

ANA FLÁVIA DE CARVALHO RIBEIRO

**Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da  
*Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot***

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas  
Gerais como requisito parcial para a obtenção do  
grau de Doutor em Ciência Animal  
Área: Toxicologia e plantas tóxicas  
Orientadora: Profa. Dra. Marília Martins Melo  
Co-orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elaine Maria Souza-Fagundes  
Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2012

R484a Ribeiro, Ana Flávia de Carvalho, 1975-  
Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot / Ana Flávia de Carvalho Ribeiro. – 2012.  
92 p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo  
Co-orientadores: Elaine Maria Souza Fagundes, Geovanni Dantas Cassali  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Medicina popular – Teses. 2. Plantas medicinais – Teses. 3. Agentes antiinflamatórios – Teses. I. Melo, Marília Martins. II. Fagundes, Elaine Maria Souza. III. Cassali, Geovanni Dantas. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

**CDD – 581.634**



Tese defendida e aprovada em 20 de janeiro de 2012, pela Comissão examinadora constituída por:

---

Profa. Dra. Marília Martins Melo  
Presidente

---

Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Melo

---

Profa. Dra. Jane Lima dos Santos

---

Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli

---

Profa. Dra. Silvia Passos Andrade



À minha querida e amada família!

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Marília M. Melo por acreditar desde o primeiro momento nesse trabalho, incentivar e me dar oportunidade de desenvolver esse projeto. Pela orientação durante esses quatro anos, formação de parcerias imprescindíveis para sua realização, pelos valiosos conselhos e ensinamentos. Pelo incentivo nos meus maiores momentos de dúvida! Meu sincero agradecimento e gratidão!

À Profa. Elaine Maria Souza Fagundes pela co-orientação, por me acolher em seu laboratório e pela disponibilidade e dedicação no desenvolvimento dos experimentos. Mas principalmente, agradeço pelo entusiasmo contagiante com o qual se dedica ao estudo das substâncias antitumorais! Muito obrigada por tudo!

Ao prof. Geovanni Dantas Cassali pela co-orientação, pelo auxílio a todo e qualquer momento, sempre disposto a me ajudar!

À Vany Ferraz pela colaboração e ensinamentos. Meus primeiros passos na química de extração de extratos.

À Profa. Silvia Passos por ter me acolhido em seu laboratório, ter gentilmente contribuído com materiais e auxiliado na execução de parte desse trabalho.

À Profa. Miriam Lopes por ter concedido as células 4T1, que são o futuro mais próximo da continuação desse trabalho.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pela acolhida no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – LBDM do Instituto de Pesquisa René Rachou – Fiocruz.

À Dra. Andrea Teixeira do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – LBDM pelo auxílio nas análises de caracterização fenotípica celular, pelas críticas e sugestões que tanto contribuíram para a qualidade desse trabalho. Muito obrigada.

Ao Prof. Francisco César Lobato pela acolhida em seu laboratório e ao seu aluno de doutorado Rodrigo Otávio Silva pela amizade e ajuda com a liofilização dos extratos.

Aos membros da banca por gentilmente dispor de seu tempo para contribuir com a qualidade deste trabalho.

Ao Danilo da UPD pelas tantas análises estatísticas.

Ao Fabiano Aurélio do Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO pelo auxílio com as análises cromatográficas, pelo agradável convívio e pelas sugestões sempre pertinentes.

À Laís, aluna de doutorado do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – LBDM, pelo grande auxílio nos experimentos *ex vivo* e pela troca de experiências.

Às queridas companheiras de pesquisa Thalita, Carlinha, Maira, Marina e Mariana pela amizade, pelos momentos de alegria compartilhados e por toda ajuda na execução dos experimentos.

Aos alunos do laboratório de toxicologia, Anne, Lucas, Danilo e Lilian pela grande ajuda na execução dos experimentos.

À aluna de mestrado Ariádine pela ajuda e presteza com que sempre se dispôs a me ajudar.

