



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Lívia Carvalho Ferreira

Efeito da curcumina na angiogênese em modelo experimental de câncer
de mama

Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética

São José do Rio Preto – SP

2014

Lívia Carvalho Ferreira

Efeito da curcumina na angiogênese em modelo experimental de câncer
de mama

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

São José do Rio Preto – SP
2014

Ferreira, Livia Carvalho.

Efeito da curcumina na angiogênese em modelo experimental de câncer de mama / Livia Carvalho Ferreira. -- São José do Rio Preto, 2014

82 f. : il., tabs.

Orientador: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Câncer – Aspectos genéticos. 3. Mamas - Câncer. 4. Neovascularização. 5. Proteínas angiogênicas.
6. Curcumina. I. Zuccari, Debora Aparecida Pires de Campos.
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616-01

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Lívia Carvalho Ferreira

Efeito da curcumina na angiogênese em modelo experimental de câncer
de mama

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área em Biologia Celular e Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari
Professora Adjunta
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Sônia Maria Oliani
Professora Titular
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Angelo Gustavo Zucca Matthes
Doutor do Depto. de Mastologia e Reconstrução
da Mama.
Hospital do Câncer de Barretos

São José do Rio Preto, 20 de fevereiro de 2014

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC). A parte experimental foi desenvolvida no *Cellular and Molecular Imaging Laboratory – Henry Ford Hospital*, Detroit, MI, EUA, sob a orientação do Dr. Ali Arbab. Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos fornecida pela FAPESP e CAPES. Os recursos para o desenvolvimento do projeto na forma de Auxílio à Pesquisa da FAPESP.

Dedicatória

Dedico esse trabalho especialmente aos meus queridos pais Edna e Fernando, os maiores incentivadores da minha vida! Mãe, meu espelho de dedicação, minha força diária de luta. Nas fases difíceis, sempre me impulsionando a não desistir e continuar! Pai, meu herói, esteve sempre ao meu lado nessa fase. Amo vocês, são tudo pra mim!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”*

Marthin Luther King

Agradecimientos

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder saúde, força e uma família maravilhosa. Sou grata por tudo que tenho!

Aos meus pais, por me incentivarem cada dia mais! O caminho não é fácil, mas com ajuda e força das pessoas que amamos, as dificuldades se tornam mais leves. Obrigada mãe e pai por tudo que me proporcionaram a vida toda, minhas conquistas são especialmente pra vocês!

Agradeço minha irmã gêmea Cristina, pelo apoio nos momentos de carência que passei quando estava realizando esse trabalho nos Estados Unidos! Amo você, minha metade!

Ao meu querido namorado Thiago, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, desde o início da faculdade, até hoje! Você é o grande autor da minha vida, meu companheiro, amigo e namorado! Obrigada por fazer parte dessa história, ontem, hoje e amanhã! Te amo!

A minha querida avó Maria, que mesmo em memória sempre esteve ao meu lado, dando força e me abençoando em oração. Minha avó, segunda mãe, meu espelho de amor, luta e dedicação!

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Debora Zuccari, pela amizade e companheirismo. Agradeço pelo apoio e confiança de poder iniciar minha carreira científica sob sua orientação. Sou eternamente grata pelos conhecimentos que me fizeram aprender e crescer muito ao longo desses anos. Obrigada por ter confiado que eu seria capaz!

Ao meu supervisor Dr. Ali Arbab, que gentilmente concedeu espaço em seu laboratório para a realização da parte prática desse projeto.

Ao meu querido amigo Ravi Varma Nadimpalli, um grande homem que tive a honra de conhecer! Agradeço por tudo que fez por mim no período que passei nos Estados Unidos.

Agradeço aos meus segundos pais, Osvaldo e Maria Cecília, os quais participaram ativamente dessa caminhada. Estão sempre presentes em todos os momentos, incentivando e apoiando cada passo. Sou abençoada por ter vocês na minha vida, obrigada de coração por tudo que tem feito!

A minha eterna amiga Liza Arantes, que desde o início da faculdade me acompanha com sua amizade! Obrigada por existir e me fazer acreditar em amizade sincera, te amo!

Aos grandes amigos do laboratório, Juliana, Camila, Gabriela, Marina, Larissa, Naiane, Gustavo, Jucimara, Giovanna, Nathalia, Rubens, Tialfi e Rodrigo pela amizade, companheirismo e bons momentos compartilhados. Em especial agradeço Bruna e Thaiz, as quais compartilharam comigo uma maravilhosa experiência tanto profissional como pessoal nos Estados Unidos. Vocês foram fundamentais durante essa fase da minha vida.

Ao Sr. Domingos Zanchetta Neto pela oportunidade da realização do meu primeiro estágio em seu laboratório e por me apresentar a Dr^a. Debora. Agradeço pelo carinho e pelos ensinamentos.

A banca examinadora do meu exame geral de qualificação. Agradeço a Prof^aDr^a Dorotéia Rossi Silva e a Dr^a, Thaiz Ferraz Borin pelas sugestões que permitiram melhorar meu trabalho.

A Prof^a Dr^a Sônia Maria Oliani e ao Dr^o Gustavo Zucca Matthes por aceitarem fazer parte da minha banca de defesa.

A FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos e Auxílio Financeiro concedido, indispensáveis para a realização desse projeto.

A FAMERP pela infra-estrutura e profissionais que possibilitaram a realização do projeto.

Muito obrigada a todos que estiveram ao meu lado nessa caminhada...

Lista de Figuras

Lista de figuras

Figura 1. Representação dos diferentes modelos de formação de novos vasos sanguíneos..	03
Figura 2. Representação das etapas envolvidas no processo de angiogênese.....	05
Figura 3. Ativação do HIF α em situações de hipóxia e em condições normais de oxigênio (normóxia).....	06
Figura 4. Esquema da ligação entre as isoformas de VEGF e seus receptores.....	09
Figura 5. Representação gráfica da viabilidade das células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de curcumina por 4 horas.....	26
Figura 6. Representação gráfica da viabilidade das células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de curcumina por 24 horas.....	27
Figura 7. Representação gráfica da taxa de crescimento tumoral nos diferentes modelos de implantação do tumor dos animais tratados ou não com curcumina.....	28
Figura 8. Representação gráfica da comparação entre a média do tamanho tumoral dos animais controle e tratados com curcumina.....	29
Figura 9. Amostra representativa demonstrando a radioatividade do tumor mamário.....	30
Figura 10. Representação gráfica da intensidade de radioatividade de Tc-99m-HYNIC-VEGF-c nos tumores dos animais tratados ou não com curcumina.....	30
Figura 11. Análise da expressão do VEGF-A nos tumores mamários.....	31
Figura 12. Análise da expressão do VEGF-C nos tumores mamários.....	32
Figura 13. Análise da expressão do VEGFR2 nos tumores mamários.....	33
Figura 14. Análise da expressão do VEGFR2 nos tumores mamários.....	34
Figura 15. Análise da expressão das células positivas para Ki-67 nos tumores mamários.....	34
Figura 16. Análise da expressão do vWF nos tumores mamários.....	35

Lista de Tabelas e Quadros

Lista de tabelas e quadros

Tabela 1. Especificações dos anticorpos primários utilizados no procedimento imunohistoquímico.....	22
Tabela 2. Resultados da análise de viabilidade celular da linhagem MDA MB 231 nos grupos tratados ou não com curcumina em um período de 4 horas.....	26
Tabela 3. Resultados da análise de viabilidade celular da linhagem MDA MB 231 nos grupos tratados ou não com curcumina em um período de 24 horas.....	26

Resumo

Resumo

O câncer de mama representa a neoplasia mais comum entre as mulheres, sendo classificado como o segundo mais frequente no mundo. O crescimento do tumor requer a formação de novos vasos que são estimulados por fatores angiogênicos e seus receptores. As células neoplásicas são capazes de modificar seu fenótipo para promover alterações funcionais e estimular a produção de proteínas envolvidas na angiogênese. A curcumina, componente do extrato de *Curcuma longa L.*, é utilizada como alimento e na medicina tradicional, no entanto algumas evidências indicam que esse extrato possui ação oncostática em diferentes tipos de câncer. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com curcumina na progressão tumoral e angiogênese em modelo experimental de câncer de mama. Células da linhagem de câncer de mama receptor triplo negativo (MDA-MB-231) foram cultivadas e a taxa de viabilidade celular verificada pelo ensaio MTT após tratamento com diferentes doses de curcumina. Para o estudo *in vivo*, as células foram implantadas em camundongos nude atímicos, os quais foram aleatoriamente divididos em animais tratados (n = 5) e controles (n = 8). Os animais receberam diariamente 300 mg/kg de curcumina ou veículo administrados intraperitonealmente durante 21 dias, cinco vezes por semana. O tamanho do tumor foi avaliado semanalmente com paquímetro digital. Ao final do tratamento, a angiogênese foi verificada *in vivo* pela técnica de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), com o radiotraçador Tc-99m acoplado a proteína recombinante VEGF-c, que possui afinidade pelos receptores VEGFR2/3. Além disso, a expressão de VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2/3, marcador de proliferação celular (Ki-67) e o fator de Von Willebrand (vWF) foram verificados pelo procedimento imuno-histoquímico. No estudo *in vitro*, houve diminuição da taxa de viabilidade das células tratadas com curcumina, quando comparadas ao controle ($p > 0,05$). Para validação dos resultados, o estudo *in vivo* demonstrou que animais tratados com curcumina apresentaram menor volume tumoral ($232,5 \pm 53,2 \text{ mm}^3$) quando comparados aos controles ($282,0 \pm 88,5 \text{ mm}^3$), no entanto, sem diferença significativa ($p > 0,05$). A radioatividade de Tc-99m-HYNIC-VEGF-c (expressão de VEGFR2/3), detectada pela técnica de SPECT, foi menor nos animais tratados com curcumina. Além disso, houve diminuição da expressão de VEGF-A, VEGF-C e VEGFR2, proliferação celular (Ki-67) e densidade de microvasos (MVD (vWF) nos tumores tratados com curcumina ($p > 0,05$). A validação pelo estudo *in vivo* apontou que a os animais tratados com curcumina apresentam menor crescimento tumoral de mama quando comparado aos

controles. Além disso, foi possível detectar que os animais tratados com curcumina possuem menor extensão da angiogênese tumoral (Tc-99m-HYNIC-VEGF-c), e menor expressão das proteínas angiogênicas VEGF-C, VEGF-A, VEGFR2 e vWF. Em conclusão, nossos resultados indicam que a curcumina é capaz de diminuir a viabilidade das células tumorais de mama.

Palavras-chaves: angiogênese, curcumina, VEGF, neoplasia mamária SPECT.

Abstract

Abstract

*Breast cancer is the most common cancer in women being rated as the second most common in the world. Tumor growth requires the formation of new vessels that are stimulated by angiogenic factors and their receptors. The neoplastic cells are able to modify their phenotype to promote functional changes and stimulate the production of proteins involved in angiogenesis. Curcumin, a component of the extract of *Curcuma longa* L, is used both as food and in traditional medicine, however some evidence indicates that this extract has oncostatic effects in different types of cancer. The aim of this study was to evaluate the effects of treatment with curcumin in tumor progression and angiogenesis in an experimental model of breast cancer. The cell line of human breast cancer (MDA-MB-231) was cultured and the rate of cell viability was measured by MTT assay after treatment with different doses of curcumin. For in vivo study, the cells were implanted in female athymic nude mice, which were randomly divided into treated (n = 5) and control animals (n = 8). The animals received daily 300 mg/kg of curcumin or vehicle daily, starting in the same day as tumor implantation and continued for 21 days five times per week. Tumor size was measured weekly with a digital caliper. The end of treatment, angiogenesis was assessed in vivo by the technique of computed tomography single photon emission tomography (SPECT) with the radiotracer Tc-99m-HYNIC-VEGF-c protein coupled recombinant, which has affinity for VEGFR2/3. Furthermore, the expression of VEGF-A, VEGF-C e VEGFR2/3 marker of cell proliferation (Ki-67) and von Willebrand factor (vWF) receptors were verified by immunohistochemical. Curcumin treatment in vitro was able to significantly decrease cell viability ($p < 0.05$) Animals treated with curcumin showed less tumor volume (232.5 ± 53.2 mm³) compared to control animals (282.0 ± 88.5 mm³), however, no significant difference ($p > 0,05$). The radioactivity of Tc-99- HYNIC-VEGF-c expression (VEGFR2/3) detected by SPECT was lower in animals treated with curcumin. Furthermore, the expression of VEGF-A, VEGF-C e VEGFR2, vascular microvessel (vWF) and cell proliferation (Ki-67) was lower in tumors treated with curcumin when compared to controls. The validation by in vivo study demonstrated that animals treated with curcumin shows lower breast tumor growth when compared to the control group of animals. Moreover, it was possible to detect that the animals treated with curcumin exhibit lower extent of tumor angiogenesis (Tc-99m-HYNIC-VEGF-C) and reduce expression of the angiogenic proteins VEGF-C, VEGF-A, VEGFR2 e vWF. In summary, our results demonstrate that curcumin affect the viability of the breast cancer cells in vitro.*

Keywords: *angiogenesis, breast neoplasm, curcumin, VEGF, SPECT.*

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de abreviaturas e símbolos

µl	micro-litro
µM	micromol
µm	micrometro
ANOVA	do inglês Analysis of Variance
BSA	do inglês Bovine Serum Albumin
cDNA	DNA complementar
D.O.M	Densidade Óptica Média
DMEM	do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	do inglês Dimethyl sulfoxide
DMV	Densidade de microvasos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	do inglês Ethylenediaminetetraacetic acid
RE	Receptor de Estrógeno
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
g	Gramma
Glu	Glutamina
H₂O	Fórmula química da água
H₂O₂	Fórmula química do peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfurico
HE	Hematoxilina-eosina
HIFs	do inglês Hypoxia Inducible Factors
HRP	do inglês Horse Radish Peroxidase
HYNIC	do inglês Hydrazinonicotinic Acid
IACUC	do ingles Institutional Animal Care and User Committee
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Intraperitoneal
Ki-67	do inglês antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular no Câncer
mg	Miligrama
mL	Mililitro

mM	Milimolar
MMPs	Matriz Metaloproteinases
MTT	do inglês 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF-kB	do ingles Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	Nanograma
NO	Fórmula química do óxido nítrico
°C	Graus Celsius
OVCAR3	do inglês Human ovarian carcinoma cell line
PBS	do inglês Phosphate Buffer Solution
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIGF	do ingles Placental Growth Factor
pVHL	do inglês Protein Von Hippel-Lindau
ROI	do inglês Regions of Interest
rpm	Rotações Por Minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SPECT	do ingles Single-Photon Emission Computed Tomography
Tc-99m	do inglês Technetium-99m
U	Unidade
u.a	Unidades arbitrárias
VEGF	do inglês Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	do ingles Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vWF	do inglês von Willebrand Factor

