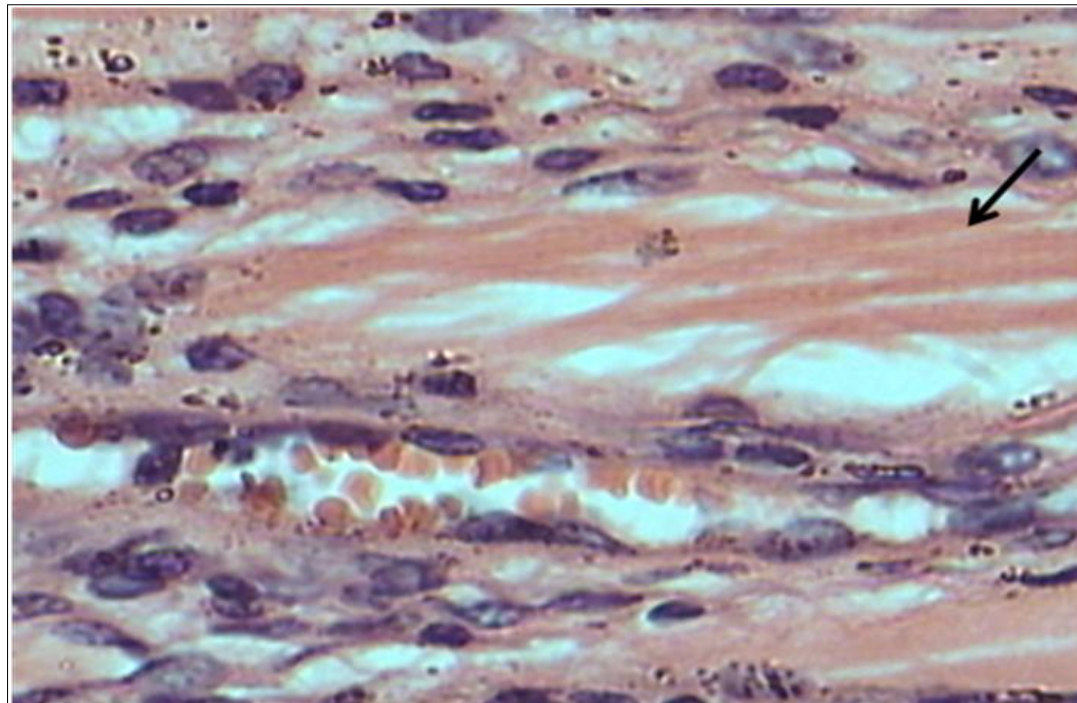


Figura 19: Análise microscópica do tumor de Ehrlich. Presença de infiltrado celular no feixe muscular (seta) em animal tratado com PBS. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) e observadas em microscópio óptico comum sob aumento de 400x.

4.11 Determinação de mitoses nos tumores

A quantidade de células em mitose em cada tumor (Figuras 20 e 21) foi comparada entre os grupos tratados, observando-se que os mesmos apresentaram menor quantidade de mitose /campo quando comparados com o tratamento com PBS ($3,96 \pm 1,75$) ($p < 0,01$ para EH; $p < 0,05$ para FT e BS). Em relação ao tratamento com EH ($0,55 \pm 0,24$) observou-se uma quantidade menor de mitoses/campo quando comparados ao tratamento com a droga padrão TX ($1,4 \pm 0,22$). O TX por sua vez, mostrou similar quantidade de mitoses/campo quando comparado ao tratamento com a FT ($1,58 \pm 0,38$) e uma quantidade menor quando comparado ao tratamento com BS ($2,66 \pm 0,28$). Porém não houve uma diferença estatística significativa entre o tratamento com as substâncias e a droga padrão (TX) ($p < 0,05$) (Tabela 8).

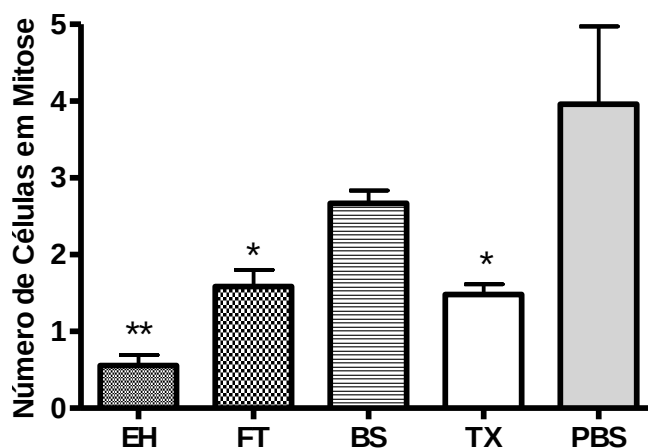


Figura 20: Quantidade de células em mitose nos tumores após os diferentes tratamentos.

As células em mitose foram contadas em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio-padrão, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β -sitosterol; TX: taxol; PBS: solução salina tamponada de fosfatos.

** $p < 0,01$ quando comparada ao tratamento com PBS.

* $p < 0,05$ quando comparada ao tratamento com PBS.

4.12 Determinação do grau de angiogênese nos tumores

Os resultados de angiogênese tumoral mostraram que não houve significativa diferença no grau de angiogênese dos tumores tratados com EH ($3,37 \pm 0,62$), FT ($6,50 \pm 1,22$) e BS ($8,36 \pm 2,47$) quando comparado com a droga padrão TX ($3,56 \pm 0,75$). No entanto quando os tratamentos foram comparados com o grupo tratado com solução salina tamponada de fosfatos (PBS) ($17,91 \pm 1,66$) observou-se significativa redução no grau de angiogênese ($p < 0,001$ para EH, FT e TX; $p < 0,01$ para BS). Vale ainda salientar que o EH mostrou-se eficaz tanto quanto a droga padrão utilizada no cálculo para determinação do grau da angiogênese (Figuras 22 e 23).