Às alunas Juliana e Gabrielle, orientadas da profa. Elaine, pelo auxílio no desenvolvimento de todo o experimento *in vitro*.

À Paula pela ajuda na realização dos experimentos com o modelo murinho de implante de esponjas.

À aluna de doutorado Cristina Maria por me ensinar a trabalhar com as células de Ehrlich.

Às amigas Cris, Pat Alaggio, Ana Luiza, Karine, Izabella, Liw, Carola e Natty que estiveram sempre perto, acompanhando toda minha trajetória, apoiando, estimulando e ouvindo tantas indagações sobre esse trabalho!

Agradeço à minha família, apoio incondicional.

Ao Roberto Ferreira Machado Michel, que com um sorriso ou com uma palavra de estímulo sempre me acalmou a alma.

À Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC e aos professores que sempre me apoiaram.

À Fapemig pelo apoio financeiro (Edital Universal 2008) e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

AGP:  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida ou orosomucoide  
ALT: aspartato aminotransferase  
ANOVA: análise de variância  
AST: alanina aminotransferase  
bFGF : fator de crescimento fibroblástico básico  
CA1: camada aquosa 1  
CA2: camada aquosa 2  
CA3: camada aquosa 3  
CETEA: Comitê de Ética para Experimentação Animal  
CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média  
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência  
CO1: camada orgânica 1  
CO2: camada orgânica 2  
CO3: camada orgânica 3  
COX-2: ciclooxigenase tipo 2  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
EAB: extrato aquoso bruto  
EDTA: *Ethylene diamine tetraacetic acid*  
EE: extrato etanólico  
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
EPO: peroxidase de eosinófilo  
FMLP: formyl-methionil-leucyl-phenylalanine  
Hb: Hemoglobina  
HCM: hemoglobina corpuscular média  
HE: Hematoxilina-Eosina  
Hp: haptoglobina  
HE: hematoxilina e eosina  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio  
HIF-1: fator de transcrição induzido por hipóxia  
HTAB: Brometo de hexadeciltrimetilamônio  
HPLC: *high performance liquid chromatography*  
IC50: concentração inibitória de 50% do crescimento celular  
I $\kappa$ B- $\alpha$ : I $\kappa$ B kinase- $\alpha$   
IKK: I $\kappa$  kinase  
IL: interleucina

IFN-  $\gamma$ : interferon  $\gamma$   
iNOS: óxido nítrico sintase induzida  
MAC: extrato metanólico  
MHC: complexo principal de histocompatibilidade  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- brometo de difenil tetrazolium  
MPO: mieloperoxidase  
NAG: N-acetil glicosaminidase  
NF-kB: fator nuclear kB  
NK: natural killer  
NO: óxido nítrico  
OD: Densidade ótica  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
FPA: proteínas de fase aguda  
PI: iodeto de propídeo  
PMNs: polimorfonucleares  
PV: peso vivo  
ROS: espécies reativas de oxigênio  
SNK: Student Newman Keuls  
SAA: amilóide sérico A  
TGF  $\beta$ : fator de crescimento transformante  $\beta$   
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$   
VCM: volume corpuscular médio  
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular  
VGM: volume globular médio

---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>18</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 1. Revisão de literatura.....</b>	<b>20</b>
1. Produtos naturais e agentes antitumorais derivados de plantas medicinais.....	20
2. <i>Arrabidaea chica</i> .....	22
2.1. Descrição botânica .....	22
2.2. Composição química.....	23
2.3. Ação biológica.....	25
2.4. Toxicidade.....	26
3. Tumor de Ehrlich.....	27
<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 2. Atividade citotóxica e pró-apoptótica de extratos da <i>Arrabidaea chica</i> em linhagens de células tumorais leucêmicas e mamária <i>in vitro</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>30</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>31</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>