Sumário

Sumário

I.INTRODUÇÃO	1
1.Dados gerais	2
2.Angiogênese	3
3.Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e seus receptores.....	6
4.Curcumina	9
5.SPECT (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único).....	12
II.OBJETIVOS	14
III.MATERIAL E MÉTODOS	15
1.Estudo in vitro	16
1.1.Cultivo celular	16
1.2.Manutenção das células	16
1.3.Tripsinização das garrafas	16
1.4.Quantificação e plaqueamento das células da linhagem tumoral MDA-MB-231	16
1.5.Ensaio da viabilidade celular pela técnica de MTT.....	17
2.Estudo in vivo	18
2.1.Considerações Éticas	18
2.2.Delineamento experimental e indução tumoral	18
2.3.Tratamento dos animais com curcumina	19
2.4.Mensuração tumoral	19
2.5.VEGF-c.....	19
2.5.1.Preparação do HYNIC (Hidrazinonicotinamida)	20
2.5.2.Aplicação Tc-99m-HYNIC-VEGF-c e aquisição das imagens	20
2.5.3.Análise das imagens	20
2.5.4.Eutanásia dos animais e coleta do material	21
2.6.Procedimento Imuno-histoquímico	21
2.7.Análise Imuno-histoquímica.....	22
2.8.Análise estatística	23
IV.RESULTADOS	24
1.Estudo in vitro	25
1.1. Ensaio da viabilidade celular pela técnica de MTT.....	25
2.Estudo in vivo	27
2.1.Mensuração do tamanho tumoral por paquímetro.....	27

2.2.Avaliação da angiogênese pelo SPECT.....	29
2.3.Imuno-histoquímica.....	31
V.DISSCUSSÃO	36
VI.CONCLUSÕES	41
VII.REFERÊNCIAS	43
VIII.APÊNDICE	52
IX.ANEXOS	54
<i>ANEXO A</i>	<i>55</i>
<i>ANEXO B</i>	<i>56</i>

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Dados gerais

O câncer de mama representa o segundo tipo mais frequente no mundo, sendo o mais comum entre as mulheres. É relativamente raro antes dos 35 anos, e acima desta faixa etária sua incidência cresce de forma rápida e progressiva (INCA, 2014). Corresponde a 23% dos novos casos de câncer a cada ano, e 14% do total de mortes por câncer no mundo (JEMAL et al., 2011). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA estimam a ocorrência de 57.120 novos casos desse tipo tumoral para 2014. Nos Estados Unidos e Europa Ocidental existe a expectativa do surgimento de quinhentos mil casos diagnosticados a cada ano. As taxas de mortalidade por câncer de mama ainda permanecem elevadas no Brasil, e isto se deve principalmente ao diagnóstico tardio (HICKS e KULKARNI, 2008; INCA, 2014).

O câncer de mama está fortemente associado a fatores hormonais, incluindo menarca precoce e menopausa tardia, nuliparidade e idade mais avançada. Recentes estudos apontam que mulheres que amamentam por longo período adquirem maior proteção contra o acometimento do tumor de mama (FRANK e CRITCHFIELD, 2002). Além desses, o aumento do peso corporal e a idade continuam sendo importantes fatores de risco (WU et al., 2007; LERTKHACHONSUK et al., 2013).

As incidências mais elevadas se encontram nos países do norte da Europa, Austrália, Nova Zelândia e América do Norte. Os países da América do Sul apresentam taxas intermediárias de incidência, já países do continente asiático revelam os menores índices de acometimento do câncer de mama (JEMAL et al., 2011). Historicamente, as menores incidências têm sido atribuídas a populações asiáticas, devido à idade mais avançada da menarca, baixo peso corporal principalmente em mulheres pós-menopausa, uso freqüente de hormônios na menopausa, assim como o estilo de vida dessa população, que inclui atividade

física e alimentação rica em vegetais (WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2006; SIEGEL et al., 2014).

2. Angiogênese

Fisiologicamente, a formação de novos vasos sanguíneos ocorre por meio de dois mecanismos distintos: vasculogênese e angiogênese. Na vasculogênese, os vasos são formados pela diferenciação de células precursoras endoteliais (também conhecidas como angioblastos), em células endoteliais maduras. Embora este processo ocorra apenas durante a fase embrionária, recentes estudos indicam que a vasculogênese pode ocorrer também na formação de novos vasos sanguíneos no ambiente tumoral. Por outro lado, a angiogênese ocorre tanto durante o desenvolvimento embrionário como no pós-natal, e é caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos pela proliferação e migração de células endoteliais pré-existentes, processo essencial na carcinogênese (Figura 1) (FOLKINS et al., 2009; EL HALLANI et al., 2010; PATENAUDE, PARKER e KARSAN, 2010; ARBAB, 2012; HAJRASOULIHA et al., 2012).

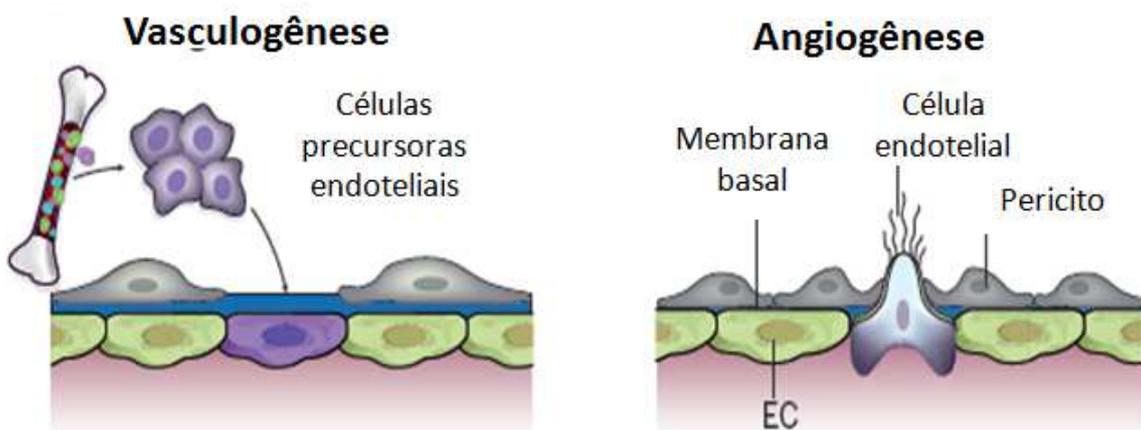


Figura 1. Representação dos diferentes modelos de formação de novos vasos sanguíneos. Adaptado de CARMELIET; JAIN. (2009).

Os vasos sanguíneos são formados por dois tipos distintos de células; endoteliais e células de suporte perivascular, denominadas pericitos. As células endoteliais são células epiteliais de revestimento dos vasos sanguíneos, enquanto os pericitos são células

perivasculares que formam uma camada única de células musculares lisas em torno das células endoteliais, proporcionando suporte mecânico e estabilidade à parede dos vasos, regulando a função vascular (GERHARDT e BETSHOLTZ, 2003; RUAN, SONG e OUYANG, 2009).

A angiogênese é caracterizada pelo crescimento e desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, um processo normal e essencial na cicatrização de feridas e formação de tecidos (HALL et al., 2005). No entanto, também é um passo fundamental na oncogênese, bem como no crescimento do tumor, a fim de fornecer nutrientes e oxigênio para progressão e proliferação das células tumorais, contribuindo para a formação de metástases (TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005; GAVALAS et al., 2013).

Este processo ocorre durante o desenvolvimento e remodelação vascular em uma série controlada de eventos que se inicia a partir de capilares pré-existentes no tumor. O tamanho tumoral pode alcançar aproximadamente 1-2 mm³, antes de suas demandas metabólicas serem restritas devido ao limite de difusão de oxigênio e nutrientes no local (CARMELIET e JAIN, 2011). De acordo com a sua gravidade, a ausência de oxigênio pode tanto promover apoptose como impedir a morte das células, conduzindo a respostas biológicas que induzem o crescimento tumoral (SADRI e ZHANG, 2013). Assim, para garantir a progressão do tumor, as células neoplásicas modificam seu fenótipo a fim de promover alterações funcionais, estimulando a produção de fatores angiogênicos, os quais se ligam a receptores específicos nas células endoteliais pré-existentes, levando a formação de novos vasos sanguíneos (LEE et al., 2007; YU, MOHAN e NATARAJAN, 2012).

O processo da angiogênese envolve um número sequencial de etapas: inicialmente, as células endoteliais são ativadas por fatores pro-angiogênicos produzidos e liberados pelas células tumorais. Em seguida, as células endoteliais pré-existentes secretam enzimas proteolíticas, tais como as Matriz Metaloproteinases (MMPs) para a degradação da membrana

basal e matriz extracelular. Assim, inicia-se a proliferação e migração das células endoteliais para formação de um novo vaso sanguíneo. Finalmente, ocorre a ligação das células denominadas *tips cells* nas células endoteliais dos novos capilares, o novo lúmen e uma nova membrana basal são formados (Figura 2) (GRIZZI et al., 2005; WEIS E CHERESH, 2011).

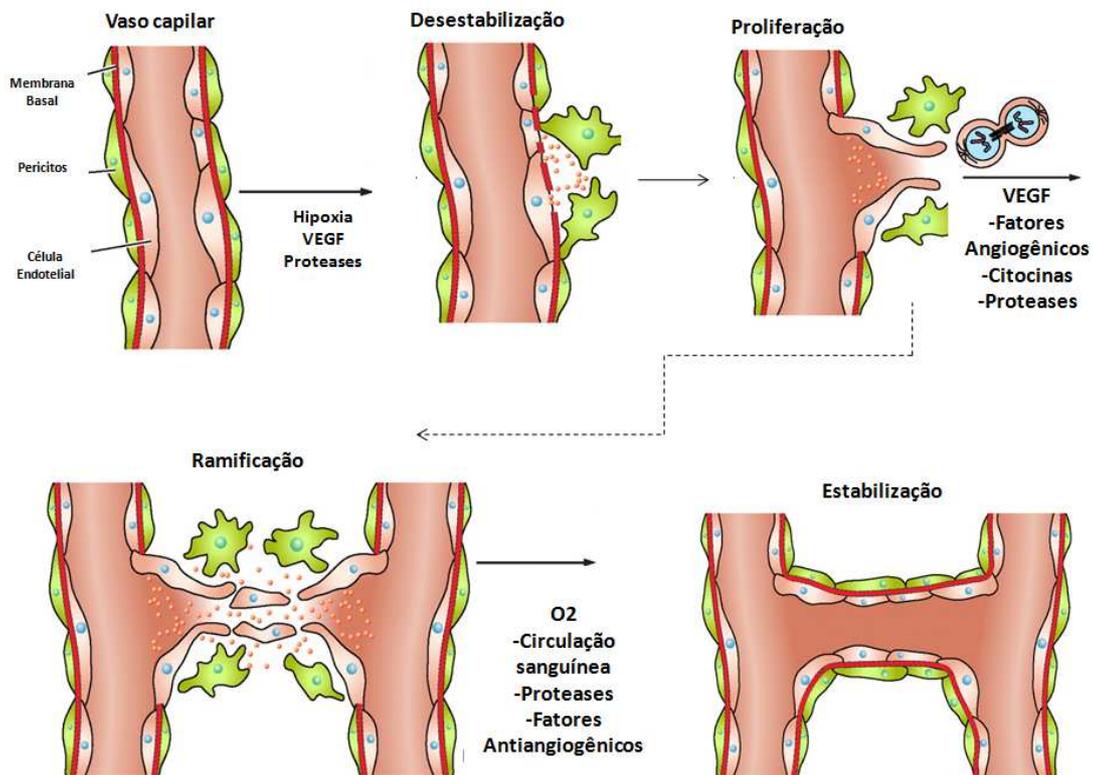


Figura 2. Representação das etapas envolvidas no processo de angiogênese. Adaptado de CLAPP. (2009).

Em resposta à redução do oxigênio disponível, as células tumorais expressam o fator induzível por hipóxia (HIF-1), que é um fator de transcrição induzido sob hipóxia e que nestas condições, migra desde o citoplasma para o núcleo das células, ligando-se aos elementos de resposta à hipóxia (SEMENZA, 2013). O HIF-1 é composto por duas subunidades, HIF- α e HIF-1 β . A subunidade HIF- α apresenta três isoformas HIF-1 α , HIF-2 α , e HIF-3 α , que estão presentes em células tumorais apenas na ausência do oxigênio. Estudos demonstram que a alta expressão de HIF-1 α está diretamente associada ao pior prognóstico em tumores de mama. A

subunidade HIF-1 β é constitutivamente expressa em células normais de diversos órgãos, como rins, pulmão e coração (BOS et al., 2003; RUNDQVIST e JOHNSON, 2013).

Em situações normais de oxigênio, o HIF α é reconhecido pela proteína supressora tumoral Von Hippel-Lindau (pVHL) ubiquitinilado para sofrer degradação proteossomal. No entanto, em situações de hipóxia, o pVHL se liga ao NO e o HIF-1 α não é reconhecido. Nesse caso, o HIF α é ativado e induz a expressão de genes de resposta à hipóxia como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (Figura 3) (SEMENZA, 2002; MIMEAULT e BATRA, 2013; TUNG et al., 2013).

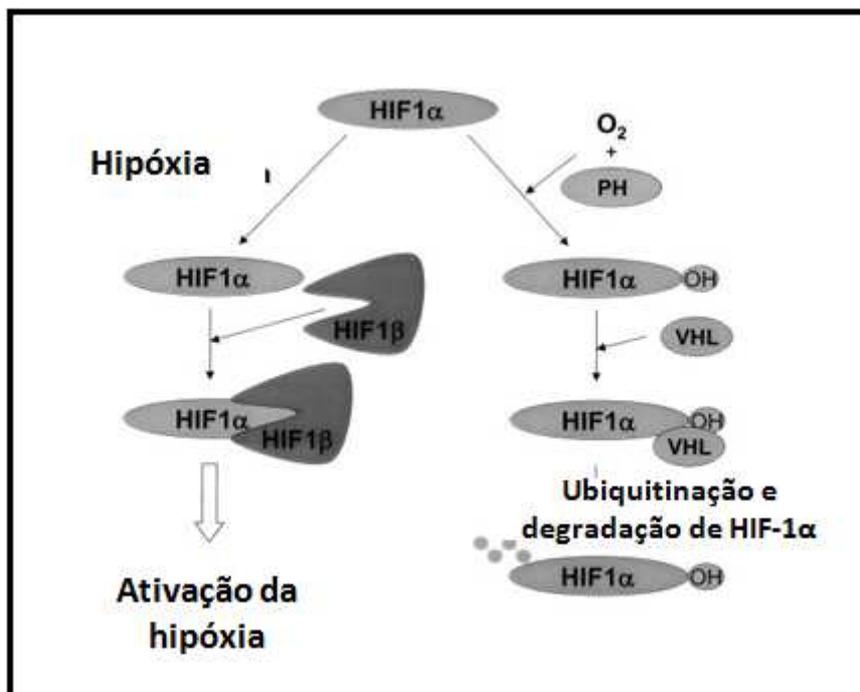


Figura 3. Ativação do HIF-1 α em situações de hipóxia e em condições normais de oxigênio (normóxia). Adaptado de HOEBEN et al. (2004).

3. Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e seus receptores

O VEGF é considerado um dos fatores pró-angiogênicos mais importantes por promover a formação de novos vasos pela sua capacidade de regular a permeabilidade vascular, estimular o crescimento, migração e invasão das células endoteliais (HOEBEN et al., 2004; DELLI CARPINI et al., 2010; GREENBERG e RUGO, 2010; SHIBUYA, 2011). É

composto por uma família de cinco isoformas referidas como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário (PlGF) (Figura 4). O VEGF atua por sua ligação a receptores específicos do tipo tirosina quinase (RTK), promovendo uma cascata de eventos intracelulares. Cada isoforma pode ativar um ou mais receptores conhecidos, como VEGFR1 localizado na superfície de células hematopoiéticas, macrófagos e monócitos, VEGFR2 encontrado no endotélio vascular e linfático e o VEGFR3 localizado predominantemente no endotélio linfático (STEFANINI et al., 2008; TANEJA et al., 2010).

A isoforma VEGF-A é uma glicoproteína dimérica, constitutivamente expressa em baixos níveis nos tecidos normais na fase adulta, e em níveis mais elevados em diferentes tecidos epiteliais, como mama, rim e pulmão (HOEBEN et al., 2004; CARMELIET e JAIN, 2011). O VEGF-A, um dos maiores reguladores do processo de angiogênese, foi detectado inicialmente em vários tipos de linhagens de células tumorais, enquanto os seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 foram encontrados predominantemente expressos em células endoteliais. No entanto, recentes estudos revelam que células tumorais também são capazes de apresentar expressão significativa de receptores do VEGF (FERRARA, 2009; 2010).

O VEGF-B foi descoberto há pouco mais de 10 anos como um membro da família VEGF. Apresenta afinidade pelo VEGFR1, sendo abundantemente expresso em tecidos musculares esqueléticos e lisos, como coração e diafragma (NASH et al., 2006). Recentes estudos demonstram que níveis de expressão de VEGF-B estão aumentados em tecidos tumorais de mama quando comparados ao tecido normal, sugerindo que o VEGF-B pode complementar o papel de outros membros da família VEGF (YUE et al., 2014). Além disso, o VEGF-B apresenta baixa atividade angiogênica, e também, segundo um estudo de Li et al. (2008) em células neuronais humanas, possui potencial para inibir a apoptose estimulando a proliferação celular.

A isoforma de VEGF-C, também conhecida como proteína relacionada ao VEGF (VRP), desempenha papel na regulação do processo angiogênico na embriogênese precoce, mas tem essencialmente a função de estimular a proliferação, crescimento e sobrevivência das células endoteliais linfáticas, que conduz à formação de novos vasos linfáticos (WANG et al., 2012). O VEGF-C é altamente expresso em tecidos tumorais, especialmente mama, colo do útero, cólon, pulmão e próstata. Apresenta elevada afinidade com os receptores celulares VEGFR2 e VEGFR3 (HAJRASOULIHA et al., 2012).

O VEGF-D possui características e funções semelhantes ao VEGF-C. Sua alta expressão em tecidos tumorais está relacionada com a ocorrência de metástase pela formação de novos vasos linfáticos (KARNEZIS et al., 2012). Estudos indicam que a inibição da sinalização de VEGF-D pode regular negativamente a linfangiogênese, restringindo a formação de vasos linfáticos (ALITALO et al., 2013).

A isoforma PlGF é predominantemente expressa em altos níveis no tecido placentário, mas também pode ser encontrada em tecidos como pulmão, coração e músculo esquelético. O PlGF estimula o crescimento, migração e sobrevivência das células endoteliais, levando a formação de novos vasos sanguíneos (SUN et al., 2012). Além do VEGF-A, o PlGF também se liga ao receptor VEGFR1, estimulando o aumento da expressão do VEGF-A, levando a um efeito sinérgico dessa proteína, e consequente maior resposta angiogênica (FISCHER et al., 2008).

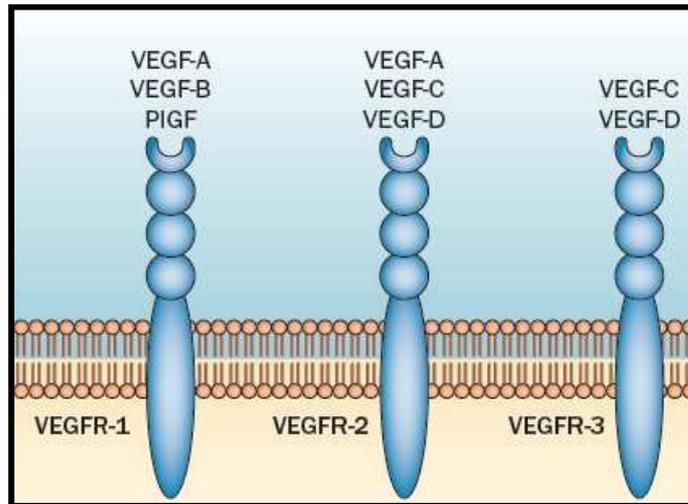


Figura 4. Esquema da ligação entre as isoformas de VEGF e seus receptores. Adaptado de TAIMEH et al. (2013).

A inibição do VEGF pelo bloqueio de seus receptores representa um novo enfoque para a terapia contra o câncer, podendo ser utilizada na regressão de vasos sanguíneos imaturos, característicos dos tumores e reduzir a permeabilidade vascular de modo a diminuir a pressão intratumoral, com isto diminuindo a probabilidade da formação de metástases. (FERRARA, 2004). A alta expressão de fatores angiogênicos como VEGF e seus receptores está relacionada com o grau de vascularização tumoral, e tem sido proposta como fator prognóstico para avaliar a sobrevivência dos pacientes. Assim, torna-se extremamente importante a identificação destas proteínas envolvidas na angiogênese, para a escolha do tratamento adequado, bem como para o desenvolvimento de terapias eficazes que envolvam uma combinação de vários fatores (ALI et al., 2010; ARBAB, 2012). Neste contexto, o VEGF e seus receptores parecem ser, particularmente, alvos promissores para a terapia molecular do câncer de mama.

4. Curcumina

A curcumina, um composto de ação antitumoral e antiangiogênica de recente interesse na pesquisa (SUN et al., 2009), é uma erva tradicional na medicina indiana e chinesa

normalmente utilizada como tempero e corante alimentar (MITO et al., 2011). A curcumina é o componente principal do *Tumeric*, um rizoma derivado da planta (*Curcuma longa L.*). No Brasil, esse rizoma é popularmente conhecido como cúrcuma, açafrão da Índia ou gengibre dourado. É encontrado em regiões tropicais e subtropicais, sendo originário do sudeste da Ásia e principalmente cultivado em países como China e Índia. O rizoma é a parte da planta de maior interesse, normalmente utilizado na forma de pó, obtido a partir da moagem dos rizomas secos (AGGARWAL, KUMAR e BHARTI, 2003).

A cúrcuma é composta principalmente por três curcuminóides: curcumina (77%) desmetoxicurcumina (17%) e bisdemetoxicurcumina (3%) (KUNNUMAKKARA, ANAND e AGGARWAL, 2008). O pó da cúrcuma apresenta coloração amarela devido à presença da curcumina, polifenólico lipossolúvel, encontrado em maior quantidade nesse rizoma (AGGARWAL et al., 2007). A curcumina é normalmente consumida na Índia como tempero, em média 100 mg/kg ao dia. Estudos recentes apontam que esse consumo diário de curcumina não ocasiona efeitos colaterais, pois após a ingestão, a biodisponibilidade plasmática da curcumina é muito baixa devido a sua lenta absorção pelo trato gastrointestinal, rápida biotransformação e rápida eliminação sistêmica (SHARMA, GESCHER e STEWARD, 2005).

Na medicina tradicional, a curcumina é considerada eficaz no tratamento de doenças do fígado, indigestão, infecções do trato urinário e artrite reumatóide, além de possuir efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (PISANO et al., 2010; FOSSEY et al., 2011). Além disso, tem sido investigada como um potencial agente terapêutico para o tratamento de diferentes tipos de câncer, como por exemplo, carcinoma coloretal (PATEL e MAJUMDAR, 2009), carcinoma de cabeça e pescoço (CHAKRAVARTI et al., 2010), câncer pancreático (VILLEGAS, SÁNCHEZ-FIDALGO e ALARCÓN DE LA LASTRA, 2008) e osteosarcoma (FOSSEY et al., 2011).

Os índices mais elevados de câncer de mama estão localizados nos países da América do Norte e Europa, onde não há um consumo diário de curcumina. Os países asiáticos, como China e Índia possuem menor número de casos de câncer de mama, cólon, pulmão e próstata, quando comparados aos países ocidentais, e isto pode estar associado à alta ingestão de curcumina (AGGARWAL, KUMAR e BHARTI, 2003). Segundo estudo de (Wu, Ying e Gomez-Pinilla. (2006), houve aumento no número de casos de câncer de mama em imigrantes da Índia vivendo nos Estados Unidos, demonstrando o valor da dieta como agente preventivo no desenvolvimento tumoral.

Os efeitos oncostáticos da curcumina são resultantes principalmente da atividade de agentes envolvidos na regulação das vias de sinalização, como fatores de transcrição (SUBRAMANIAM et al., 2010). Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam a um promotor específico ou região estimuladora do DNA, atuando como reguladores da expressão de vários genes (PARK et al., 2013). Um dos principais e mais estudados é o Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF- κ B), que tem uma variedade de funções, tais como a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (ZUBAIR e FRIERI, 2013). A ativação do NF- κ B regula a expressão dos principais genes envolvidos no processo angiogênico, como membros da família VEGF e seus receptores (SHISHODIA, 2013). Acredita-se que a curcumina pode atuar diretamente na regulação da angiogênese pela inibição do fator de transcrição NF- κ B (PERRY et al., 2010; BIMONTE et al., 2013). De acordo com Shan et al. (2012) a curcumina foi capaz de inibir a liberação de VEGF-A, um gene regulado pelo NF- κ B, por células neoplásicas desempenhando papel antiangiogênico e apoptótico em tumores primários de hipófise.

Desta forma, supõe-se que a curcumina possa ter um papel importante na supressão tumoral, atuando na regulação ou inibição de fatores pró-angiogênicos como VEGF e seus receptores, responsáveis pela formação de novos vasos, criando assim, um caminho promissor

para a utilização deste fitoquímico como um agente terapêutico no tratamento do câncer de mama.

5. SPECT (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único)

Na busca de novos meios para o diagnóstico de tumores, uma técnica inovadora na pesquisa experimental para a detecção da angiogênese no tumor vem sendo utilizada. A tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), uma técnica da medicina nuclear, utiliza a radiação ionizante de raios gama, permitindo dados biotopológicos em 3D a partir da injeção de um radiofármaco no paciente que emite radiação necessária para a aquisição da imagem (FRANC et al., 2008; MEJIA et al., 2010).

Para determinar a angiogênese em modelos animais de câncer utilizando a técnica SPECT, os animais recebem uma injeção contendo um composto específico que se liga aos receptores de VEGF. Esse composto é formado pelo radioisótopo tecnécio 99-m (Tc-99m), amplamente utilizado na medicina nuclear, e conjugado com uma proteína recombinante (VEGF-c) que possui afinidade pelos receptores VEGFR2 e VEGFR3. Essa ligação é intermediada pelo quelante hidrazinanicotinamida (HYNIC), formando o composto denominado Tc-99m-HYNIC-VEGF-c. Após a injeção desse composto, os animais são colocados na câmara do SPECT e a radioatividade emitida pelo Tc-99m é captada permitindo determinar a extensão da angiogênese (ALI et al., 2010). Assim, a técnica de SPECT é eficaz para avaliar a influência de uma determinada droga na angiogênese tumoral em modelos animais. O presente estudo utilizou desta técnica para determinar a angiogênese tumoral nos animais tratados ou não com curcumina.

Objetivos

II. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo verificar se o tratamento com curcumina seria capaz de:

- Diminuir a viabilidade celular *in vitro*;
- Diminuir o crescimento tumoral *in vivo*;
- Afetar a angiogênese tumoral, verificada pela expressão dos receptores de VEGF detectados *in vivo* pela tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT);
- Alterar a expressão de proteínas angiogênicas nos tumores mamários.

Material e Métodos

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Estudo *in vitro*

1.1. Cultivo celular

As células procedentes da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, em meio DMEM com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) até atingir 80-100% de confluência.

1.2. Manutenção das células

A troca do meio de cultura de cada garrafa foi realizada a cada dois dias, adicionando novo meio enriquecido para estimular o crescimento das células e evitar contaminação.

1.3. Tripsinização das garrafas

Todo o meio de cultivo foi retirado da garrafa, em seguida adicionado 2 mL de tripsina, e então as células foram incubadas por 5 minutos a 37°C. Novamente, foram adicionados 5 mL de meio de cultivo para inativação da tripsina após a desagregação das células, lavando o fundo da garrafa de forma homogênea. Em seguida a solução presente foi transferida para um tubo falcon de 15 mL, e então centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos. Após a formação do *pellet* ao fundo do tubo, o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em novas garrafas de cultura e incubadas novamente.

1.4. Quantificação e plaqueamento das células da linhagem tumoral MDA-MB-231

Inicialmente as células foram tripsinizadas e adicionou-se 5 mL de meio de cultura. Dessa solução, retirou-se 10 µL para realizar a contagem das células na câmara de Neubauer.

A contagem foi realizada nos quatro quadrantes laterais externos, e o resultado colocado na fórmula abaixo, onde X é a quantidade de células por ml:

$$X = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas em cada quadrante} \times 10^4 \times \text{Fator de diluição}}{\text{Total de quadrantes contados}}$$

Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado na quantidade de meio necessária para obter $0,5 \times 10^6$ células por mL. Para a realização do ensaio de viabilidade celular pela técnica de MTT, foram adicionados 100 μL contendo $0,5 \times 10^6$ células em cada poço da placa de 96 poços.

1.5. Ensaio da viabilidade celular pela técnica de MTT

Foram plaqueadas $0,5 \times 10^6$ células e divididas em placas de cultura de 96 poços contendo 100 μL de meio de cultura específico. Posteriormente, foram adicionadas as seguintes concentrações de curcumina: 25 μM , 50 μM e 100 μM . A curcumina foi preparada em solução mãe de 10 μM ¹ e então aplicada na quantidade correspondente às concentrações específicas de cada tratamento (25 μM = 2 μL ; 50 μM = 4 μL e 100 μM = 8 μL). Após o tempo determinado para o tratamento (4 e 24 horas), foi adicionado a cada poço 10 μL de solução MTT do *Vibrant MTT Cell Proliferation Assay Kit* (ATCC, Manassas, VA, USA). A placa foi incubada por 4 horas a 37°C, e em seguida foi adicionado 100 μL de *Detergent reagent* (ATCC, Manassas, VA, USA) para dissolução dos cristais de formazan. Decorridas 2 horas após a adição do detergente, a viabilidade foi determinada pelo leitor ELISA (VICTOR3 – PerkinElmer, Waltham, MA, USA) sob comprimento de onda de 570 nm. Em todos os experimentos o meio de cultura foi utilizado como branco e subtraído das amostras. A

¹ O protocolo de preparo da solução está descrito no Apêndice A.

viabilidade celular relativa (%) foi calculada para todos os grupos em relação à amostra controle (sem tratamento) e realizada em triplicata.