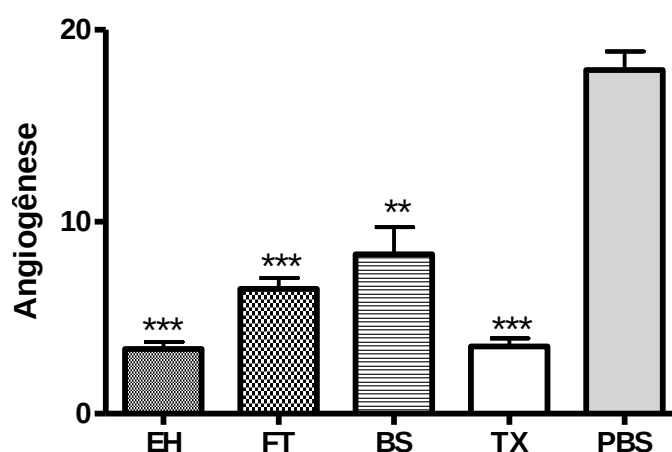


Figura 21: Angiogênese tumoral dos tumores após os diferentes tratamentos. A angiogênese foi determinada em lâminas coradas com hematoxilina e eosina através do Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia (MAGS). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio-padrão em valores arbitrários, obtidos de pelo menos 5 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 3 animais de cada grupo de estudo. EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β - sitosterol; TX: taxol; PBS: solução salina tamponada de fosfatos.

*** $p < 0,001$ quando comparada ao tratamento PBS.

** $p < 0,01$ quando comparada ao tratamento PBS.

Baseado nos testes descritos acima foi possível traçar parâmetros tumorais dos tumores avaliados após serem submetidos aos tratamentos propostos (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros tumorais após tratamento

<i>Tratamentos</i>	<i>Peso do tumor (g)</i>	<i>Volume (mm)</i>	<i>Inibição Tumoral (%)</i>	<i>Mitoses</i>	<i>Angiogênese</i>
<i>EB</i>	0,51 ± 0,34***	45,53***	91,44	0,55 ± 0,24***	3,37 ± 0,62***
<i>FT</i>	1,02 ± 0,68***	88,82***	86,91	1,58 ± 0,38***	6,50 ± 1,22***
<i>BS</i>	3,27 ± 0,37**	228,04***	45,13	2,66 ± 0,28**	8,36 ± 2,47***
<i>TX</i>	1,71 ± 0,15***	86,33***	71,3	1,4 ± 0,22***	3,56 ± 0,75***
<i>PBS</i>	5,9 ± 1,8	372,9	0	3,96 ± 1,75	17,91 ± 1,66

EH: extrato hexânico; FT: fração terpênica; BS: β- sitosterol; TX: taxol; PBS: solução salina tamponada de fosfatos.

*** p<0,001 quando comparada ao tratamento com PBS.

** p<0,01 quando comparada ao tratamento com PBS.

* p<0,05 quando comparada ao tratamento com PBS.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais.

Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo diversas áreas, portanto, pesquisas utilizando plantas medicinais devem ser incentivadas (BRITO & BRITO 1993; MARTÍNEZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; CONCEIÇÃO et al., 2012).

O presente estudo visa descobrir tratamentos alternativos contra o câncer de mama experimental, através de uma atividade mais seletiva e consequentemente menos agressiva aos pacientes. Desta forma, foram inicialmente realizados ensaios de determinação da atividade citotóxica *in vitro* de extrato hexânico (EH), fração terpênica (FT) extraídos de *Q. grandiflora* e a substância isolada β -sitosterol (BS) além da droga padrão Taxol® (Paclitaxel- TX). Isto porque, para que uma droga seja classificada como seletiva, é necessário que a mesma possua pouco ou nenhum efeito citotóxico contra células normais, 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).

Sendo assim, representados na Figura 2 e Tabela 1, observamos que EH possui alta seletividade *in vitro*, uma vez que, na concentração de 1mg/mL, praticamente não apresentou atividade tóxica contra os macrófagos ($93,58 \pm 5,98\%$ de viabilidade), porém, extrema atividade contra a célula tumoral ($1,71 \pm 1,38\%$ de viabilidade). Mesmo em concentrações mais baixas, EH apresenta baixa toxicidade para as células imunológicas, com importante atividade citotóxica. Um exemplo disto é a toxicidade do EH na concentração de 0,25 e 0,125mg/mL, que para os macrófagos apresentaram viabilidade de 100% , enquanto que as células tumorais demonstraram-se mais vulneráveis, com viabilidade de $15,85 \pm 4,66\%$ e $35,47 \pm 8,56\%$ respectivamente. Com base nestas informações, a concentração 1mg/mL foi selecionada para o tratamento intratumoral dos animais portadores de tumor, uma vez que apresenta atividade citotóxica seletiva à linhagem tumoral de Ehrlich.

De maneira semelhante ao EH, notamos que a FT apresentou maior toxicidade frente às células imunológicas, mas por outro lado apresenta grande citotoxicidade às células tumorais. Fato este observado na Figura 3, Tabela 2, na concentração de 2 e 1mg/mL, onde macrófagos apresentaram $76,73 \pm 4,90\%$ e $75,27 \pm 2,78\%$ de viabilidade, respectivamente, enquanto a célula tumoral de Ehrlich apresenta uma viabilidade de 36,30% e 35,56% respectivamente. Desta maneira, a concentração de 1mg/mL foi selecionada aos tratamentos intratumorais com FT, uma vez que apresenta baixa toxicidade aos macrófagos ($75,27 \pm 2,78\%$ de viabilidade) e citotoxicidade moderada ($35,56 \pm 3,78\%$) à linhagem tumoral testada.

Foi possível observar que em relação ao BS este apresentou maior toxicidade às células imunes, quando comparada ao EH (Figura 4, Tabela 3). No entanto, esta citotoxicidade refere-se apenas aos macrófagos, nas concentrações mais elevada (2 e 1mg/mL), apresentando viabilidade de $44,81 \pm 3,90\%$ e $49,13 \pm 4,44\%$

respectivamente. No entanto, a partir de 0,125 mg/mL, notamos que a substância perde a toxicidade às células imunológicas ($63,38 \pm 8,90\%$ de viabilidade), mantendo parte de sua atividade citotóxica as células tumorais de Ehrlich ($54,12 \pm 6,78\%$ de viabilidade). Sendo assim, esta foi a concentração de escolha para o tratamento dos animais portadores de tumor.