<b>CAPÍTULO 3. Atividade anti-inflamatória e antiangiogênica do extrato etanólico e fração aquosa CA3 da <i>Arrabidaea chica</i> .....</b>	<b>47</b>
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÃO.....	63
<b>CAPÍTULO 4. Efeito de extratos da <i>Arrabidaea chica</i> sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich.....</b>	<b>64</b>
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
INTRODUÇÃO.....	66
MATERIAL E MÉTODOS.....	66
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
CONCLUSÃO.....	84
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1	Conteúdo total de flavonóides em preparados de <i>A. chica</i> . .....	24
Tabela 2	Inibição da proliferação celular em células Jurkat e HL60. ....	39
Tabela 3	Inibição da proliferação celular em células Jurkat, HL60 e MCF-7. ....	40
Tabela 4	Valores de IC <sub>50</sub> dos extratos etanólico-EE e fração EE-CO3 nas linhagens celulares Jurkat e HL60. ....	43
Tabela 5	Fragmentação do DNA de células Jurkat e HL60 (%). ....	44
Tabela 6	Função renal e hepática de camundongos com implantes de esponja tratados com os extratos etanólico-EE (300mg/kg) e aquoso CA3 (300mg/kg) da <i>A. chica</i> . Concentração sérica de uréia, creatinina, ALT e AST.....	55
Tabela 7	Mensuração da espessura da pata após inoculação do tumor de Ehrlich em camundongos tratados com diferentes extratos da <i>A. chica</i> por 10 dias .....	70
Tabela 8	Peso médio corporal dos camundongos tratados ou não com extratos da <i>A. chica</i> por 10 dias. ....	74
Tabela 9	Peso (g) relativo do fígado e baço de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich tratados com diferentes extratos da <i>A. chica</i> por 10 dias. ....	74
Tabela 10	Parâmetros hematológicos de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich tratados com extratos aquosos e etanólico da <i>Arrabidaea chica</i> por 10 dias. ....	75
Tabela 11	Leucograma de camundongos Swiss portadores do tumor de Ehrlich tratados com extratos aquosos e etanólico da <i>A. chica</i> . ....	76
Tabela 12	Perfil plasmático de proteínas total e fracionadas de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich tratados com diferentes extratos da <i>A. chica</i> . ....	77

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	Foto de um exemplar de <i>Arrabidaea chica</i> . ....	22
Figura 2	Estrutura química da carajurina. Fonte: Devia et al., 2002.....	23
Figura 3	Estrutura química da carajuflavona. Fonte: Takemura et al., 1995. ....	24
Figura 4	Estrutura química de 4'-hidroxi-3,7-dimethoxiflavone. Fonte: Barbosa et al., 2008. ....	24
Figura 5	Classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico da <i>A. chica</i> . ....	25
Figura 6	Metodologia de extração do extrato aquoso bruto e obtenção das frações aquosas da <i>A. chica</i> . ....	33