2. Estudo *in vivo*

Toda parte experimental desse projeto foi desenvolvida no *Cellular and Molecular Imaging Laboratory* do Hospital Henry Ford em Detroit, Michigan, USA em colaboração com o Prof. Dr. Ali S. Arbab. O estágio acrescentou conhecimentos no manuseio de animais imunossuprimidos e em técnicas de Biologia Molecular relacionadas à verificação da angiogênese e formação tumoral somados ao uso da Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) em animais de experimentação.

2.1. Considerações Éticas

Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas nacionais e internacionais do Comitê de Ética e aprovados pela “Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto” (Protocolo FAMERP nº5982/2011) (ANEXO A) e “Institutional Animal Care and User Committee” (IACUC N°1203) do Henry Ford Hospital, USA (ANEXO B).

2.2. Delineamento experimental e indução tumoral

Camundongo snude atímicos, com 7 – 8 semanas de idade e \pm 25 gramas de peso corporal, adquiridos no *Charles River Laboratory, Inglaterra*, foram utilizados para implantação das células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (n = 13). Todos os animais foram mantidos em caixas apropriadas em ambiente com temperatura adequada e ciclo claro/escuro controlados de 12 em 12 horas, com ração e água à vontade. As células tumorais foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640, na concentração de 6×10^7 células/mL. Os animais receberam uma injeção subcutânea com

50 µL de meio de cultura contendo 3×10^6 células viáveis na glândula mamária direita e/ou flanco posterior direito. Estas células são eficientes na formação de tumores de xenoinxerto apresentando maior vascularidade e menor área de necrose.

2.3. Tratamento dos animais com curcumina

Os animais foram randomizados e separados aleatoriamente em: grupo I, animais controle (sem tratamento) (n = 8) e, grupo II, animais tratados com curcumina (n = 5). Animais do grupo I receberam injeção intraperitoneal (IP) contendo apenas 100 µL de veículo composto por (1 mL de Chemophor (Sigma, St. Louise, MO, USA); 1 mL de Dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma) e 8 mL de PBS). Já os animais do Grupo II receberam injeção IP na dose de 300 mg/kg de curcumina (Sigma, St. Louise, MO, USA) dissolvida em 100 µL de veículo. O tratamento foi iniciado no mesmo dia da implantação do tumor, e todos os animais foram tratados durante 5 dias por semana, ao longo de 21 dias. A duração do tratamento foi pré-estabelecida até que o tumor atingisse 1,7 cm de diâmetro.

2.4. Mensuração tumoral

Os tumores de todos os animais foram mensurados uma vez por semana 7, 14 e 21 dias após a implantação, usando paquímetro digital (*Fisher Scientific*). Para análise foram verificados o maior diâmetro longitudinal (comprimento) e transversal (largura), e calculados pela seguinte fórmula (JENSEN *et al.*, 2008):

$$\text{Volume tumoral} = 1/2 (\text{Comprimento} \times \text{Largura}^2)$$

2.5. Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) – VEGF-c

O composto VEGF-c recombinante foi adquirido pela *Prospec* (Rehovot, Israel). VEGF-C, é também conhecido como Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VRP), proteína recentemente descoberta da família do Fator de Crescimento Vascular Endotelial

VEGF, que está diretamente relacionada com o VEGF-D. O cDNA de VEGF-C de rato codifica uma proteína de 416 resíduos de aminoácidos e é quase idêntica à proteína VEGF-C de camundongo, sendo um ligante para VEGFR2 e VEGFR3.

2.5.1 Preparação do HYNIC (Hidrazinonicotinamida)

O HYNIC foi utilizado na ligação do VEGF-c com o tecnécio (Tc-99m), para construção do agente Tc-99m-HYNIC-VEGF-c. Inicialmente succinimidil 6-hidrazina piridina-3-carboxilato hidrocloreto foi conjugado com o VEGF-c recombinante. Em seguida a proteína conjugada foi purificada e a Hidrazinonicotinamida-VEGF-c foi conjugada com tecnécio (Tc-99m) em solução com tricina e cloreto estanoso, formando o Tc-99m-HYNIC-VEGF-c (BLANKENBERG et al., 2006; ALI et al., 2010).

2.5.2 Aplicação Tc-99m-HYNIC-VEGF-c e aquisição das imagens

Ao final de 21 dias de tratamento, os animais receberam uma injeção contendo 0,5 mCi de Tc-99m-HYNIC-VEGF-c aplicada na veia caudal. Após 1 hora, os camundongos foram anestesiados com injeção intramuscular contendo 20 µL de ketamina/xilazina (100 mg/mL) e acomodados no suporte de imagem da câmara do SPECT. As imagens foram adquiridas com a câmara gama PRISM 3000 convertida em um sistema micro SPECT utilizando um colimador para pequenos animais (R70) (Bioscan), rotação de 360 graus, 1700 segundos por projeção, (40000 cps/projeção). O tempo de aquisição total de cada imagem foi de aproximadamente 10 minutos. As imagens foram reconstruídas com o software HiSPECT (Bioscan) e foram analisadas com auxílio do *software* ImageJ (NIH, Bethesda MD, USA).

2.5.3 Análise das imagens

Imagens multiplanares do SPECT foram reconstruídas usando ImageJ. O centro do tumor foi identificado utilizando projeções ortogonais e todas as seções contendo tumor, seja em vista axial ou coronal, foram analisadas. As regiões de interesse (ROI) foram desenhadas

em torno da área do tumor para determinar a atividade total de Tc-99m-HYNIC-VEGF-c. ROI também foi desenhado para avaliar a atividade total da região do músculo contralateral. A porcentagem de mudança na atividade total foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade total} = (\text{intensidade de radioatividade do volume tumoral/intensidade da radioatividade do músculo contralateral}) \times 100.$$

2.5.4 Eutanásia dos animais e coleta do material

Imediatamente após a realização da técnica de SPECT, os animais foram eutanasiados por injeção intracardíaca de pentobarbital (100 mg/kg). Para análise histológica e imuno-histoquímica, o tecido tumoral foi fixado em 3% de paraformaldeído contendo 3% de sucrose. Em seguida, após a coleta, os tecidos e materiais necessários para análise foram armazenados em uma sala especial até decair a radioatividade.

2.6. Procedimento Imuno-histoquímico

Para o desenvolvimento da técnica de imuno-histoquímica, os cortes histológicos dos fragmentos tumorais incluídos em parafina foram desparafinizados em xilol, reidratados em álcool em grau decrescente e incubados em 3% de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) por 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada na panela a vapor com tampão citrato² (pH 6,0) por 35 minutos. Após estabilizar a temperatura de 36°C, adicionou-se a solução de bloqueio (Biocare) por 5 minutos e os anticorpos primários: anti-VEGF-A (Santa Cruz), anti-VEGF-C (Santa Cruz), anti-VEGFR2 (Millipore), anti-VEGFR3 (Millipore), anti-vWF (Millipore) e anti-Ki-67 (Millipore), incubados a 4°C, *overnight* (Tabela 1).

Após o período de incubação, os fragmentos foram lavados em solução tampão PBS³ por 15 minutos e incubadas com anticorpo secundário biotilado por 20 minutos e complexo

^{2,3} Os protocolos de preparo das soluções estão descritas no Apêndice A

estreptavidina peroxidase por 10 minutos (Kit STARR TREK Universal HRP Detection – Medical Biocare®), seguido de lavagem com PBS por 15 minutos. A revelação foi feita com substrato cromógeno DAB (Signet Laboratories®) por 5 minutos e a contra coloração com Hematoxilina de Harris por 40 segundos. Os tecidos foram desidratados em álcool em grau crescente e banhados no xilol antes da montagem das lâminas em meio Erv-mount (Erviegas®). Todos os fragmentos tumorais foram acompanhadas de um controle positivo para o anticorpo testado e do controle negativo (sem anticorpo primário).

Tabela 1. Especificações dos anticorpos primários utilizados no procedimento imunohistoquímico.

Anticorpo	Especificidade	Diluição	Tampão	Marca
VEFG-A	Policlonal (rabbit)	1:300	Citrato pH 6,0	Santa Cruz
VEGF-C	Monoclonal (mouse)	1:50	Citrato pH 6,0	Santa Cruz
VEGFR2	Monoclonal (mouse)	1:200	Citrato pH 6,0	Millipore
VEGFR3	Monoclonal (mouse)	1:500	Citrato pH 6,0	Millipore
vWF	Monoclonal (mouse)	1:500	Citrato pH 6,0	Millipore
Ki-67	Monoclonal (mouse)	1:200	Citrato pH 6,0	Millipore

2.7. Análise Imuno-histoquímica

Para a análise da quantificação da expressão proteica, foi utilizada a técnica de densitometria óptica, com auxílio do analisador de imagens *software* ImageJ. As partes centrais e periféricas de tumor (região inferior, superior, esquerda e direita) foram fotografadas em aumento de 40 x. A expressão das proteínas VEGFR2 e VEGFR3 foi quantificada baseando-se na intensidade da imunomarcagem do anticorpo. Cada imagem foi dividida em quatro quadrantes, nos quais foram selecionados aleatoriamente 20 pontos (evitando o núcleo) em cada quadrante, no total de 80 pontos de cada área fotografada. Os

valores foram obtidos em unidades arbitrárias (u.a.) e demonstraram a densidade óptica média (D.O.M.) para cada amostra.

Os tumores também foram classificados em relação à proliferação celular de acordo com a marcação de Ki-67. O número total de células positivas para Ki-67 foi contado, normalizado e dividido pela área da imagem (m²). A avaliação da densidade de microvasos (DMV) foi detectada pela imunomarcação do vWF. Cinco áreas com maior concentração de vasos “hot spots” de cada lâmina foram identificadas. As áreas positivas para vWF foram contadas independentemente por dois observadores. A área histológica total (m²) foi anotada e a microdensidade vascular calculada como descrito por Weidner et al. (1991).

2.8. Análise estatística

As médias das análises dos diferentes grupos tratados ou não com curcumina foram comparados pelo teste *t* de student ou ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão (S.E.M.). Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism4. Qualquer valor de ($p < 0,05$) foi considerado significativo.

Resultados

IV. RESULTADOS

1. Estudo in vitro

1.1 Ensaio da viabilidade celular pela técnica de MTT

O número de células viáveis após o tratamento com curcumina, por 4 e 24 horas foi avaliado utilizando um ensaio MTT. As concentrações de curcumina utilizadas foram: 25 μM , 50 μM and 100 μM , no período de 4 e 24 horas. A viabilidade celular relativa (%) de cada amostra foi calculada a partir da média dos valores de absorbância das triplicatas. Para todas as amostras o branco (meio de cultura) foi utilizado para normalizar os resultados. Para o valor obtido no grupo controle (sem tratamento), foi atribuído 100% de viabilidade celular. Nos outros grupos o resultado foi calculado a partir da diferença em relação ao grupo controle.

As células tratadas com curcumina (25, 50 e 100 μM) apresentaram uma redução da viabilidade de forma dependente da concentração utilizada, indicando um maior efeito com o tempo de exposição à curcumina. No período de 4 horas, houve diminuição da viabilidade celular apenas em concentrações mais elevadas de curcumina (Tabela 2; Figura 5). Logo após 24 horas de tratamento, os resultados revelam diminuição significativa da viabilidade das células para todas as concentrações de curcumina (Tabela 3; Figura 6). Os dados revelam que quando comparados os tratamentos de 4 horas e 24 horas, todas as concentrações de curcumina foram mais efetivas após 24 horas, com diminuição significativa de todas as doses de curcumina em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 2. Resultados da análise de viabilidade celular das células MDA-MB-231 nos grupos tratados ou não com curcumina em um período de 4 horas.

Grupos	Média da absorbância	Erro padrão	Viabilidade celular relativa (%)
Controle	1.386	1.040	100
25 μM de curcumina	1.396	4.731	100.7

50 μ Mde curcumina	0.894	2.339	64.48
100 μ Mde curcumina	0.328	0.403	23.68

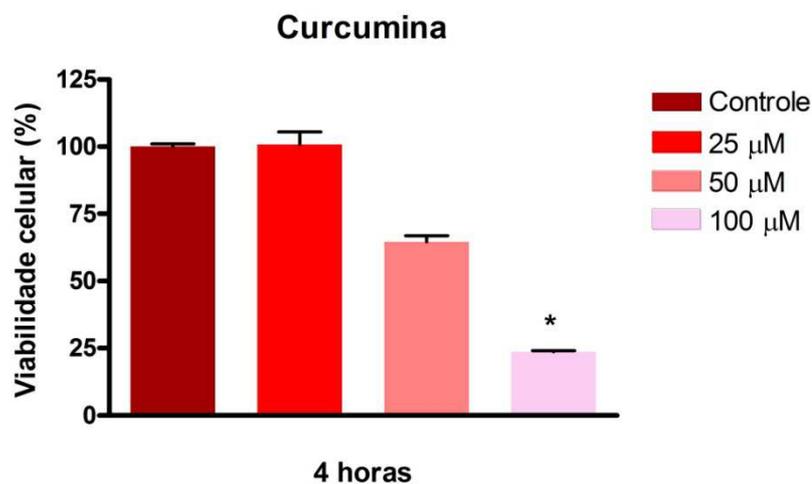


Figura 5. Representação gráfica da viabilidade das células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de curcumina por 4 horas. Cada coluna corresponde à média \pm desvio padrão das triplicatas * ($p < 0,05$), valor significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni.

Tabela 3. Resultados da análise de viabilidade celular das células MDA-MB-231 nos grupos tratados ou não com curcumina em um período de 24 horas.

Grupos	Média da absorvância	Erro padrão	Viabilidade celular relativa (%)
Controle	1.638	0.727	100
25 μ Mde curcumina	1.152	1.307	70.29
50 μ Mde curcumina	0.989	1.937	60.38
100 μ Mde curcumina	0.257	0.467	15.69

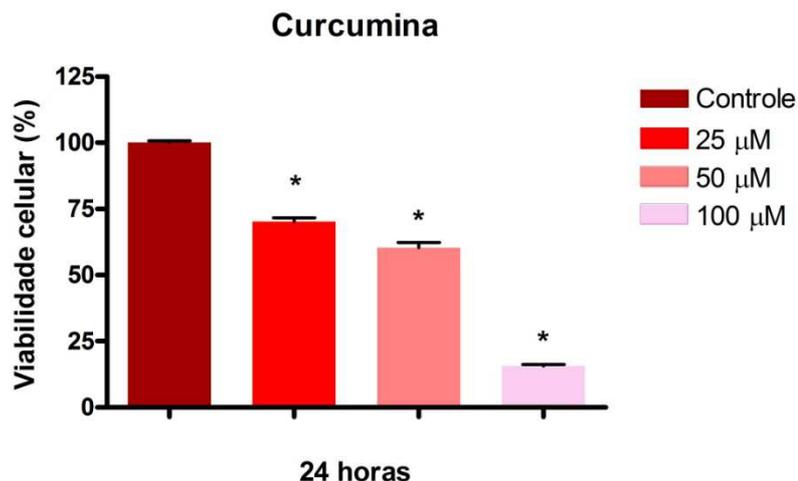


Figura 6. Representação gráfica da viabilidade das células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de curcumina por 24 horas. Cada coluna corresponde à média \pm desvio padrão das triplicatas * ($p < 0,05$), valor significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni.