Como droga padrão, foi utilizado neste estudo o Paclitaxel (Taxol® – TX), uma droga isolada inicialmente a partir da árvore *Taxus brevifolia*, amplamente utilizada no tratamento de diversos tipos de cânceres, entre eles o de mama, sarcoma de Kaposi, bem como câncer de cabeça e pescoço, bexiga, esôfago, colo do útero e endométrio (CESCA et al., 2009; VICARI et al., 2010; LICHTMAN et al., 2012). Os resultados mostraram (Figura 5, Tabela 4) que a droga apresenta grande citotoxicidade aos macrófagos (viabilidade variando de $22,87 \pm 3,94\%$ a 100%) e moderada toxicidade às células tumorais de Ehrlich variando de $28,42 \pm 3,2\%$ a $68,23 \pm 1,25\%$. Desta maneira, a concentração 0,125mg/mL foi eleita para o tratamento dos animais portadores de tumor considerando a baixa toxicidade frente às células imune ($78,76 \pm 7,91\%$) e moderada citotoxicidade frente as células tumorais de Ehrlich ($46,32 \pm 2,36\%$).

Mesmo o TX apresentando pouca citotoxicidade *in vitro* às células imunológicas nas concentrações mais baixas (0,0625 mg/mL – 100% de viabilidade), não foram observados um efeito promissor em relação a toxicidade do TX frente as células tumorais de Ehrlich (0,0625 mg/mL – $68,23 \pm 1,25\%$ de viabilidade), na mesma concentração. Assim sendo, estes resultados quando comparados aos derivados de *Q. grandiflora* foram mais expressivos, uma vez que, EH na concentração de 2mg/mL promoveu uma elevada morte das células tumorais de Ehrlich (98,41%), enquanto que o

efeito máximo de TX, nas concentrações testadas foi de 63,7% de morte celular nesse modelo de câncer de mama experimental.

O desenvolvimento de medicamentos antitumorais a partir de produtos naturais vem recebendo grande importância em todo o mundo devido principalmente aos efeitos colaterais reduzidos que estes provocam. Uma variedade de plantas vem sendo utilizada com sucesso no tratamento do câncer de mama, como é o caso da *Broussonetia papyrifera* que apresentou uma potente inibição do crescimento de células do câncer da mama (SK-BR3) inibindo o receptor de estrógeno (GUO et al., 2013). O extrato metanólico do pericarpo *Pistacia atlantica* apresenta elevada atividade antioxidante e possui a capacidade de interromper a proliferação e induzir a apoptose em células de câncer de mama humanas T47D (REZAEI et al., 2012).

Pesquisas demonstram também, que o extrato metanólico de *Marrubium persicum* inibiu o crescimento de células de câncer de mama humano da linhagem MCF-7, onde o efeito da citotoxicidade foi observado em uma dose de 200 µg/ml de concentração do extrato vegetal (HAMEDEYAZDAN et al., 2012).

Um aspecto importante a ser avaliado na evolução de tumores vem a ser a capacidade deste em induzir metástases. Para que a metástase tumoral se desenvolva, processos moleculares são essenciais como a angiogênese e a ação de vários fatores de crescimento. Portanto, a inibição do processo de angiogênese e da proliferação celular tem se tornado uma das alternativas terapêuticas no combate às metástases tumorais. Em estudos recentes foi avaliado o poder da Brucina, um alcaloide extraído da planta *Strychnos nux-vomica* quanto a sua ação anti-angiogênica pela inibição de VEGFR2 (SARASWAT & AGRAWAL, 2013). Também foi observada a influência na progressão tumoral e processos angiogênicos da planta *Sanguisorba officinalis* sobre as linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-23, onde se encontrou uma redução

da angiogênese pela inibição da expressão de VEGF em ambas as linhagens (WANG et al., 2012).

Sendo assim, foi realizado também ensaios para a determinação de VEGF, que exerce funções críticas na angiogênese fisiológica e patológica e na linfangiogênese, sendo um importante mitógeno que atua através de sua ligação a receptores específicos do tipo tirosina quinase (RTK), promovendo uma cascata de eventos intracelulares, que incluem a proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial, favorecendo a formação de novos vasos e consequente metástase tumoral (DVORAK, 2002; CAPP et al., 2009).

Os resultados para dosagem de VEGF nas células tumorais de Ehrlich mostram que os componentes de *Q. grandiflora* EH, FT e BS não apresentaram uma produção significativa desta proteína ($5000,3 \pm 8,39$ pg/mL; $5000,9 \pm 6,34$ pg/mL; $5000,6 \pm 2,42$ pg/mL) respectivamente, quando comparada com o controle negativo ($2000,8 \pm 5,23$ pg/mL), porém apresentaram uma diferença significativa quando comparadas a droga padrão TX ($p < 0,05$). O TX apresentou uma produção equivalente a $17000,5 \pm 3,25$ pg/mL de VEGF pelas células tumorais de Ehrlich, quando comparado ao controle negativo ($p < 0,01$) (Figura 6 e Tabela 5), o que demonstra um provável efeito antiangiogênico das substâncias testadas, em oposto ao TX, e, portanto possível contenção tumoral pela inibição de metástases.

Outro aspecto que foi avaliado no presente estudo foi à capacidade das substâncias de provocar apoptose nas células tumorais de Ehrlich pelas técnicas de anexina V e tunel. Foi observada maior quantidade de células em estágio apoptótico nos animais que receberam o tratamento com EH ($73,9 \pm 0,98$ %), quando comparados com o controle PBS ($20,0 \pm 1,78$ %) e a droga padrão utilizada TX ($40,7 \pm 1,98$ %) para

anexina V e ($56,2 \pm 1,98\%$; $7,4 \pm 0,74\%$; $28,3 \pm 0,74\%$) para técnica do TUNEL respectivamente (Figuras 6, 7, 8 e 9).

Em relação à FT ($25,8 \pm 2,1\%$) e ao BS ($28,5 \pm 2,7\%$), ambos apresentaram menor quantidade de células em apoptose quando comparados ao TX ($40,7 \pm 1,98\%$) no caso da anexina V. Para técnica de TUNEL observou-se o mesmo padrão de apoptose, onde a FT ($13,4 \pm 2,64\%$) assim como o BS ($11,0 \pm 3,65\%$) apresentaram uma quantidade menor de células apoptóticas quando comparada à droga padrão TX ($28,3 \pm 0,74\%$) (Figuras 6, 7, 8 e 9).

Atualmente a maior parte dos quimioterápicos são genotóxicos, produzindo dano ao DNA e mutações, que podem induzir a formação de outras células neoplásicas. Os princípios ativos mais procurados são aqueles que induzem a apoptose, levando apenas células malignas à morte (SUBHASHINI et al., 2005). Substâncias isoladas a partir planta *Tanacetum parthenium* induziram apoptose em células de linhagem tumoral de mama humana MCF-7 (WYREBSKA et al., 2013), assim como extratos isolados de *Convolvulus galaticus*, *Crocus antalyensis* e *Lilium candidum* apresentam efeito citotóxico frente a esta linhagem pela indução da apoptose mediada por p53 (TOKGUN et al., 2013).