Figura 7	Fracionamento do extrato etanólico da <i>A. chica</i> .	34
Figura 8	Perfil cromatográfico do extrato aquoso bruto-EAB (linha preta) e frações aquosas CA2 (linha vermelha), CO2 (linha verde) e CO3 (linha azul). Condições cromatográficas: Fase móvel: A: Metanol e B: tampão fosfato pH 4,5, gradiente de 0%A a 100% A em 30 min. Detector UV-Vis, detecção em $\lambda=280\text{nm}$ (A) e $\lambda=450\text{nm}$ (B).	36
Figura 9	Perfil cromatográfico do extrato metanólico-MAC. Condições cromatográficas: Fase móvel: A: Metanol e B: tampão fosfato, pH 4,5, gradiente de 0%A a 100% A em 30 min. Detector UV-Vis, detecção em $\lambda=450\text{nm}$ .	36
Figura 10	Perfil cromatográfico qualitativo do extrato EE-CO3. Condições cromatográficas: Fase móvel: A: Metanol e B: tampão fosfato pH 4,5, gradiente de 0%A a 100% A em 30 min. Detector UV-Vis, detecção em $\lambda=280\text{nm}$ (linha preta) ou $\lambda=450\text{nm}$ (linha rosa).	37
Figura 11	Perfil cromatográfico qualitativo de uma amostra contendo os três padrões de flavonóides (campferol, rutina e quercetina) em rosa e perfil do extrato etanólico-EE em preto. Nota-se a presença de campferol no EE pelo pico presente aos 28,5 min. Condições cromatográficas: Fase móvel: A: Metanol e B: tampão fosfato pH 4,5, gradiente de 0%A a 100% A em 30 min. Detector UV-Vis, detecção em $\lambda=370\text{nm}$ .	37
Figura 12	Perfil cromatográfico qualitativo para comparação dos extratos aquoso bruto-EAB (azul), etanólico-EE (vermelho) e metanólico-MAC (preto). Condições cromatográficas: Fase móvel: A: Metanol e B: tampão fosfato pH 4,5, gradiente de 0%A a 100% A em 30 min. Detector UV-Vis, detecção em $\lambda=450\text{nm}$ (A) e $\lambda=280\text{nm}$ (B).	38
Figura 13	Porcentagem da inibição da proliferação de células Jurkat e HL60 após o tratamento com extratos da <i>A. chica</i> (50 $\mu\text{g/mL}$ ) ou vincristina (1 $\mu\text{g/mL}$ ) por 48h. Os dados representam as medias de dois experimentos independentes realizados em triplicata.	39
Figura 14	Porcentagem da inibição da proliferação de células Jurkat e HL60 após o tratamento com extratos da <i>A. chica</i> (25, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ ) ou vincristina (1 $\mu\text{g/mL}$ ) por 48h. Os dados representam as medias de três experimentos independentes realizados em triplicata.	41
Figura 15	Curvas representativas da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular dos extratos etanólico EE e sua fração CO3 em linhagens leucêmicas. As linhagens foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos por 48 horas e a viabilidade das células foi determinada pelo ensaio de MTT. Dados representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata.	42
Figura 16	Avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide de células HL60 e Jurkat tratadas com os extratos etanólico e aquoso CA3 da <i>A. chica</i> e vincristina (controle positivo) ou DMSO (controle negativo). Dados representativos de três experimentos independentes (* $p<0,001$ , teste T-Student).	44