2. Estudo *in vivo*

2.1. Mensuração do tamanho tumoral por paquímetro

Para o desenvolvimento tumoral, os animais receberam 3×10^6 células tumorais da linhagem MDA-MB-231 na glândula mamária direita ou flanco direito. Todos os animais do presente estudo apresentaram tumores mamários, os quais foram medidos com paquímetro digital 7, 14 e 21 dias após a implantação das células tumorais. Os animais foram acompanhados diariamente durante todo período do tratamento. O início da formação tumoral foi observado dois após a inoculação destas células. Os animais tratados com curcumina, durante 21 dias de tratamento não apresentaram letargia ou perda de peso, no entanto, alguns destes animais tratados apresentaram comportamento hiperativo, mas não irritabilidade ou agressividade. As células foram implantadas em locais diferentes (glândula mamária direita ou flanco direito) para avaliar a possível interferência do local de implantação nos efeitos do tratamento na progressão do tumor. No entanto, a área onde as células foram implantadas não alterou a taxa de crescimento do tumor nos animais tratados com veículo ($p = 0,88$) ou nos animais tratados com curcumina ($p = 0,35$), indicando que não houve nenhuma diferença significativa no desenvolvimento de tumores e resposta ao tratamento entre os dois modelos

utilizados. Assim, ambos foram reunidos em um grupo para cada tratamento (curcumina ou veículo) para análises posteriores (Figura 7).

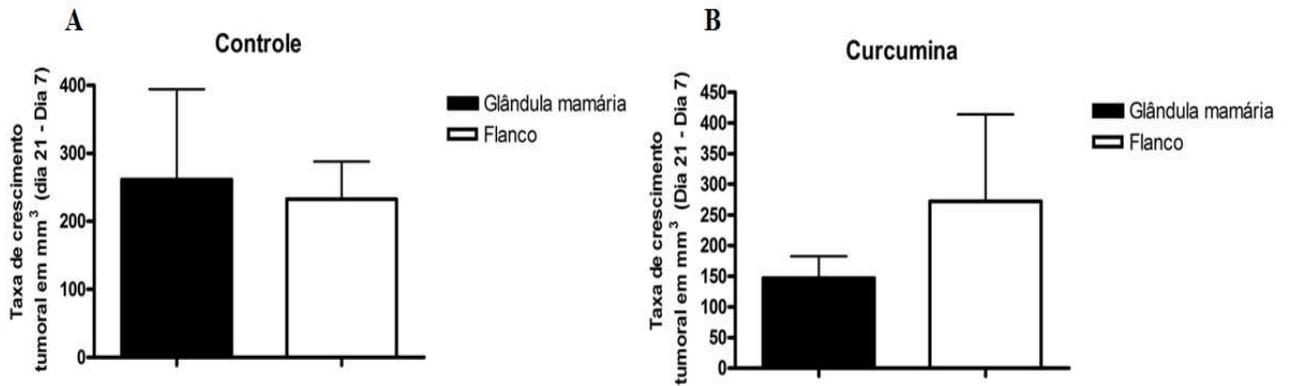


Figura 7. Representação gráfica da taxa de crescimento tumoral nos diferentes modelos de implantação do tumor dos animais tratados ou não com curcumina. **(A)** Animais tratados com veículo (controle), **(B)** Animais tratados com curcumina. Cada coluna corresponde à média \pm desvio padrão ($p > 0,05$), valor não significativo no teste *t de student* seguido de Bonferroni.

Animais que receberam o tratamento com curcumina apresentaram diminuição do tamanho tumoral em comparação ao controle, no entanto, uma diferença estatisticamente significativa não foi atingida ($p > 0,05$). O volume médio do tumor de animais tratados com veículo e tratados com curcumina foram $282,0 \pm 88,5 \text{ mm}^3$ e $232,5 \pm 53,2 \text{ mm}^3$, respectivamente, no dia 21 ($p > 0,05$, Figura 8).

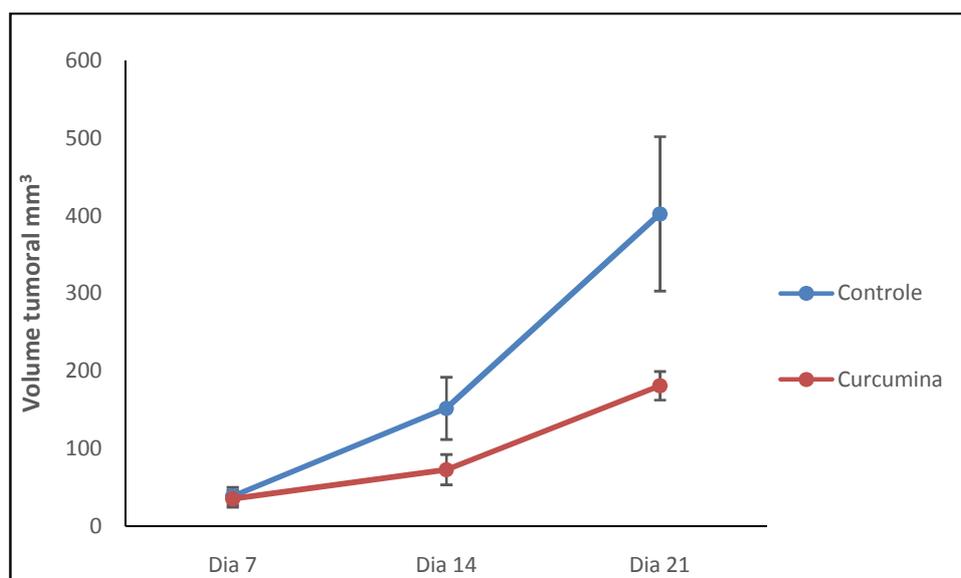


Figura 8. Representação gráfica da comparação entre a média do tamanho tumoral dos animais controle e tratados com curcumina, mensurado 7, 14 e 21 dias após a implantação tumoral e início do tratamento (veículo e curcumina). Cada ponto corresponde à média \pm desvio padrão do volume tumoral dos grupos estabelecidos ($p > 0,05$), valor não significativo no teste *t de student* seguido de Bonferroni.

2.2. Avaliação da angiogênese pela técnica de SPECT

Para determinar se houve alteração na expressão do VEGFR2/3, animais tratados ou não com curcumina foram submetidos à técnica de SPECT utilizando o radiotraçador Tc-99m acoplado a proteína VEGF-c que possui afinidade pelos receptores de VEGFR2/3. Essa ligação é intermediada pelo quelante hidrazinanicotinamida (HYNIC), formando o composto denominado Tc-99m-HYNIC-VEGF-c. As imagens foram analisadas por meio do *software* ImageJ. Inicialmente, o volume tumoral foi determinado nos planos axial, sagital e coronal e em seguida, a radioatividade foi quantificada na região tumoral. A porcentagem de mudança na atividade total foi calculada pela seguinte fórmula (média da atividade do volume total do tumor / média da atividade nos músculos contralaterais) x 100.

Os animais que receberam tratamento com curcumina apresentaram menor atividade de Tc-99m-HYNIC-VEGF-c nos tumores em comparação aos tratados com veículo (Figuras 9). A taxa de intensidade de radioatividade nos controles foi de $183,5 \pm 20,9\%$, enquanto nos tratados com curcumina foi $134,9 \pm 10,3\%$. Apesar da diferença na taxa de radioatividade nos

tumores entre os dois grupos, uma diferença estatisticamente significativa não foi atingida ($p > 0,05$, Figuras 13).

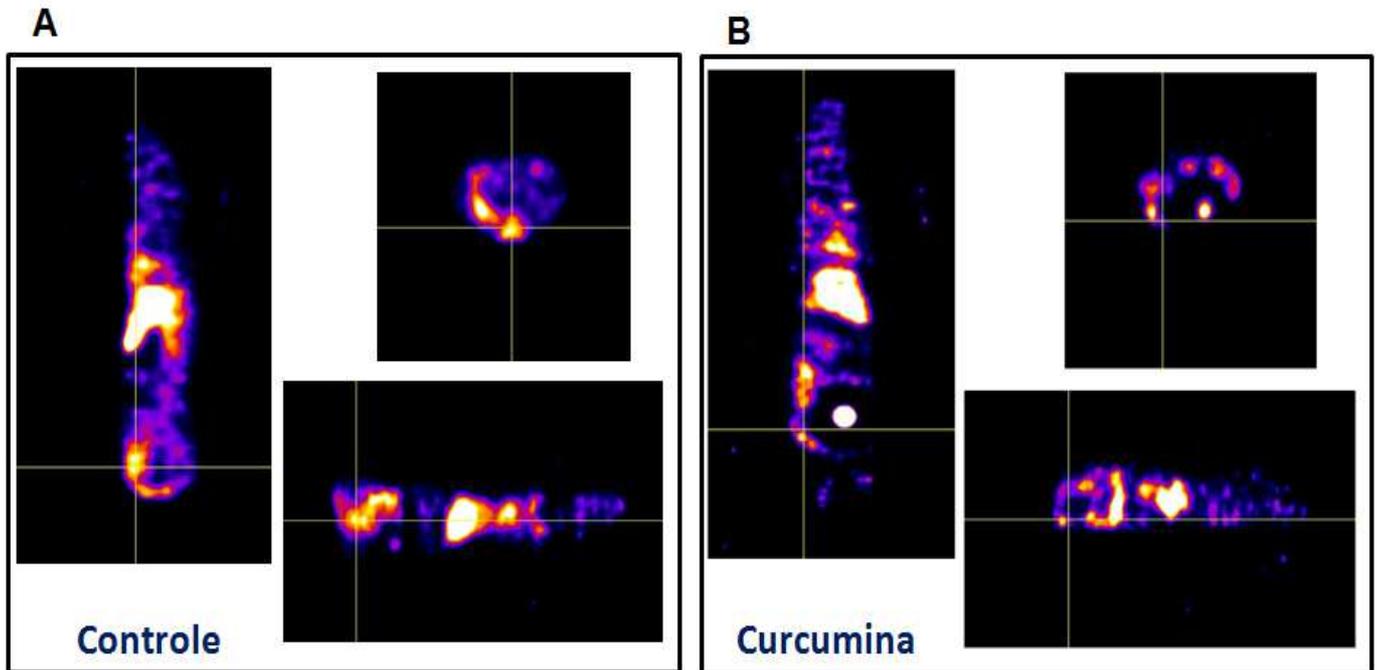


Figura 09. Amostra representativa demonstrando a radioatividade do tumor. (A) Tumor mamário de um animal controle (B) Tumor mamário de um animal tratado com curcumina. Imagens representadas em planos coronal, axial e sagital.

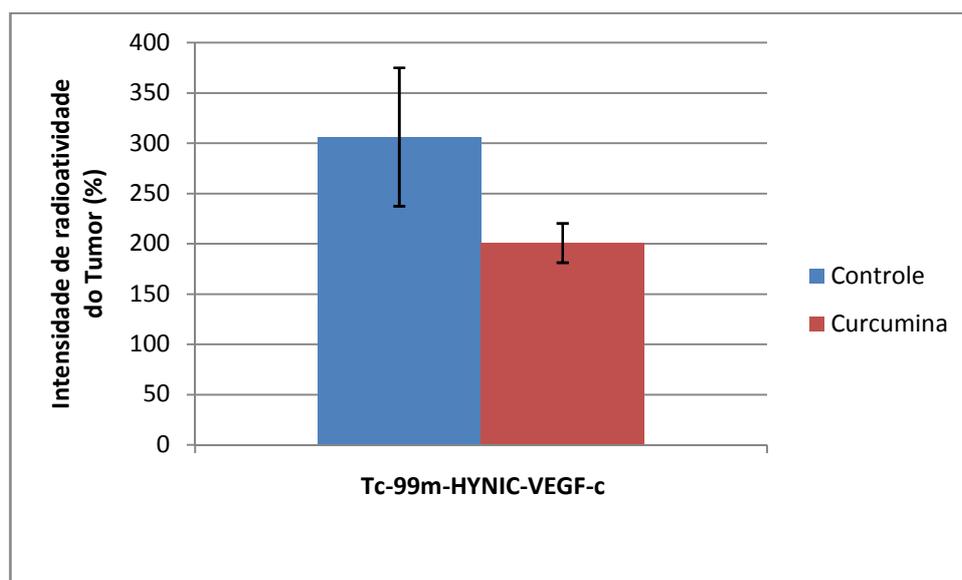
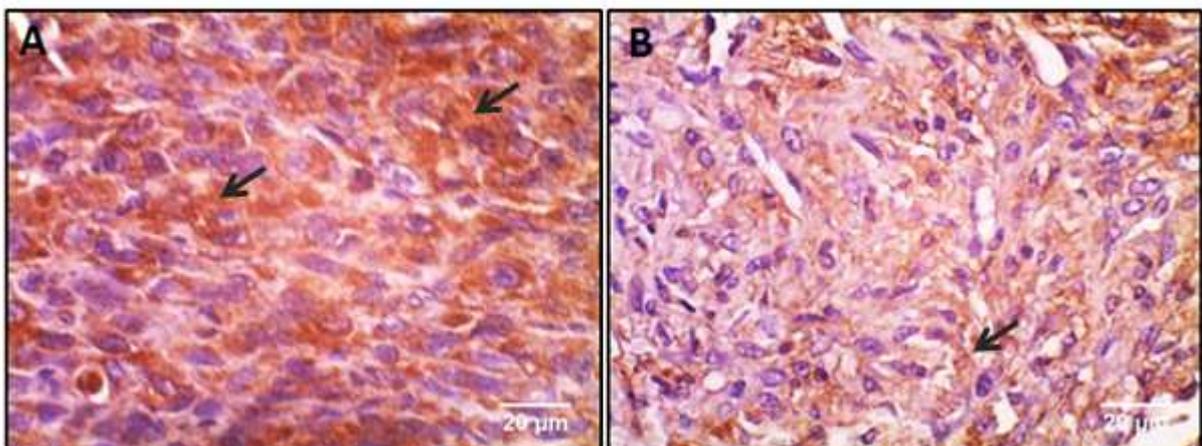


Figura 10. Representação gráfica da intensidade de radioatividade de Tc-99m-HYNIC-VEGF-c nos tumores dos animais tratados ou não com curcumina. Cada coluna corresponde à média \pm

desvio padrão da intensidade de radioatividade dos grupos estabelecidos ($p > 0,05$), valor não significativo no teste *t de student* seguido de Bonferroni.

2.3. Imuno-histoquímica

Todos os tumores (controle e tratados com curcumina) apresentaram necrose na parte central, por essa razão não foi possível quantificar a imunomarcção das proteínas VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, VEGFR3, Ki-67 e vWF nessa região. A região periférica do tumor caracterizada pelas regiões “acima”, “abaixo”, “à direita” e “à esquerda” da área central a imunomarcção foi quantificada. Os resultados revelaram menor expressão de VEGF-A e VEGF-C nos tumores dos animais tratados com curcumina, quando comparados aos controles ($p < 0,0001$; Figura 11 e Figura 12). Uma redução significativa do VEGFR2 foi observada na parte periférica em tumores tratados com curcumina ($p < 0,0001$; Figura 13) Além disso, a curcumina também diminuiu a expressão de VEGFR3, mas não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$; Figura 14). Tumores tratados com curcumina apresentaram diminuição do número de células positivas para Ki-67, quando comparados aos tumores dos animais controle ($p < 0,05$; Figura 15). Além disso, outro indicador da neovascularização do tumor foi avaliado pela quantificação da densidade de microvasos (DMV). Os resultados demonstram que o tratamento com curcumina foi capaz de diminuir a densidade de microvasos (vWF), quando comparados aos animais controle. ($p < 0,05$; Figura 16).