Foram também realizados testes para avaliar o efeito imunomodulatório das substâncias sobre o sistema imunológico de animais portadores de tumor de Ehrlich. Assim, nos resultados referentes à inibição de NO, quando comparados ao LPS, podemos verificar que os constituintes EH e FT obtidas de *Q. grandiflora* e apresentaram uma expressiva inibição deste mediador ($98,15\%$ e $62,98\%$, respectivamente) (Figura 11 e Tabela 6). BS, apesar de não apresentar uma resposta tão expressiva, apresentou uma atividade inibitória mediana da produção de NO com valor

de 38,80%. Por outro lado a droga padrão TX apresentou reduzida inibição da produção deste mediador (10%) pelos macrófagos peritoneais.

Diversos estudos comprovam que a inflamação é um componente crítico na indução de tumores. Vários tipos de câncer originam-se de sítios de infecção, irritação crônica ou inflamação, tornando-se claro que o microambiente tumoral, que é orquestrado pelas células inflamatórias, é um participante indispensável no processo neoplásico (COUSSENS & WERB, 2002). Sendo assim espera-se que substâncias anti-inflamatórias exerçam efeitos quimiopreventivos sobre a carcinogênese (SURH et al., 2001).

De maneira semelhante, a atividade inibitória da produção de TNF- α , demonstrou que EH (82,20%) apresentou grande inibição deste mediador imunológico (Figura 12). FT e BS, apesar de não apresentarem uma resposta tão proeminente, também apresentaram importante atividade inibitória da produção de TNF- α com valores de 66,15% e 54,90%, respectivamente, sendo a citocina mais inibida pelas amostras testadas. A droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de TNF- α pelos macrófagos peritoneais (Figura 12 e Tabela 7).

Referente à atividade inibitória da produção de IL-1 em macrófagos peritoneais de camundongos portadores de tumor de Ehrlich, é possível notar que FT apresentou a maior inibição da produção desta citocina (73,51%), enquanto que EH (33,19%) e BS (49,66%) apresentaram valores semelhantes de atividade inibitória desta citocina quando comparados com o controle positivo LPS. 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 (Figura 13 e Tabela 7)

Na determinação da inibição de IL-12 (Figura 14 e Tabela 7), todos os derivados de *Q. grandiflora* apresentaram grande atividade inibitória da produção desta citocina: EH (78,59%), seguido pela FT e BS (59% e 49,66% respectivamente). Por outro lado, a droga padrão TX não apresentou nenhum efeito (0%) sobre a inibição da produção de IL-12 pelos macrófagos peritoneais estimulados com LPS (Figura 14 e Tabela 7).

Na figura 15 e tabela 7, podemos verificar que não houve a inibição desta IL-6 pelos macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS, quando comparados com o controle positivo.

Desta maneira, baseados nos resultados dos mediadores imunológicos, podemos concluir que os derivados de *Q. grandiflora* apresentam características anti-inflamatórias sobre os macrófagos e com isso favorecem a contenção tumoral. Isto porque a liberação excessiva de NO, TNF- α , IL-1 e IL-12 no microambiente tumoral são consideradas prejudiciais à contenção do tumor uma vez que vários estudos mostram seu efeito no aumento da vascularização tumoral e consequente metástase além de outros mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral (AMBS & 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- α ter sido documentado como um mediador antitumoral, estudos mais recentes vêm mostrando que esta molécula é um dos principais mediadores da inflamação relacionada ao câncer e age como fator promotor de tumor (WU & ZHOU, 2010).

A produção de IL-1 também está relacionada ao desenvolvimento do tumor 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).

Outros estudos correlacionam que a ação anti-inflamatória da IL-6 é mediada por meio de seus efeitos inibidores de TNF- α e IL-1, uma vez que esta pode apresentar tanto uma atividade pro como anti-inflamatória dependendo do seu sítio de ação (KUSHNER, 1998).

Por outro lado, em relação à produção de IL-12, esta, não está diretamente relacionada à progressão tumoral, mas sim com a produção de NO, portanto, a modulação desta citocina é importante na contenção tumoral, uma vez que irá modular a liberação do óxido nítrico (TRINCHIERI & SCOTT, 1998; KITAURA et al., 2011).

Baseados nos testes *in vitro* que demonstraram uma possível atividade antitumoral e anti-inflamatória das substâncias testadas, procedeu-se aos estudos *in vivo*. Por meio do teste de MTT, escolheu-se a concentração adequada de cada tratamento. Foi iniciado assim o processo de implantação do tumor e tratamento intratumoral dos mesmos de acordo com o protocolo previamente estabelecido. Ao término dos tratamentos, os animais foram sacrificados para que os tumores pudessem ser extraídos, pesados e medidos.

A partir destas aferições foram determinados os valores de inibição do crescimento tumoral que demonstraram uma promissora atividade antitumoral *in vivo* dos componentes de *Q. grandiflora*, principalmente EH e FT. Os animais dos grupos que receberam o tratamento com EH ($91,44 \pm 0,34\%$) e FT ($86,91 \pm 0,68\%$) tiveram uma maior taxa de inibição do crescimento tumoral (Figura 16) em relação ao grupo que

recebeu a droga padrão TX ($61,3 \pm 0,15\%$), quando comparados ao grupo controle tratado com salina (PBS). Já o componente isolado BS ($45,13 \pm 0,37\%$) demonstrou uma atividade inibitória semelhante à droga padrão em estudo, contudo não apresentou uma diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (Figura 16 e Tabela 8). Estudos semelhantes demonstraram que o extrato metanólico da planta *Citrus maxima* inibiu o crescimento de células tumorais de Ehrlich, indicando uma potencial atividade antitumoral (KUNDUSEN et al., 2011).

Outro estudo similar mostrou que os extratos de *Plectranthus barbatus*, apresentaram importante atividade *in vivo* de extratos de folhas da espécie, contra tumor ascítico de Ehrlich em camundongos (ZELNIK et al., 1977) assim como o extrato metanólico de sua raiz que inibiu o crescimento do sarcoma 180, na ordem de 53% de inibição (COSTA, 2006).