Figura 17	Avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide de células HL60 tratadas com os extratos etanólico e aquoso CA3 da <i>A. chica</i> . Células foram incubadas com os extratos a 50ug/mL durante 24 horas, e posteriormente, marcadas com iodeto de propídeo e quantificadas por citometria de fluxo. Dados representativos três experimentos independentes (* p<0,05, teste T-Student). Histograma apresenta o conteúdo de DNA (eixo X, fluorescência do IP) versus número de eventos (eixo Y). .....	45
Figura 18	Avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide de células Jurkat tratadas com os extratos etanólico e aquoso CA3 da <i>A. chica</i> . Células foram incubadas com os extratos a 50ug/mL durante 24 horas, e posteriormente, marcadas com iodeto de propídeo e quantificadas por citometria de fluxo. Dados representativos de três experimentos independentes (* p<0,05, teste T-Student). Histograma apresenta o conteúdo de DNA (eixo X, fluorescência do IP) versus número de eventos (eixo Y).....	46
Figura 19	Curva padrão da concentração de hemoglobina em ug/mL. ....	51
Figura 20	Curva padrão da concentração de NAG em nmol/L. ....	52
Figura 21	Curva padrão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em pg/mL.....	53
Figura 22	Fotografia dos implantes de esponja retirados dos animais dos grupos controle e tratados com os extratos aquoso CA3 e etanólico-EE da <i>A. chica</i> . ....	54
Figura 23	Peso úmido (g) dos implantes (A) e concentração de Hb em ug/mL (B) dos grupos controle (salina) e tratados com o extrato etanólico (EE) ou a fração aquosa CA3 (CA3) da <i>A. chica</i> . Não houve diferença para peso úmido entre os grupos tratados e o grupo controle. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. * P <0,05. ....	55
Figura 24	Atividades das enzimas MPO (A) e NAG (B) nos grupos controle (salina) e tratados com o extrato etanólico (EE) ou a fração aquosa CA3 (CA3) da <i>A. chica</i> . Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. * P <0,01. ....	57
Figura 25	Concentração de Hb nos implantes nos grupos controle e tratados com extrato etanólico (EE) ou fração aquosa (CA3) da <i>A. chica</i> . Os resultados foram apresentados como média±desvio padrão. * P <0,05. ....	57
Figura 26	Concentração de VEGF nos grupos controle e tratados com extrato etanólico (EE) ou fração aquosa (CA3) da <i>A. chica</i> . Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. * P<0,05. ....	58
Figura 27	Efeito dos extratos aquoso CA3 (300mg/kg) e etanólico EE (300mg/kg) da <i>A. chica</i> sobre a concentração de citocinas no soro de camundongos com implantes de esponja: TNF-a (A), IFN-γ (B) and IL-5 (C). Não houve diferença entre os grupos testados (p<0.05). Valores indicam média e desvio padrão de 8 animais por grupo. ....	59
Figura 28	Efeito dos extratos aquoso CA3 (300mg/kg) e etanólico EE (300mg/kg) da <i>A. chica</i> sobre a concentração de TNF-α nos implantes de esponja: Não houve diferença entre os grupos estudados (p<0.05). Valores indicam média e desvio padrão de 8 animais por grupo. ....	60
Figura 29	Valores de globulinas plasmáticas de camundongos com implante de esponja tratados com diferentes extratos de <i>A. chica</i> . ....	61

Figura 30	Valores de proteína total e albumina séricas e relação albumina:globulina de camundongos com implantes de esponja tratados com diferentes extratos de <i>A. chica</i> . .....	61
Figura 31	Fotomicrografias de esponjas implantadas em camundongos Swiss (HE). A) Esponja de animal do grupo controle. Grande quantidade de tecido de granulação e abundante infiltrado inflamatório neutrofilico-histiocitário, 10x. B) Esponja de animal do grupo controle. Presença de células gigantes (seta) no infiltrado inflamatório, 40x. C) Esponja de animal do grupo controle. Neutrófilos infiltrados no implante, 40x. D) Esponja de animal tratado com extrato etanólico-EE apresentando tecido de granulação com moderado infiltrado inflamatório, 10x. E) Maior aumento do implante de esponja da foto D. Tecido fibrovascular contendo vasos neoformados, fibroblastos e discreta presença de infiltrado inflamatório histiocítico linfocitário, 40x. F) Animal tratado pela fração aquosa CA3. Tecido de granulação com moderada infiltração de células inflamatórias, 10x. G) Maior aumento do implante de esponja da foto F. Presença de fibroblastos, vasos neoformados com discreto infiltrado inflamatório histiocítico linfocitário, 40x. ....	62
Figura 32	Curva de crescimento do tumor sólido de Ehrlich tratados com extratos da <i>A. chica</i> . .....	70
Figura 33	Fotomicrografias (HE) de tumores de Ehrlich em coxim plantar de camundongos. A) Perda de tecidos muscular e ósseo em animal do grupo EE pela infiltração das células tumorais, 5x. B) Extensa área de necrose (*) próxima ao parênquima tumoral viável em animal do grupo controle, 10x. C) Células tumorais grandes com núcleo oval contendo múltiplos nucléolos evidentes e citoplasma vacuolizado com bordas indistintas. Área de necrose (*). Animal do grupo CA3, 40x. D) Células tumorais pequenas, alongadas, com núcleo condensado e citoplasma com bordas indistintas. Animal do grupo EE, 40x. E) Infiltrado inflamatório com poucos neutrófilos (seta) em animal do grupo controle, 40x. F) Grande quantidade de neutrófilos (seta), na maioria degenerados, infiltrados no tecido tumoral de animal do grupo EE, 40x. ....	73
Figura 34	Análise das células inflamatórias mononucleares infiltradas no tumor de Ehrlich. Os histogramas (A) representam o perfil celular da população de linfócitos selecionada no gate R2, em gráfico de tamanho (FSC) versus granulocidade (SSC). Os histogramas (B) representam o perfil de análise da população de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> . É bastante evidente a ausência de células associadas ao tumor no animal do grupo CA3, comparado ao animal do grupo controle. ....	80
Figura 35	Análise ex vivo do percentual de subpopulações de linfócitos de tecido tumoral de camundongos Swiss submetidos a diferentes tratamentos com extratos de <i>A. chica</i> . .....	81
Figura 36	Análise ex vivo do percentual de subpopulações de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> no sangue de camundongos Swiss submetidos a diferentes tratamentos com extratos de <i>A. chica</i> . .....	83
Figura 37	Análise ex vivo do percentual de subpopulações de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> no sangue de camundongos Swiss submetidos a diferentes tratamentos com extratos de <i>A. chica</i> . .....	83
Figura 38	Análise ex vivo do percentual de subpopulações de linfócitos B (CD19 <sup>+</sup> ) e células NK <sup>+</sup> no sangue de camundongos Swiss submetidos a diferentes tratamentos com extratos de <i>A. chica</i> . Os resultados foram expressos como média±desvio padrão do percentual da subpopulação avaliada. ....	84