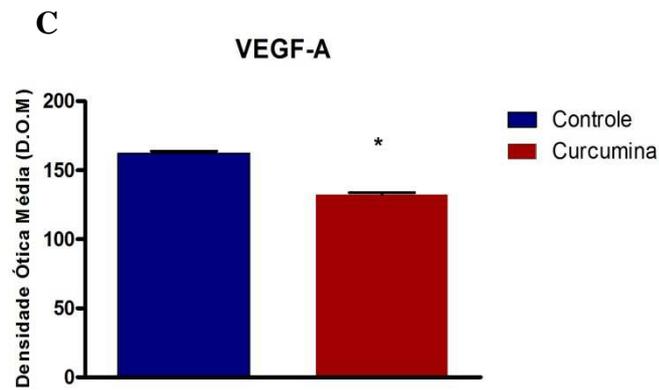


Figura 11. Análise da expressão do VEGF-A nos tumores mamários. As setas apontam a marcação citoplasmática do anticorpo VEGF-A. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris (**A**) Tumor mamário tratado com veículo (controle); (**B**) Tumor mamário tratado com curcumina. (**C**) Representação gráfica da expressão de VEGF-A nos grupos controle e curcumina. Cada coluna corresponde à média \pm desvio padrão da intensidade da expressão dos grupos estabelecidos *($p < 0,05$), valor significativo no teste *t de student* seguido de Bonferroni.

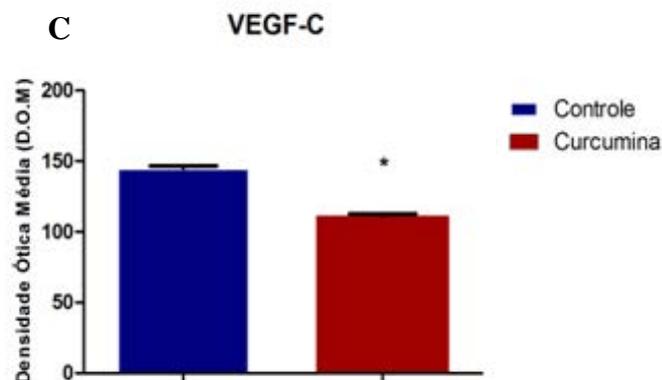
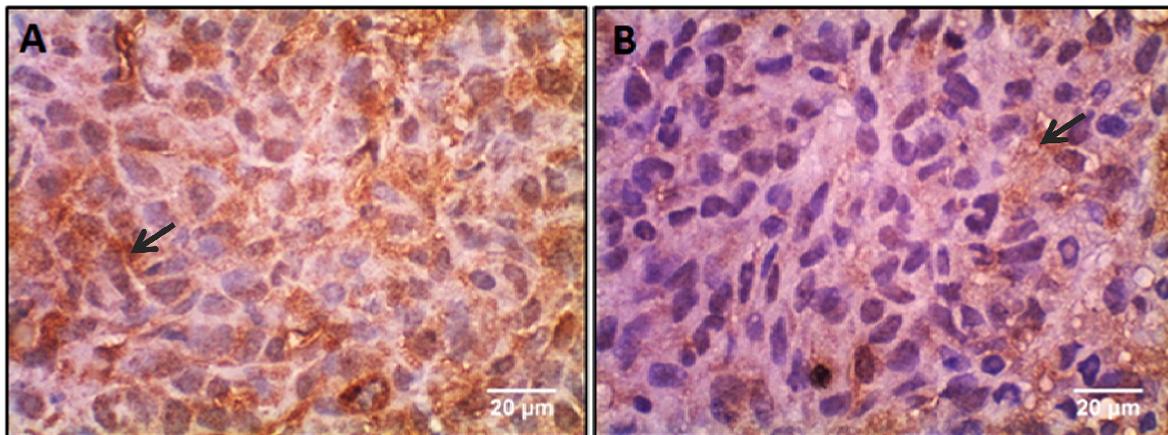


Figura 12. Análise da expressão do VEGF-C nos tumores mamários. As setas apontam a marcação citoplasmática do anticorpo VEGF-C. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. (**A**) Tumor mamário tratado com veículo (controle); (**B**) Tumor mamário tratado com curcumina. (**C**) Representação gráfica da expressão de VEGF-C nos grupos controle e curcumina. Cada coluna corresponde à média \pm desvio padrão da intensidade da expressão dos grupos estabelecidos *($p < 0,05$), valor significativo no teste *t de student* seguido de Bonferroni.

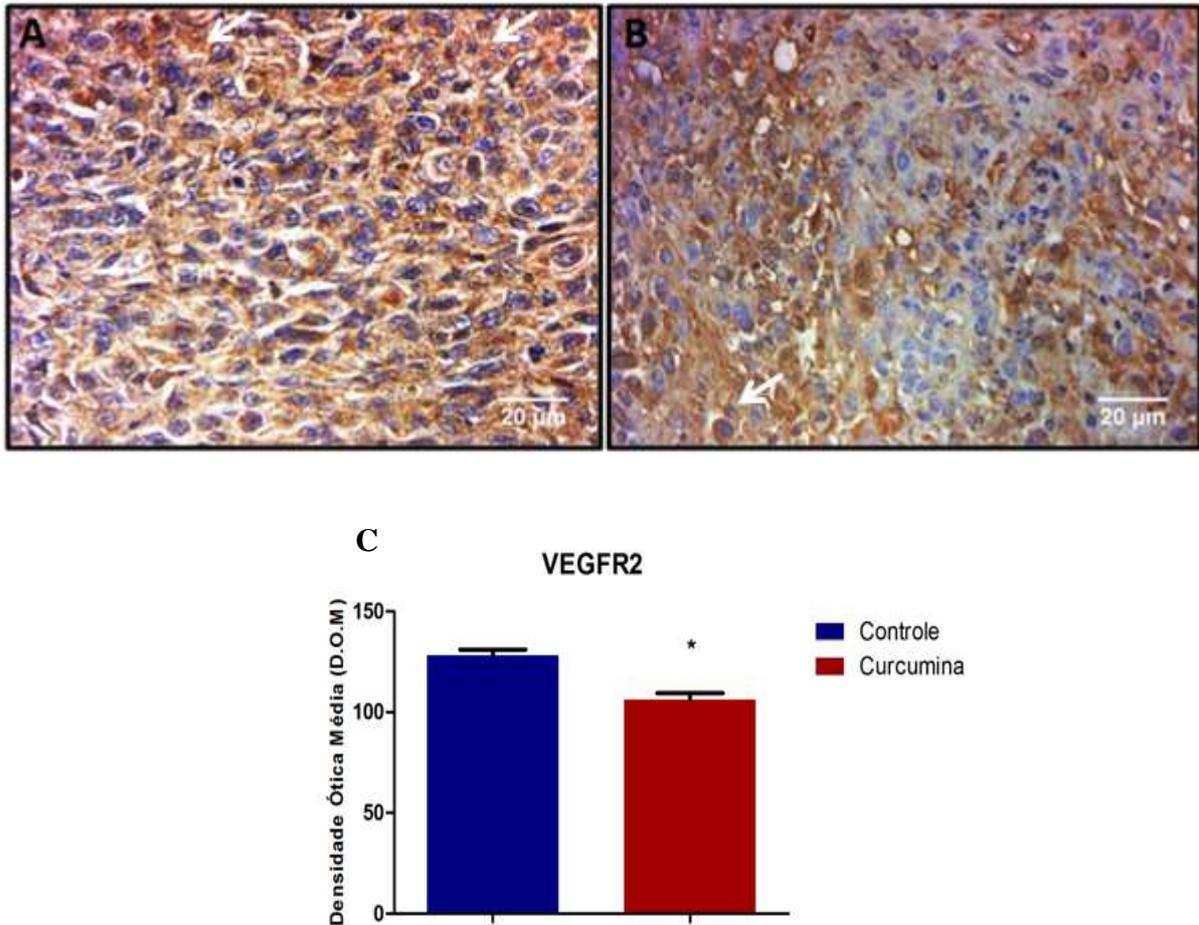
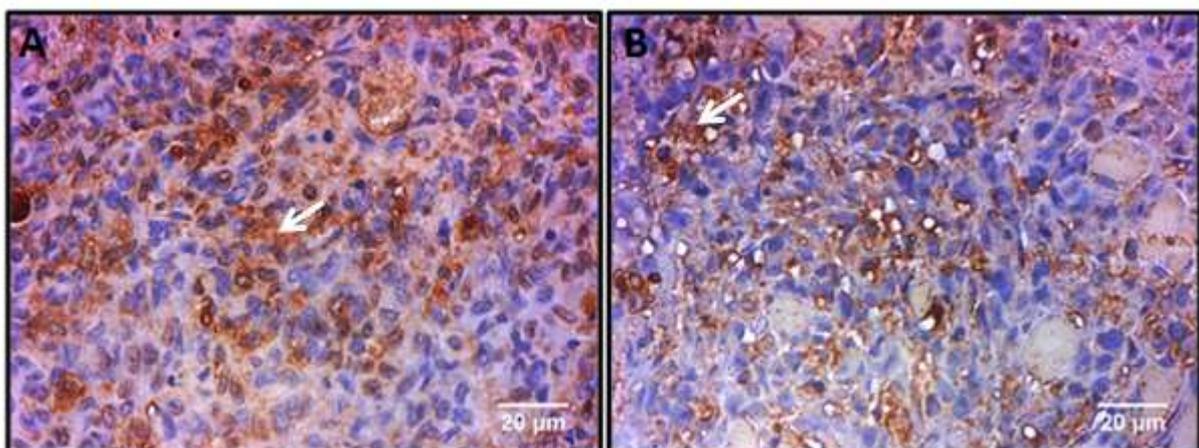


Figura 13. Análise da expressão do VEGFR2 nos tumores mamários. As setas apontam a marcação citoplasmática do anticorpo VEGFR2. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. **(A)** Tumor mamário tratado com veículo (controle); **(B)** Tumor mamário tratado com curcumina. **(C)** Representação gráfica da expressão de VEGFR2 nos grupos controle e curcumina. Cada coluna corresponde à média \pm desvio padrão da intensidade da expressão dos grupos estabelecidos *($p < 0,05$), valor significativo no teste *t de student* seguido de Bonferroni.



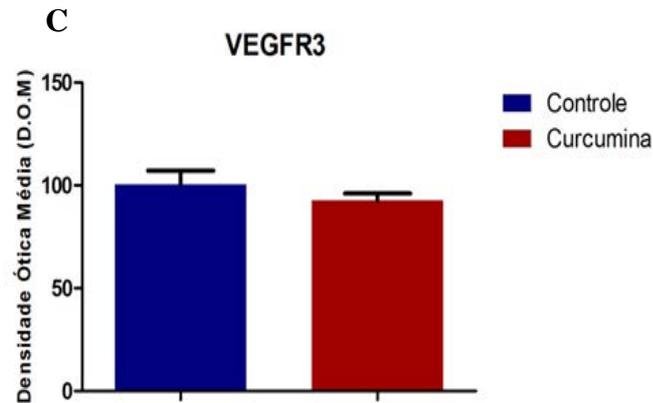


Figura 14. Análise da expressão do VEGFR3 nos tumores mamários. As setas apontam a marcação citoplasmática do anticorpo VEGFR3. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. **(A)** Tumor mamário tratado com veículo (controle); **(B)** Tumor mamário tratado com curcumina. **(C)** Representação gráfica da expressão de VEGFR3 nos grupos controle e curcumina. Cada coluna corresponde à média \pm desvio padrão da intensidade da expressão dos grupos estabelecidos ($p > 0,05$), valor não significativo no teste *t de student* seguido de Bonferroni.

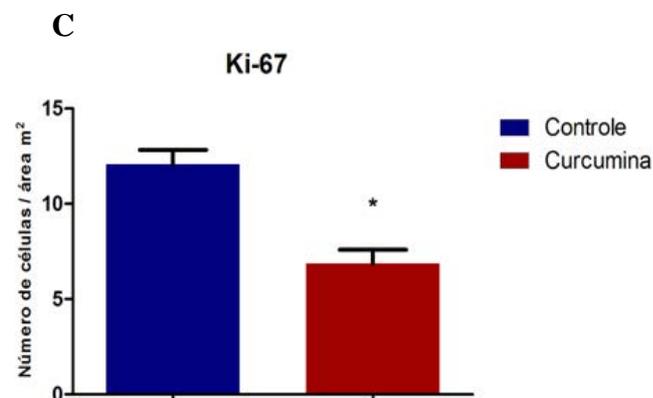
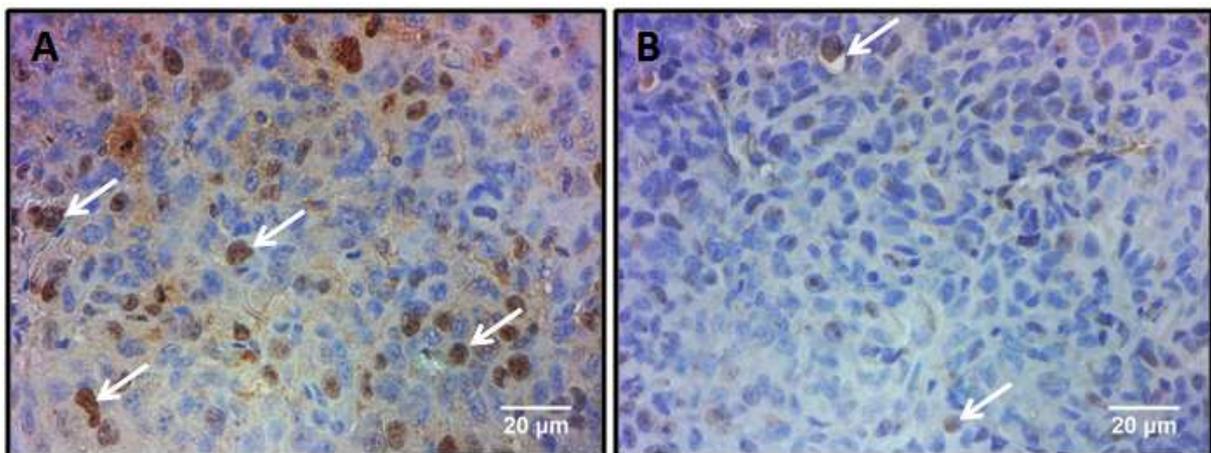


Figura 15. Análise da expressão das células positivas para Ki-67 nos tumores mamários. As setas apontam a marcação nuclear do anticorpo Ki-67. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. **(A)** Tumor mamário tratado com veículo (controle); **(B)** Tumor mamário tratado com curcumina. **(C)** Representação gráfica da média da quantidade de células positivas

para Ki-67 nos grupos controle e curcumina. Cada coluna corresponde à média \pm desvio padrão do número de células positivas dos grupos estabelecidos $*(p < 0,05)$, valor significativo no teste *t de student* seguido de Bonferroni.