Ao término do tratamento dos tumores, os mesmos foram retirados com auxílio de bisturi e realizadas as análises macro e microscópicas. A massa tumoral apresentou-se irregular, com superfície lisa e algumas vezes pequena ondulações assim como ulcerações na pele, podendo crescer aderida ao músculo da pata traseira do animal ou de forma mais isolada em relação a este. A superfície de corte mostrou coloração esbranquiçada ou amarelada, com grande presença de vasos sanguíneos (Figura 17).

Microscopicamente o tumor apresentou crescimento exuberante da massa tumoral com células intensamente pleomórficas e anaplásicas, relação núcleo-citoplasma elevada, núcleo com cromatina frouxa e nucléolos proeminentes, além de numerosas figuras mitóticas em diversas regiões. Apresentou também reação inflamatória moderada na derme papilar e infiltrado composto predominantemente por células mononucleares (Figuras 18 e 19).

Foi possível também observarmos por meio dos cortes histológicos corados

com eosina/hematoxilina a quantidade de mitoses nos animais de todos os grupos experimentais, notou-se que o grupo tratado com EH ($0,55 \pm 0,24$) apresenta menor quantidade de mitose por campo quando comparados à droga padrão TX ($1,4 \pm 0,22$) e ao controle PBS ($3,96 \pm 1,75$). Em relação ao tratamento com FT e BS estes apresentaram resultados similares à droga padrão em estudo ($1,58 \pm 0,38$ e $2,66 \pm 0,28$, respectivamente) (Figura 20 e Tabela 8). Todos os tratamentos mostraram-se diferentes estatisticamente do controle PBS, porém não houve uma diferença estatística entre a droga padrão TX e os tratamentos realizados ($p > 0,05$), o que significa que TX no modelo experimental de Ehrlich é mais uma vez inferior/similar quando comparado aos derivados de *Q. grandiflora*.

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 influencia o processo mitótico de células tumorais (ROMANO et AL., 2011).

Na análise do grau de angiogênese tumoral (Figura 21 e Tabela 8), não houve diferença na neoformação de vasos entre os animais do grupo TX ($3,56 \pm 0,75$) e aqueles que foram tratados com EH ($3,37 \pm 0,62$), FT ($6,50 \pm 1,22$) e BS ($8,36 \pm 2,47$) de *Q. multiflora*. No entanto, quando comparados ao controle PBS ($17,91 \pm 1,60$) apresentaram significativa redução no grau da angiogênese ($p < 0,001$ para EH, FT e TX; $p < 0,01$ para BS).

Apesar de representarem um campo de pesquisas relativamente novo, os produtos naturais obtidos de plantas constitui uma rica e promissora fonte de novas

moléculas com propriedades antitumoral e anti-inflamatórias. Através dos resultados obtidos foi possível observar em ordem decrescente que o extrato hexânico, fração terpênica extraídos de *Q. grandiflora*, assim como o β -sitosterol possuem efeitos antitumorais relacionados com os parâmetros tumorais avaliados no estudo e também elevada toxicidade frente às células tumorais de Ehrlich. Além dos bons resultados obtidos através do tratamento intratumoral do tumor sólido de Ehrlich, 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 apresenta pouca ou nenhuma atividade inibitória da produção destes mediadores envolvidos na progressão tumoral.

Os resultados encontrados nesse estudo abrem novas perspectivas na busca alternativa de tratamento do câncer de mama, sendo assim mais pesquisas sobre os efeitos *in vivo* desta planta devem ser incentivadas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permite concluirmos:

- EH, FT, BS e TX possuem excelente atividade seletiva citotóxica à linhagem tumoral de Ehrlich, com menor citotoxicidade aos macrófagos.
- EH seguido da FT possuem importante atividade inibitória do crescimento celular, superiores ao TX.
- EH apresenta os melhores resultados, entre as demais substâncias testadas de *Q. grandiflora* em todos os testes realizados.
- Em relação à produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), a droga padrão TX, foi a única a produzir tal mediador. Por outro lado as substâncias obtidas da planta podem contribuir para a inibição da angiogênese.

- EH, FT e BS apresentaram grande inibição da produção dos mediadores inflamatórios 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-se inferior ou similar aos derivados de *Q. grandiflora* no modelo experimental de Ehrlich.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p.23; 236; 240; 276; 282; 301-302.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado Espécies Vegetais Úteis**. Planatina: Embrapa, 1998. p.464.

AMBS, S.; GLYNN, S.A. Candidate pathways linking inducible nitric oxide synthase to a basal-like transcription pattern and tumor progression in human breast cancer. **Cell Cycle**. v.10, p.619-624, 2011.

BATES, D.O.; CUI, T.G.; DOUGHTY, J.M.; WINKLER, M.; SUGIONO, M.; SHIELDS, J.D.; PEAT, D.; GILLATT, D.; HARPER, S.J. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is downregulated in renal cell carcinoma. **Cancer Res**. v. 62, p.4123 – 4131, 2002.

BOERSMA, H. H.; KIETTSCLAER, B. L. J. H.; STOLK, L.M. L.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G. A. K.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **J. Nucl. Med.**, v. 46, n. 12, p. 2035-2050, 2005.

BREM, S.; COTRAN, R.; FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histological grading. **J Natl Cancer Inst**, v. 48, p. 347–561, 1972.

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

BRUMATTI, G.; SHERIDAN, C.; MARTIN, S. J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*, v. 44, p. 235-240, 2008.

BUNDSCHERER, A.; MALSY, M.; LANGE, R.; HOFMANN, P.; METTERLEIN, T.; GRAF, B.M.; GRUBER, M. Cell harvesting method influences results of apoptosis analysis by annexin v staining. *Anticancer Res.* v.33, p.3201-3204, 2013.

CAPP, C.; ZENNING, N.; WAJNER, S.; MAIA, A.L. The role of vascular endothelial growth factor in tumor. *HCPA.* v.29, p.51-59, 2009.

CARLI, C.B.A.; QUILLES, M.B.; VILEGAS, W.; CARLOS, I.Z. The role of *Qualea multiflora* on Mammary Tumour Cells and Immune System. *J. A. Pharm. Science.* v.3, p.xxx-xxx, 2013.

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.

CASALE, T.B.; COSTA, J.J.; GALLI, S.J. TNFalpha is important in human lung allergic reactions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v.15,p. 35-44, 1996.