## RESUMO

A medicina tradicional baseada no uso de plantas medicinais desempenha um papel importante na saúde da população dos países pouco desenvolvidos e em desenvolvimento. A *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot (Bignoniaceae) é uma planta comum na região amazônica e suas folhas são utilizadas na medicina popular para cicatrização de feridas, tratamento de inflamações, cólicas intestinais, hemorragia, anemia e leucemia. Seu efeito antiinflamatório já foi demonstrado *in vitro* e *in vivo*, entretanto não foram encontrados relatos na literatura quanto à sua atividade antitumoral. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade citotóxica dos extratos etanólico, metanólico e aquosos da *A. chica* em linhagens de células tumorais humanas e em camundongos Swiss portadores do carcinoma sólido de Ehrlich. Foram preparados diferentes extratos a partir de folhas secas da *A. chica* extraídos com água, metanol ou etanol e verificada a presença de flavonóides pela cromatografia líquida de alta eficiência. Em estudos *in vitro*, o extrato etanólico (EE) apresentou atividade citotóxica contra as células tumorais Jurkat, HL60 e MCF-7, com valores de IC<sub>50</sub> para Jurkat e HL60 de 27,9µg/mL e 26,9µg/mL, respectivamente. Ensaio de citometria de fluxo demonstraram que esse extrato (EE) induziu fragmentação do DNA celular, sugerindo que a toxicidade apresentada pelos compostos pode estar relacionada com a indução de morte por apoptose. Nos estudos *in vivo*, conduzidos em camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich, foram realizados ensaios bioquímicos e hematológicos, avaliação do desenvolvimento tumoral e imunofenotipagem por citometria de fluxo das células inflamatórias mononucleares presentes no sangue e tecido tumoral. Os extratos EE e CA3, após 10 dias de administração oral na concentração de 30mg/kg, causaram redução no volume do tumor sólido de Ehrlich (p<0,05), sem causar alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos plasmáticos. O grupo tratado com o extrato EE apresentou aumento dos neutrófilos e das  $\alpha 1$  e  $\beta$  globulinas, e diminuição das  $\alpha 2$  globulinas. A imunofenotipagem das células mononucleares no sangue, demonstraram que os extratos EE e CA3 da *A. chica* reduzem a porcentagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> sem alterar o número total de linfócitos TCD3<sup>+</sup>, NK e linfócitos B. O extrato CA3 apresentou atividade imunomoduladora diminuindo o número de células TCD3<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e células NK no tecido tumoral, sem alterar o percentual de linfócitos B e TCD4<sup>+</sup>. Ainda neste contexto, também foi possível avaliar a atividade antiinflamatória dos extratos etanólico-EE e CA3 em modelo murino de implante de esponja. Os extratos EE e CA3, administrados por via oral, na dose de 300mg/kg inibiram a neovascularização e o recrutamento de neutrófilos para as esponjas implantadas. Os extratos não produziram efeitos tóxicos nos camundongos nas doses utilizadas em nenhum dos estudos. Conclui-se que o extrato etanólico e a fração aquosa CA3 da