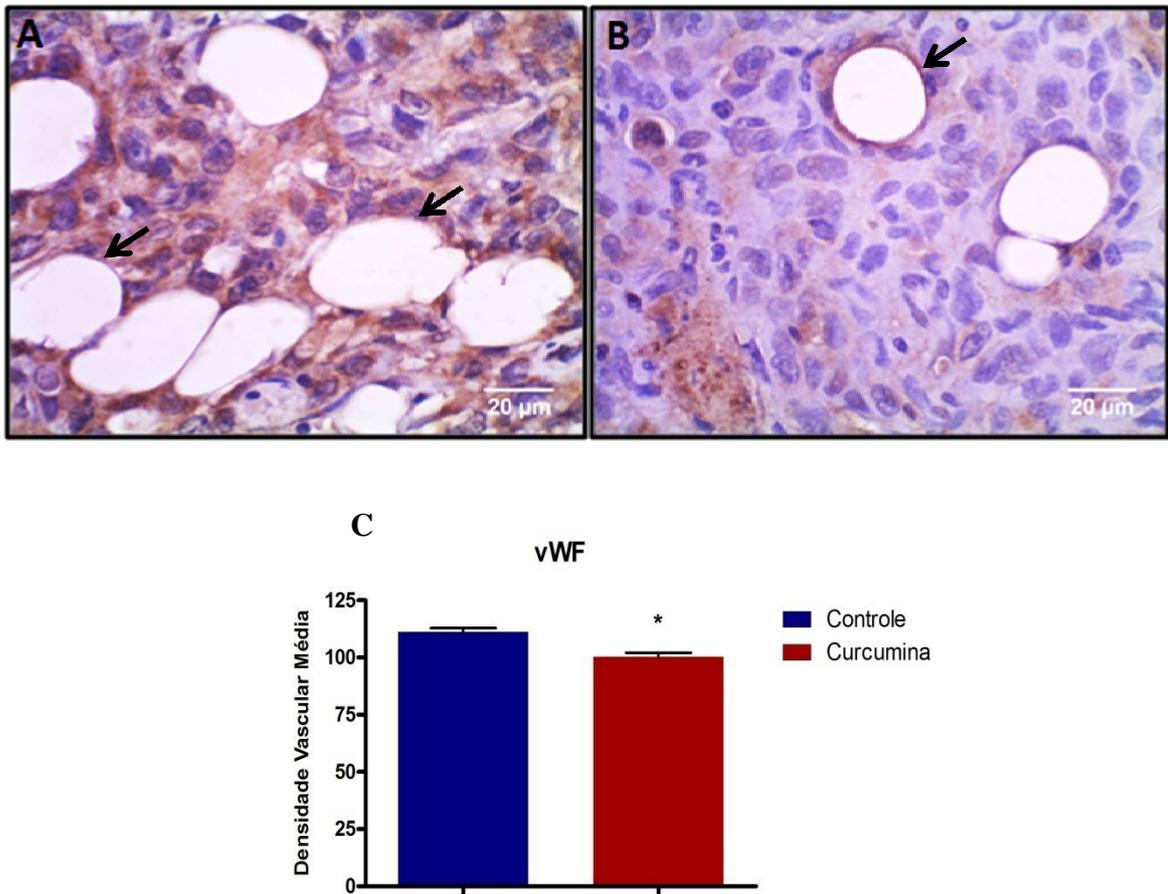


Figura 16. Análise da expressão do vWF nos tumores mamários. As setas apontam a marcação do anticorpo vWF nas células endoteliais. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. (A) Tumor mamário tratado com veículo (controle); (B) Tumor mamário tratado com curcumina, aumento 40 x; (C) Representação gráfica da quantidade estimada da densidade de microvasos nos grupos controle e curcumina. Cada coluna corresponde à média \pm desvio padrão do número de microvasos dos grupos estabelecidos $*(p < 0,05)$, valor significativo no teste *t de student* seguido de Bonferroni.

Discussão

V. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi determinar o papel da curcumina na regulação do processo de angiogênese por meio da verificação da expressão dos fatores pró-angiogênicos no câncer de mama. Os resultados demonstraram que a curcumina foi capaz de afetar a viabilidade das células da linhagem de câncer de mama receptor triplo negativo MDA-MB-231. No estudo *in vivo*, camundongos nude atímicos tratados com curcumina apresentaram menor atividade de Tc-99m-HYNIC-VEGF-c nos tumores, em comparação aos animais tratados apenas com veículo. Além disso, os resultados revelaram diminuição da expressão de proteínas angiogênicas como, VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, menor número de células positivas para Ki-67 e diminuição da densidade de micro vasos (vWF) após tratamento com curcumina, indicando possível ação deste fitoquímico sobre a neovascularização e proliferação celular.

A angiogênese desempenha papel fundamental na progressão de células tumorais, levando a formação de metástases. É controlada por fatores angiogênicos que estimulam a formação e disseminação de novos vasos endoteliais (STEIN et al., 2013). Recentes estudos apontam que terapias antiangiogênicas são promissoras no tratamento de diferentes tipos tumorais, incluindo câncer de mama (CHAN et al., 2009). Nesse sentido, a curcumina, componente principal do rizoma *Tumeric*, muito utilizada na medicina tradicional nos países asiáticos, tem sido considerada um potencial regulador da proliferação e invasão celular, angiogênese e metástase por meio de mecanismos ainda não totalmente elucidados (YANG et al., 2012). Assim, para verificar o efeito do tratamento com curcumina no processo de angiogênese tumoral no câncer de mama, foram realizados ensaios de viabilidade celular, mensuração do tamanho tumoral, análise da formação de novos vasos sanguíneos pela técnica de SPECT e quantificação da expressão de proteínas angiogênicas em tumores mamários de animais tratados e não tratados com curcumina.

Os resultados obtidos utilizando o ensaio da viabilidade celular mostraram diminuição significativa da proliferação de células de câncer de mama MDA-MB-231 após 4 e 24 horas de tratamento com curcumina. De acordo com nossos resultados, Cai et al. (2013) demonstraram que células da linhagem tumoral de ovário (OVCAR3) tratadas com diferentes doses de curcumina (4, 8 e 16 μM) durante 24, 48 e 72 horas apresentaram queda na taxa de crescimento, quando comparadas as células controle. Além disso, em estudo realizado por Palange et al. (2012), o tratamento com curcumina foi capaz de diminuir a capacidade de adesão celular nas linhagens de câncer de mama SK-BR-3 e MDA-MB-231. Esses dados corroboram com nossos resultados e sugerem que a curcumina é capaz de inibir o crescimento e proliferação de células tumorais.

Com relação ao estudo *in vivo*, foi observado que a maioria dos animais, tratados ou não com curcumina, apresentaram necrose na região central do tumor, provavelmente devido à falta de vascularização decorrente da intensa proliferação celular e crescimento do tumor. No entanto, os animais tratados com 300 mg/kg de curcumina, apresentaram menor tamanho tumoral quando comparados aos controle. O tratamento com curcumina foi iniciado no mesmo dia da implantação das células tumorais, a fim de verificar a ação desse agente terapêutico contra a formação e desenvolvimento do tumor. Em concordância com nossos resultados, Shahani et al. (2010) demonstraram que o tamanho médio do tumor mamário no grupo tratado com curcumina foi 49 % menor que no grupo controle. Da mesma forma, em estudo realizado por Lee et al. (2011), camundongos com meduloblastoma tratados com 1 mg/kg de curcumina apresentaram menor crescimento do tumor em relação aos animais controle. O tratamento foi iniciado 30 dias após a implantação do tumor e teve duração de 60 dias.

No presente estudo, a concentração de curcumina estabelecida para o tratamento dos animais foi de 300 mg/kg, seguindo dados que mostram que altas doses de curcumina apresentam resultados satisfatórios. Segundo Kunnumakkara et al. (2007), camundongos com tumor de pâncreas tratados com 1000 mg/kg de curcumina apresentaram menor tamanho

tumoral em relação aos animais controle, o que ocorreu devido a inibição do processo de angiogênese, proliferação e invasão celular.

O VEGF-C é uma proteína da família VEGF associada à sobrevivência e proliferação de células endoteliais linfáticas, responsáveis por conduzir à formação de novos vasos linfáticos e apresenta alta afinidade pelos receptores celulares VEGFR2/3. O VEGFR2 é o principal receptor responsável pela transmissão de sinais de VEGF, e apresenta-se superexpresso no tecido vascular do tumor em comparação ao tecido vascular normal (WANG et al., 2012). Nesse sentido, Ali et al. (2010) demonstraram que a proteína recombinante VEGF-c pode ser conjugada ao radioisótopo Tc-99m por meio do ligante HYNIC, o qual possui função de estabilizar a ligação desse radioisótopo com a proteína, levando a formação do radiofármaco Tc-99m-HYNIC-VEGF-c. A partir dessa descoberta, o Tc-99m-HYNIC-VEGF-c tem sido utilizado para detectar a expressão de VEGFRs, os quais indicam indiretamente o estado da angiogênese no tumor (BLANKENBERG et al., 2006; BLANKENBERG et al., 2012). Os resultados desse estudo demonstraram que houve diminuição da atividade de Tc-99m-HYNIC-VEGF-c nos tumores tratados com curcumina indicando diminuição dos receptores correspondentes (VEGFR2/3). Apesar da análise semi-quantitativa de Tc-99m-HYNIC-VEGF-c demonstrar uma menor expressão de VEGFR2/3 nos tumores tratados com curcumina, uma diferença estatisticamente significativa não foi alcançada. No entanto, a diminuição apenas da expressão de VEGFR2 foi validada pelo procedimento imuno-histoquímico.

Além disso, a análise imuno-histoquímica revelou diminuição estatisticamente significativa da expressão de VEGF-A, VEGF-C, e vWF (DMV) nos tumores tratados com curcumina. Com relação à proliferação celular, tumores tratados com curcumina revelaram menor número de células positivas para Ki-67, quando comparados ao controle. Estes dados indicam a ação da curcumina como regulador no processo da angiogênese e proliferação celular.

A angiogênese é um processo fisiológico essencial na progressão de tumores sólidos, na qual é coordenada por uma variedade de fatores de crescimento produzidos e liberados pelas células endoteliais. Sabe-se que a ativação do receptor por sua proteína específica é um passo fundamental para formação de novos vasos. Portanto, o bloqueio ou inibição de um desses dois fatores torna-se uma ferramenta útil na supressão da angiogênese, e consequente inibição da proliferação e crescimento das células tumorais (FERRARA e KERBEL, 2005).

Embora atualmente ainda não existam relatos na literatura relacionando VEGFR2/3 ao tratamento com curcumina em células tumorais de mama RE-negativo, os resultados do presente estudo apontam que a curcumina é capaz de interagir diretamente com a proteína VEGF e seus receptores, inibindo ou bloqueando esta ligação (SHAHANI et al., 2010). Outros autores também demonstraram a ação da curcumina na regulação da expressão VEGF-A em linhagem de carcinoma de cólon humano (SW480) (CHEN et al., 2010). Além disso, a diminuição do VEGF-C e VEGFR2 também indicam o papel antitumoral da curcumina na formação dos vasos linfáticos. Além disso, recentes estudos têm demonstrado que a curcumina atua na inibição de NF- κ B, que por sua vez regula negativamente a expressão da proteína VEGF-A em tumores de mama e ovário, resultando na diminuição da angiogênese (HUANG et al., 2000; AGGARWAL et al., 2006; Lin, 2007). Assim, a diminuição de VEGF-A e seu receptor VEGFR2 fornecem indícios do efeito antiangiogênico da curcumina no câncer de mama.

Conclusões

VI. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- A curcumina diminui a viabilidade das células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 de forma dependente, potencializando o efeito do tratamento com maior período de exposição.
- Camundongos nude atímicos tratados com curcumina apresentam menor crescimento e proliferação de células tumorais quando comparados aos animais controle. A expressão de VEGFR2/3 nos tumores mamários detectada pelo SPECT foi menor nos animais tratados com curcumina.
- Nos tumores tratados com curcumina, marcadores imuno-histoquímicos revelam que houve diminuição da expressão dos principais fatores relacionados ao processo da angiogênese (VEGF-A, VEGF-C e VEGFR2) e densidade microvascular (vWF). Esses dados corroboram o potencial uso terapêutico da curcumina na angiogênese e no crescimento tumoral

Referências

VII. REFERÊNCIAS

(INCA), I. N. D. C. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde 2014.

AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Res**, v. 23, n. 1A, p. 363-98, 2003 Jan-Feb 2003. ISSN 0250-7005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12680238>>.

AGGARWAL, B. B. et al. Curcumin: the Indian solid gold. **Adv Exp Med Biol**, v. 595, p. 1-75, 2007. ISSN 0065-2598. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569205>>.

AGGARWAL, S. et al. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation. **Mol Pharmacol**, v. 69, n. 1, p. 195-206, Jan 2006. ISSN 0026-895X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16219905>>.

ALI, M. M. et al. Changes in vascular permeability and expression of different angiogenic factors following anti-angiogenic treatment in rat glioma. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8727, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20090952>>.

ALITALO, A. K. et al. VEGF-C and VEGF-D blockade inhibits inflammatory skin carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 73, n. 14, p. 4212-21, Jul 2013. ISSN 1538-7445. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23695550>>.

ARBAB, A. S. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. **Histol Histopathol**, v. 27, n. 5, p. 549-57, May 2012. ISSN 1699-5848. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419019>>.

BIMONTE, S. et al. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 810423, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324975>>.

BLANKENBERG, F. G. et al. In vivo tumor angiogenesis imaging with site-specific labeled (99m)Tc-HYNIC-VEGF. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 33, n. 7, p. 841-8, Jul 2006. ISSN 1619-7070. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699765>>.

_____. Brain uptake of Tc99m-HMPAO correlates with clinical response to the novel redox modulating agent EPI-743 in patients with mitochondrial disease. **Mol Genet Metab**, v. 107, n. 4, p. 690-9, Dec 2012. ISSN 1096-7206. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23084792>>.

BOS, R. et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 6, p. 1573-81, Mar 2003. ISSN 0008-543X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12627523>>.

CAI, Y. Y. et al. Combined effects of curcumin and triptolide on an ovarian cancer cell line. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 7, p. 4267-71, 2013. ISSN 1513-7368. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991988>>.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298-307, May 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593862>>.

CHAKRAVARTI, N. et al. Differential inhibition of protein translation machinery by curcumin in normal, immortalized, and malignant oral epithelial cells. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 3, n. 3, p. 331-8, Mar 2010. ISSN 1940-6215. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145189>>.

CHAN, D. A. et al. Tumor vasculature is regulated by PHD2-mediated angiogenesis and bone marrow-derived cell recruitment. **Cancer Cell**, v. 15, n. 6, p. 527-38, Jun 2009. ISSN 1878-3686. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477431>>.

CHEN, C. et al. Anti-proliferation and anti-angiogenesis of curcumin-K30 solid dispersion. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 35, n. 10, p. 1029-36, Oct 2010. ISSN 1672-7347. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051827>>.