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.

COCA, S.; PEREZ-PIQUERAS, J.; MARTINEZ, D.; COLMENAREJO, A.; SAEZ, M.A.; VALLEJO, C.; JOSE, A.; MARTOS, M.D.; MORENO, M.M.D. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. **Cancer**. v. 79, p. 2320-2328, 1997.

COLOMBO, M.P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.13, p. 155-168, 2002.

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.

COSTA, M.C.C.D. Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.8, p.81-88, 2006.

CHAMMAS, M.C.; GERHARD, R.; OLIVEIRA, I.R.S.; WIDMAN, A.; BARROS, N.; DU-RAZZO, M. Thyroid nodules: evaluation with power Doppler and duplex Doppler ultrasound. **Otol. H. Neck. Surg.**, v.132, p. 874-882, 2005.

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.; HUMMERSON, 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.

CHOUGULE, R.A.P.S.; SALIMATH, B.P.; SOSALEGOWDA, A.H. Buffalo Colostrum β -lactoglobulin Inhibits VEGF-Induced Angiogenesis by Interacting with G protein-Coupled Receptor Kinase. **Bull Exp Biol Med.** V.54, p.686-691, 2013.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental.** São Paulo, 1989. 148p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.

DAWE, C.J. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J.F. and FREI III, E. **Cancer medicine**. 2. ed. Philadelphia : Lea and Febiger, 1982. p. 209.

DEBATIN KM. Apoptosis pathways in cancer and câncer therapy. **Cancer Immunol Immunother**. V. 53, p.153-59, 2004.

DENARDO, D.G.; COUSSENS, L.M. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v.9, s/p, 2007.

DONG, Y.; TANG, D.; ZHANG, N.; LI, Y.; ZHANG, C.; LI, L.; LI, M. Phytochemicals and biological studies of plants in genus Hedysarum. **Chem Cent J**. v.18, p.124-129, 2013.

DOUKAS, J.; ROLLAND, A. A Mechanisms of action underlying the immunotherapeutic activity of Allovectin in advanced melanoma. **Cancer Gene Ther**., v. 19, p. 811-817, 2012.

DVORAK HF. Vascular permeability factor/vascular endotelial grouwth factor: a critical cytokine in tumour angiogenesis and a potencial target for diagnosis and therapy. **J Clin Oncol**.v.20, p.4368-4380, 2002.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of essential oils and

extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **J. of Etnopharmacol.** v. 97, p.305-311, 2005.

DUBIN, P. J.; MARTZ, A.; EISENSTATT, J.R.; FOX, M. D.; LOGAR, A.; KOLLS, J. K. Interleukin-23-Mediated Inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection. **Infect. Immun. January.** v. 80, p. 398-409, 2012.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mauseumoren. **Berl. Klin. Wschr.**, v.28, p.871-874, 1905.

FARBER, E. The multistep nature of cancer development. **Canc. Resear.**, v.44, p.4217-4223, 1984.

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.

FALKOFF, R. J.; MURAGUCHI, A.; HONG, J. X.; BUTLER, J. L.; DINARELLO, C. A.; FAUCI A S. The effects of interleukin 1 on human B cell activation and proliferation. **The J. of Immunol.**, v. 131, p. 2801-2805, 1983.

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.

GALDIERO, M.R.; BONAVITA, E.; BARAJON, I.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A.; JAILLON S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. **Immunobiology**. 2013 (*in press*).

GASPI, F.O.G.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; MORENOC, R.A. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. **J. of Ethnoph.** v. 107, p. 219–24, 2006.

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.**, v. 114, p. 827-835, 2012.

GORCZYCA, W.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. **Cancer Res**, v. 53, n. 8, p. 1945-1951, 1993.

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

GUERRA, J.L. **Aspecto do processo inflamatório em camundongos portadores de tumor de Ehrlich**. São Paulo, 1983. 79p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.

GUO, M.; WANG, M.; ZHANG, X.; DENG, H.; WANG, Z.Y. Brousoflavonol B restricts growth of ER-negative breast cancer stem-like cells. **Daru**.v. 101, p.21-28, 2012.

HAHN, W.C AND WEINBERG, R.A. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nat. Rev. Cancer**., v. 2, p. 331–341, 2002.

HAMEDEYAZDAN, S.; FATHIAZAD, F.; SHARIFI, S.; NAZEMIYEH, H. Antiproliferative activity of Marrubium persicum extract in the MCF-7 human breast cancer cell line. **Asian. Pac. J. Cancer Prev**. v.13, p. 5843-5848, 2012.

HERSCH-MARTÍNEZ, P. Medicinal plants and regional traders in Mexico: physiographic differences and conservational challenge. **Econ. Botan**. v.51, p. 107-120, 1997.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L.M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. **J. Clin. Oncol**. v. 23, p. 1011-1027, 2005.

HIRUMA-LIMA, C. A.; CALVO, T. R.; RODRIGUES, C. M.; ANDRADE, F.D.P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **J. of Ethnopharmacol**. v. 104, p.215–224, 2006.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa da Incidência de Câncer para 2013 no Brasil.** Disponível no site: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>; acesso Em 13/08/2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa da Incidência de Câncer para 2009 no Brasil e nas cinco Regiões.** Disponível no site: “http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=1793”; acesso em 10/08/2013.

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.

ISHIGAMI, S.; NATSUGOE, S.; TOKUDA, K.; NAKAJO, A.; XIANGMING, C.; IWASHIGE, H.; ARIDOME, K.; HOKITA, S.; AIKOU, T.. Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer. **Cancer Lett.** v.8, p.159:103, 2000.

ISLAM, K.; ALI, S.M.; JESMIN, M.; KHANAM, J.A. *In vivo* Anticancer Activities of Benzophenone Semicarbazone against Ehrlich Ascites Carcinoma Cells in Swiss Albino Mice. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.13, p.155-168, 2002.

ISRILIDES, C.; KLETSAS, D.; ARAPOGLOU, D.; PHILIPPOUSSIS, A.; PRATSINIS, H.; EBRINGEROVA, A.; HRIBALOVA, V.; HARDING, S.E. In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. **Phytomedicine**, v.15, p.512–519, 2008.

JOKE, M.M.; KRAAL G. Innate Immune Functions of Macrophage Subpopulations in the Spleen. **J. Innate Immun.** v. 4. p. 437–445, 2012.

KAR, B.; KUMAR, R.B.; BALA, A.; DOLAI, N.; MAZUMDER, U.K.; HALDAR, P.K. Evaluation of Antitumor Activity of *Mimusops elengi* Leaves on Ehrlich's Ascites Carcinoma-Treated Mice. **J Diet Suppl.** V. 3, p.166-77, 2012.

KARIN M, GRETEN FR, NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 749-59, 2005.

KITAURA, H.; AONUMA, T.; FUKUMOTO, E.; KIMURA, K.; FUJII, T.; HAKAMI, Z. W.; TAKANO-YAMAMOT, T. IL-12-mediated and IL-18-mediated nitric oxide-induced apoptosis of adherent bone marrow cells in TNF- α -induced osteoclast formation. **Calcif. Tissue. Int.** v. 4, p.125-127, 2011.

KLIMP, A.H.; HOLLEMA, H.; KEMPINGA, C.; VAN DER ZEE, A.G.J.; DE VRIES, E.G.E.; DAEMEN, T. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide

synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. **Cancer Res.**, v. 61, p. 7305-7309, 2002.

KOCKX, M. M.; MUHRING, J.; KNAAPEN, M.W.; DE MEYER, G.R. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. **Am J Pathol**, v. 152, n. 4, p. 885-888, 1998.

KUMAR, A.; D'SOUZA, S.S.; NAGARAJ, S.R.; GAONKAR, S.L.; SALIMATH, B.P.; RAI, K.M. Antiangiogenic and antiproliferative effects of substituted-1,3,4-oxadiazole derivatives is mediated by down regulation of VEGF and inhibition of translocation of HIF-1alpha in Ehrlich ascites tumor cells. **Cancer. Chemother. Pharmacol.** v.64, p.1221-33, 2009.

KUNDUSEN, S.; GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; HALDAR, P.K.; SAHA, P.; BHATTACHARYA, S.; NASKAR, S.; PANDA, SP. Exploration of anti-inflammatory potential of *Citrus limetta* risso and *Citrus maxima* (j. Burm.) Merr. **Pharmacologyonline** .v.1, p.702-709, 2011.

KUSHNERFN, I. Semantics, Inflammation, Cytokines and Common Sense. **Cytokine + Growth Factor Reviews** v.8, p. 191-196, 1998.

LAMEIJER, M.A.; TANG, J.; NAHRENDORF, M.; BEELEN, R.H.; MULDER, W.J. Monocytes and macrophages as nanomedicinal targets for improved diagnosis and treatment of disease. **Expert Rev Mol Diagn.** v.13, p.567-580, 2013.

LEROI, A.M.; KOUFOPANOU, V.; BURT A. Opinion: cancer selection. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 3, p.226–231, 2003.

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.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOEWENTHAL, H. & JAHN, G. Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mause Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und Chemische Einwirkungen. **Ztschr F Krebsforsch**, v.12, p.37:439, 1932.

MACMICKING, J.; WEN XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **A. Rev. of Immunol.** v.15, p. 323-350, 1997.

MADY, E.A. Antitumor and biochemical effects of *Echis coloratus* Crude venom on Ehrlich ascite carcinoma cells in vivo. **J. Venom. Anim. Toxins.**, v.8, p.283-296, 2002.

MAKLUF, A.S.D.; Dias, R.C.; Barra, A.A. Avaliação da qualidade de vida em mulheres com câncer de mama. **Rev Bras Cancerol.**, v.52, p.49-58, 2006.

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.** 2009.

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.

MEI, X.T.; XU, D.H.; HE, X.N.; LU, Y.C. Pharmacological researches of curcumin solid dispersions in treatment of cancer. **Zhong Yao Cai.** v.35, p.1645-1649, 2012.

MILLS, K.H.; MCGUIRK P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Semin Immunol.**, v.16, p.107-117, 2004.

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.

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

MOSHKOV, D.A.; ROMANCHENKO, S.P.; PARNYSHKOVA, E.Y.; BEZGINA, E.N.; ZAICHKINA, S.I.; PAVLIK, L.L. Effect of dopamine on Ehrlich ascites carcinoma cells. **Cancer Biol Med.** V.9, p.242-247, 2012.

NAUGLER, W.; SAKURAI, T.; KIM, S.; MAEDA, S.; KIM, K.; ELSHARKAWY, A. M.; KARIN M. Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production. **Science.** v. 317, p. 121-124, 2007.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non apoptotic death in tumour cells. **Nature Rev Cancer.** v.4, p. 592-603, 2004.

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.

PAL, S.; CHOUDHURI, T.; CHATTOPADHYAY, S.; BHATTACHARYA, A.; DATTA, G.K.; DAS, T. and SA, G. Mechanisms of curcumininduced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. **Biochem. Biophys Res. Comm.**,v.288, p.658-65, 2001.

PALLADINO, M.A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E.A.; MOLDAWER, L.L. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. **Nature Reviews D. Disc.**, v. 2, p. 736-746, 2003.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.A. and FAVARE, R.C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicol. and Terantol.**, v. 23, p. 497-507, 2001.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.O.; SOUZA, W.R. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behav. Immun.**, v.17, p. 43-54, 2003.

PEREIRA ADE, F.; PEREIRA, L.G.; BARBOSA, L.A.; FIALHO, S.L.; PEREIRA, B.G.; PATRICIO, P.S.; PINTO, F.C.; DA SILVA, G.R. Efficacy of methotrexate-loaded poly(ϵ -caprolactone) implants in Ehrlich solid tumor-bearing mice. **Drug Deliv.** v.20, p.168-179, 2013.

PEĆANAC, M.; JANJIĆ, Z.; KOMARCEVIĆ, A.; PAJIĆ, M.; DOBANOVACKI, D.; MISKOVIĆ, S.S. Burns treatment in ancient times. **Med Pregl.** v.66, p.263-267, 2013.

PINHO, M.S.L. Angiogênese: O Gatilho Proliferativo. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 25, p.396-402, 2005.

PINTO, F.C.H. **Possíveis mecanismos envolvidos na supressão do tumor de Ehrlich em camundongos com alergia alimentar**. Belo Horizonte: Escola de Medicina – UFMG, 2003. 91p. Tese de Doutorado (Área – Patologia).