CLAPP, C. et al. Peptide hormone regulation of angiogenesis. **Physiol Rev**, v. 89, n. 4, p. 1177-215, Oct 2009. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789380>>.

DELLI CARPINI, J. et al. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. **Angiogenesis**, v. 13, n. 1, p. 43-58, Mar 2010. ISSN 1573-7209. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20229258>>.

EL HALLANI, S. et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. **Brain**, v. 133, n. Pt 4, p. 973-82, Apr 2010. ISSN 1460-2156. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375132>>.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr Rev**, v. 25, n. 4, p. 581-611, Aug 2004. ISSN 0163-769X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294883>>.

_____. Vascular endothelial growth factor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 6, p. 789-91, Jun 2009. ISSN 1524-4636. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164810>>.

_____. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 1, p. 21-6, Feb 2010. ISSN 1879-0305. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005148>>.

FERRARA, N.; KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 967-74, Dec 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355214>>.

FISCHER, C. et al. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 12, p. 942-56, Dec 2008. ISSN 1474-1768. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029957>>.

FOLKINS, C. et al. Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. **Cancer Res**, v. 69, n. 18, p. 7243-51, Sep 2009. ISSN 1538-7445. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738068>>.

FOSSEY, S. L. et al. The novel curcumin analog FLLL32 decreases STAT3 DNA binding activity and expression, and induces apoptosis in osteosarcoma cell lines. **BMC Cancer**, v. 11, p. 112, 2011. ISSN 1471-2407. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443800>>.

FRANC, B. L. et al. Small-animal SPECT and SPECT/CT: important tools for preclinical investigation. **J Nucl Med**, v. 49, n. 10, p. 1651-63, Oct 2008. ISSN 0161-5505. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794275>>.

FRANK, T. S.; CRITCHFIELD, G. C. Hereditary risk of women's cancers. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 16, n. 5, p. 703-13, Oct 2002. ISSN 1521-6934. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475549>>.

GAVALAS, N. G. et al. Angiogenesis-related pathways in the pathogenesis of ovarian cancer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 8, p. 15885-909, 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23903048>>.

GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell Tissue Res**, v. 314, n. 1, p. 15-23, Oct 2003. ISSN 0302-766X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883993>>.

GREENBERG, S.; RUGO, H. S. Triple-negative breast cancer: role of antiangiogenic agents. **Cancer J**, v. 16, n. 1, p. 33-8, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1540-336X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164688>>.

GRIZZI, F. et al. Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. **BMC Cancer**, v. 5, p. 14, Feb 2005. ISSN 1471-2407. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701176>>.

HAJRASOULIHA, A. R. et al. Vascular endothelial growth factor-C promotes alloimmunity by amplifying antigen-presenting cell maturation and lymphangiogenesis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 3, p. 1244-50, Mar 2012. ISSN 1552-5783. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281820>>.

HALL, G. H. et al. Neuropilin-1 and VEGF correlate with somatostatin expression and microvessel density in ovarian tumours. **Int J Oncol**, v. 27, n. 5, p. 1283-8, Nov 2005. ISSN 1019-6439. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16211223>>.

HICKS, D. G.; KULKARNI, S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer: the importance of accurate human epidermal growth factor receptor 2 testing. **Arch Pathol Lab**

Med, v. 132, n. 6, p. 1008-15, Jun 2008. ISSN 1543-2165. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18517261>>.

HOEBEN, A. et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 4, p. 549-80, Dec 2004. ISSN 0031-6997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15602010>>.

HUANG, S. et al. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. **Cancer Res**, v. 60, n. 19, p. 5334-9, Oct 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034066>>.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1542-4863. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296855>>.

JENSEN, M. M. et al. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. **BMC Med Imaging**, v. 8, p. 16, 2008. ISSN 1471-2342. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18925932>>.

KARNEZIS, T. et al. VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. **Cancer Cell**, v. 21, n. 2, p. 181-95, Feb 2012. ISSN 1878-3686. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22340592>>.

KUNNUMAKKARA, A. B.; ANAND, P.; AGGARWAL, B. B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. **Cancer Lett**, v. 269, n. 2, p. 199-225, Oct 2008. ISSN 1872-7980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479807>>.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products. **Cancer Res**, v. 67, n. 8, p. 3853-61, Apr 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440100>>.

LEE, S. J. et al. Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo. **BMC Cancer**, v. 11, p. 144, 2011. ISSN 1471-2407. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21501498>>.

LEE, T. H. et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. **PLoS Med**, v. 4, n. 6, p. e186, Jun 2007. ISSN 1549-1676. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550303>>.

LERTKHACHONSUK, A. A. et al. Cancer prevention in Asia: resource-stratified guidelines from the Asian Oncology Summit 2013. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 12, p. e497-507, Nov 2013. ISSN 1474-5488. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176569>>.

LI, Y. et al. VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. **J Clin Invest**, v. 118, n. 3, p. 913-23, Mar 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18259607>>.

LIN, J. K. Molecular targets of curcumin. **Adv Exp Med Biol**, v. 595, p. 227-43, 2007. ISSN 0065-2598. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569214>>.

MEJIA, J. et al. A clinical gamma camera-based pinhole collimated system for high resolution small animal SPECT imaging. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 12, p. 1160-6, Dec 2010. ISSN 1414-431X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085887>>.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. **J Cell Mol Med**, v. 17, n. 1, p. 30-54, Jan 2013. ISSN 1582-4934. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301832>>.

MITO, S. et al. Curcumin ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 7, p. 974-9, 2011. ISSN 1347-5215. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720000>>.

NASH, A. D. et al. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). **Pulm Pharmacol Ther**, v. 19, n. 1, p. 61-9, 2006. ISSN 1094-5539. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286239>>.

PALANGE, A. L. et al. Modulating the vascular behavior of metastatic breast cancer cells by curcumin treatment. **Front Oncol**, v. 2, p. 161, 2012. ISSN 2234-943X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23162792>>.

PARK, W. et al. New perspectives of curcumin in cancer prevention. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 6, n. 5, p. 387-400, May 2013. ISSN 1940-6215. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466484>>.

PATEL, B. B.; MAJUMDAR, A. P. Synergistic role of curcumin with current therapeutics in colorectal cancer: minireview. **Nutr Cancer**, v. 61, n. 6, p. 842-6, 2009. ISSN 1532-7914. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20155625>>.

PATENAUDE, A.; PARKER, J.; KARSAN, A. Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization. **Microvasc Res**, v. 79, n. 3, p. 217-23, May 2010. ISSN 1095-9319. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085777>>.

PERRY, M. C. et al. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, n. 8, p. 1192-201, Aug 2010. ISSN 1613-4133. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20087857>>.

PISANO, M. et al. Enhanced anti-tumor activity of a new curcumin-related compound against melanoma and neuroblastoma cells. **Mol Cancer**, v. 9, p. 137, 2010. ISSN 1476-4598. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525240>>.

RUAN, K.; SONG, G.; OUYANG, G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. **J Cell Biochem**, v. 107, n. 6, p. 1053-62, Aug 2009. ISSN 1097-4644. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19479945>>.

RUNDQVIST, H.; JOHNSON, R. S. Tumour oxygenation: implications for breast cancer prognosis. **J Intern Med**, v. 274, n. 2, p. 105-12, Aug 2013. ISSN 1365-2796. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844914>>.

SADRI, N.; ZHANG, P. J. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas. **Cancers (Basel)**, v. 5, n. 2, p. 320-33, 2013. ISSN 2072-6694. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24216979>>.

SEMENZA, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. **Trends Mol Med**, v. 8, n. 4 Suppl, p. S62-7, 2002. ISSN 1471-4914. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927290>>.

_____. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. **J Clin Invest**, v. 123, n. 9, p. 3664-71, Sep 2013. ISSN 1558-8238. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999440>>.

SHAHANI, K. et al. Injectable sustained release microparticles of curcumin: a new concept for cancer chemoprevention. **Cancer Res**, v. 70, n. 11, p. 4443-52, Jun 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460537>>.

SHAN, B. et al. Curcumin suppresses HIF1A synthesis and VEGFA release in pituitary adenomas. **J Endocrinol**, v. 214, n. 3, p. 389-98, Sep 2012. ISSN 1479-6805. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739211>>.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: the story so far. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1955-68, Sep 2005. ISSN 0959-8049. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081279>>.

SHIBUYA, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1097-105, Dec 2011. ISSN 1947-6027. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22866201>>.

SHISHODIA, S. Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 37-55, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1872-8081. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996381>>.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 1, p. 9-29, Jan 2014. ISSN 1542-4863. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24399786>>.

STEFANINI, M. O. et al. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. **BMC Syst Biol**, v. 2, p. 77, 2008. ISSN 1752-0509. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18713470>>.

STEIN, J. D. et al. Diffusion of technologies for the care of older adults with exudative age-related macular degeneration. **Am J Ophthalmol**, v. 155, n. 4, p. 688-96, 696.e1-2, Apr 2013. ISSN 1879-1891. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219066>>.

SUBRAMANIAM, D. et al. Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. **Mini Rev Med Chem**, v. 10, n. 5, p. 359-71, May 2010. ISSN 1875-5607. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370703>>.

SUN, A. et al. Curcumin analog cytotoxicity against breast cancer cells: exploitation of a redox-dependent mechanism. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 23, p. 6627-31, Dec 2009. ISSN 1464-3405. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854644>>.

SUN, X. J. et al. [The influence of COX-2 depressant in angiogenesis of oral squamous cell carcinoma]. **Shanghai Kou Qiang Yi Xue**, v. 21, n. 4, p. 366-9, Aug 2012. ISSN 1006-7248. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23135108>>.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, n. 3, p. 227-41, Sep 2005. ISSN 0143-5221. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104843>>.

TANEJA, P. et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. **Clin Med Insights Oncol**, v. 4, p. 15-34, 2010. ISSN 1179-5549. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567632>>.

TAIMEH, Z. et al. Vascular endothelial growth factor in heart failure. **Nat Rev Cardiol**, v. 10, n. 9, p. 519-30, Sep 2013. ISSN 1759-5010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856679>>.

TUNG, K. H. et al. CHC promotes tumor growth and angiogenesis through regulation of HIF-1 α and VEGF signaling. **Cancer Lett**, v. 331, n. 1, p. 58-67, Apr 2013. ISSN 1872-7980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228632>>.

VILLEGAS, I.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C. New mechanisms and therapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, n. 9, p. 1040-61, Sep 2008. ISSN 1613-4133. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18655004>>.

WANG, C. A. et al. SIX1 induces lymphangiogenesis and metastasis via upregulation of VEGF-C in mouse models of breast cancer. **J Clin Invest**, v. 122, n. 5, p. 1895-906, May 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466647>>.

WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. **N Engl J Med**, v. 324, n. 1, p. 1-8, Jan 1991. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1701519>>.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. α V integrins in angiogenesis and cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, p. a006478, Sep 2011. ISSN 2157-1422. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229119>>.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition. **Exp Neurol**, v. 197, n. 2, p. 309-17, Feb 2006. ISSN 0014-4886. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16364299>>.

WU, A. H. et al. Body size, hormone therapy and risk of breast cancer in Asian-American women. **Int J Cancer**, v. 120, n. 4, p. 844-52, Feb 2007. ISSN 0020-7136. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17131315>>.

YANG, C. L. et al. Curcumin blocks small cell lung cancer cells migration, invasion, angiogenesis, cell cycle and neoplasia through Janus kinase-STAT3 signalling pathway. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37960, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22662257>>.

YU, H.; MOHAN, S.; NATARAJAN, M. Radiation-Triggered NF- κ B Activation is Responsible for the Angiogenic Signaling Pathway and Neovascularization for Breast Cancer Cell Proliferation and Growth. **Breast Cancer (Auckl)**, v. 6, p. 125-35, 2012. ISSN 1178-2234. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22872788>>.

YUE, X. et al. Comparative study of the neurotrophic effects elicited by VEGF-B and GDNF in preclinical in vivo models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 258, p. 385-400, Jan 2014. ISSN 1873-7544. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291725>>.

ZUBAIR, A.; FRIERI, M. Role of nuclear factor- κ B in breast and colorectal cancer. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 13, n. 1, p. 44-9, Feb 2013. ISSN 1534-6315. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956391>>.

Apêndice

VIII. APÊNDICE

Apêndice A: Protocolos de preparo das soluções.

¹Preparação da solução inicial de curcumina

- 5 mg (1 M = 368,38 g)
- 1 ml de água E-Pureautoclavada

² **PBS** Cloreto de Sódio ----- 16,36 g
Fosfato de Sódio Dibásico ----- 2,1 g
Fosfato de Sódio Monobásico di-hidratado ----0,6 g
Água Destilada ----- 2000 mL

³ **Tampão citrato (pH 6,0)** Ácido Cítrico ----- 2,1g
Água Destilada ---- 1000mL

Anexos

IX. ANEXOS

ANEXO A

Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Comissão de Ética na
Experimentação Animal

CEEA

FAMERP

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA

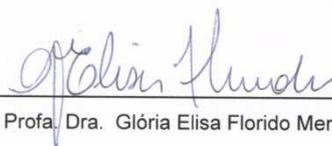
FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/

DELIBERAÇÃO CEEA Nº 012/2011

A Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEEA/FAMERP, em reunião desta data analisou o projeto de pesquisa intitulado “**Ação da Curcumina na Angiogênese em Modelo Experimental de Câncer de Mama**” (Protocolo FAMERP nº5982/2011), sob responsabilidade da Profª. Drª. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, e deliberou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e encontra-se **APROVADO** por essa Comissão.

Atenção: Ao final do estudo o pesquisador deverá preencher o Formulário do Relatório Final e enviar ao CEEA.

São José do Rio Preto, 27 de outubro de 2011.



Profª. Dra. Glória Elisa Florido Mendes

Vice-Presidente da CEEA

FAMERP

ANEXO B

Parecer do “Institutional Animal Care and User Committee”, do Hospital Henry Ford, Detroit – MI, USA.

Research Administration
CFP-Basement 046
2799 West Grand Boulevard
Detroit, MI 48202-2689
(313) 916-2024 Office
(313) 916-2018 Fax

June 15, 2012

To: Ali S. Arbab, M.D., Ph.D.
Radiology

Fm: Frederick Valeriote, Ph.D., Chair
Robert Knight, Ph.D., Vice Chair
Institutional Animal Care and Use Committee

Re: **“Detection of Activation of Angiogenic Factor in Mouse Model of Breast Cancer”** (IACUC No. 1203)

Period of IACUC Approval: **June 13, 2012 through June 12, 2015**

Number of Animals Approved: 640 Athymic NCr mice

Dear Dr. Arbab:

Thank you for responding to IACUC concerns. All concerns have been adequately addressed and full approval has been granted.

The expiration date for this study is June 12, 2015. In order to remain compliant with federal regulations, a new, complete IACUC Protocol must be submitted for full board review if you intend to proceed with this line of work beyond the above indicated expiration date. A Final Report must be submitted at the completion of the 3-year approval period or upon early termination of the project.

Any adverse effects on animals must be reported to the IACUC as soon as possible.

A copy of the signed and stamped protocol indicating approval of the Institutional Animal Care and Use Committee is enclosed for your files. Please feel free to contact Wendy Parrish at 916.2315 if you have any questions regarding this matter.

Enc.

cc: Bioresources