QUILLES, M.B.; CARLI, C.B.A.; ANANIAS, S.R.; FERREIRA, L.S.; RIBEIRO, L.C.A.; MAIA, D.C.G.; RESENDE, F.A.; MORO, A.C.; VARTANDA, E.A.; PLACERES, M.C.P.; MAURO, A.E; CARLOS, I.Z. Antitumour and Anti-Inflammatory Effects of Palladium(II) Complexes on Ehrlich Tumour. **Z. Naturforsch.** v. 68, p. 293 – 301, 2013.

RADHIKA, M.; GHOSHAL, N.; CHAT, A. Comparison of effectiveness in antitumor activity between flavonoids and polyphenols of the methanolic extract of roots of *Potentilla fulgens* in breast cancer cells. **J . Comple and Inte Med.** v. 9, p. 24-26, 2012.

RAJESHKUMAR, N.V.; JOY, K.L.; KUTTAN, G.; RAMSEWAK, R.S.; NAIR, M.G. and KUTTAN, R. Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. **J. Ethnopharmacol.**,v. 81, p. 17-22, 2002.

REDIVO, L.B.; WERLANG, B.S.G.; MULLER, M.C. Qualidade de vida em mulheres que procuram atendimento ginecológico. **Psicologia, Saúde and Doenças**, v.9, p.113-129, 2008.

REZAEI, P.F.; FOULADDEL, S.; GHAFFARI, S.M.; AMIN, G.; AZIZI, E. Induction of G1 cell cycle arrest and cyclin D1 down-regulation in response to pericarp extract of *Banah* in human breast cancer T47D cells. **J. of Pharm. Scien.**v.20, p.2-5, 2012.

ROCHA, M.; ANDERSON, M.; SANTANA, B.; ANANIAS, S.R.; EDUARDO A. B.; DE ALMEIDA, C.; MAURO, A.C.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I.Z. Citotoxicity and Immune Response induced by Organopalladium(II) Compounds in Mice bearing Ehrlich Ascites Tumour. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, p. 1473-1480, 2007.

ROMANO, E.; RASCHI, A.B.; GONZÁLEZ, A.M.; JAIME, G.; FORTUNA, M.A.; HERNÁNDEZ, L.R.; BACH, H.; BENAVENTE, A.M. Phytotoxic activities of (2R)-6-hydroxytremetone. **Plant Physiol Biochem.** v.49, p.671-675, 2011.

SARASWATI, S.; KANAUIA, P.K.; KUMAR, S.; KUMAR, R.; ALHAIDER, A.A. Tylophorine, a phenanthraindolizidine alkaloid isolated from *Tylophora indica* exerts antiangiogenic and antitumor activity by targeting vascular endothelial growth factor receptor 2--mediated angiogenesis. **Mol Cancer.** v.12, p.82-95, 2013.

SCHACHNA, L. Dispelling the myths about ankylosing spondylitis. **Int. Med. Journ.**, v.34, p.591–593, 2004.

SCHENKEL, L.B.; ELLMAN, J. A. Novel Sulfinyl Imine Ligands for Asymmetric Catalysis. **Org. Lett.** v.5, p 545–548, 2003.

SEGURA, J.A., BARBERO, L.G., MÁRQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters**, v. 74, p. 111– 115, 2000.

SHANKAR, R.; TIWARY, S.K.; KHANNA, R.; KUMAR, M; KHANNA, A.K. Tumor Angiogenesis: Determined By VEGF Expression, MAGS Scoring, Doppler Study, As Prognostic Indicator In Carcinoma Breast. **The Internet Journal of Surgery**, v.8, p. 23-28, 2006.

SILVA, A.E.; SANTOS, F.G.A.; CASSALI, G.D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, p.658-661, 2006.

SVENSEN, N., WALTON, J. G.A.; BRADLEY, M. Peptides for cell-selectivedrug delivery **Pharmacol. Sciences**. v.33, p. 186-192, 2012.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; REDDANNA, P. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Celecoxib on Human Chronic Myeloid Leukemia in vitro, **Cancer Letters**. v.224, p. 31-43, 2005.

SURH, Y.J.; CHUN, K.S.; CHA, H.H.; HAN, S.S.; KEUM, Y.S.; PARK, K.K.; LEE S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. **Mutat Res**. v.480-481, p.243-68, 2001.

SUK, F.M.; JOU, W.J.; LIN, R.J.; LIN, S.Y.; TZENG, F.Y.; LIANG, Y.C. 15,16-Dihydrotanshinone I-induced Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells: Involvement of ATF3. **Anticancer Res**.v. 33, p.3225-3231, 2013.

TOKGUN, O.; AKCA, H.; MAMMADOV, R.; AYKURT, C.; DENIZ, G. Convolvulus galaticus, Crocus antalyensis, and Lilium candidum Extracts Show Their Antitumor Activity Through Induction of p53-Mediated Apoptosis on Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. **J. Med. Food**, v. 15, p. 1000-1005, 2012.

TRINCHIERI G, SCOTT P. Interleukin-12: basic principles and clinical applications. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v.238, p. 57-78, 1999.

VAN GENDEREN, H. O.; KENIS, H.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1783, p. 953–963, 2008.

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.

WANG, F.; LOO, W.T.; WANG, N.; CHOW, L.W.; WANG, D.; HAN, F.; ZHENG, X.; CHEN, J.P. Effect of *Sanguisorba officinalis* L on breast cancer growth and angiogenesis. **Expert Opin Ther Targets**. v.16, p.79-89, 2012.

WYRĘBSKA, A.; SZYMAŃSKI, J.; GACH, K.; PIEKIELNA, J.; KOSZUK, J.; JANECKI, T.; JANECKA, A. Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and

the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines. **Mol Biol Rep.** v.40, p.1655-1663, 2013.

WOZNIAK, M.; SZULAWSKA-MROCZEK, A.; HARTMAN, M.L.; NEJC, D.; CZYZ, M. Parthenolide Complements the Cell Death-inducing Activity of Doxorubicin in Melanoma Cells. **Anticancer Res.** v.33, p.3205-3212, 2013.

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, 2010.

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

ZELNIK, R.; LAVIE, D.; LEVY, E.C.; WANG, A. H.J.; PAUL, M.N.C. Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoids from *Coleus barbatus* Benth. **Tetrahedron**, v.33, p.1457-67, 1977.

ZHOU, J.; MUKHERJEE, P.; GUGGER, E.; TANAKA, T.; BLACKBURN; CLINTON, S.K. Inhibition of murino bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 58, p.5231-5238, 1998.