*Arrabidaea chica* apresentam efeito antitumoral após a administração oral, confirmando o seu valor terapêutico como indicado pela medicina popular. A atividade do extrato EE parece estar relacionada ao potencial citotóxico e pró-apoptótico, bem como seu potencial antiinflamatório e antiangiogênico, confirmados nos estudos *in vivo* no modelo de Ehrlich. A ação antitumoral da fração aquosa CA3 está possivelmente relacionada à sua atividade antiinflamatória e antiangiogênica. Os resultados sugerem potencial biotecnológico dos extratos da *A. chica* para obtenção de princípios ativos antitumorais.

Palavras-Chave: *Arrabidaea chica*, Bignoniaceae, flavonóides, atividade antitumoral, atividade antiinflamatória

## ABSTRACT

In developing countries traditional medicine based on the use of plant extracts play a major role in health care. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot (Bignoniaceae) is a common plant in the Amazon region. Its leaves are widely used in folk medicine for wound healing, treatment of inflammation, intestinal colic, blood dysfunction, anemia, hemorrhage and leukemia. The anti-inflammatory effect of its extract was already demonstrated *in vitro* and *in vivo*. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxic activity of extracts of *A. chica* against human tumor cell lines. Also evaluate the *in vivo* antitumor activity in mice bearing solid Ehrlich tumor by hematological and biochemical studies, evaluation of the development of the tumor and immunophenotyping of mononuclear inflammatory cells in blood and associated with tumor tissue. The anti-inflammatory activity was evaluated using the murine sponge model. Methanol, ethanol and aqueous extracts were obtained from dried lives of *A. chica*. The presence of the flavonoid kaempferol was verified by high performance liquid chromatography. The ethanol extract (EE) showed cytotoxic activity against Jurkat and HL60 leukemic cells, with IC50 values of 27.9 mg / mL and 26.9 mg / mL, respectively. Also, ethanol extract-EE induced DNA fragmentation assessed by flow cytometry assay, suggesting that the toxicity presented may be related to induction of apoptosis. The ethanol-EE and CA3 extracts, administered orally at a dose of 300mg/kg presented anti-inflammatory activity assessed by the murine sponge model. Both extracts inhibited neovascularization and recruitment of neutrophils to the sponges without altering the macrofage mobilization and vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration. There was a reduction in solid tumor volume in mice treated with EE and CA3 (30mg/kg) after 10 days of daily oral administration ( $p < 0,05$ ) without changes in hematological and biochemical parameters. The ethanol extract-EE increased neutrophils and  $\alpha 1$  and  $\beta$  globulins, and decreased  $\alpha 2$  globulins. The ethanol-EE and CA3 extracts reduced the percentage of T CD4<sup>+</sup> cells on blood without altering TCD3<sup>+</sup>, NK and B lymphocytes. The aqueous fraction CA3 showed immunomodulatory activity by reducing the number of TCD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and NK cells in tumor tissue, without altering the percentage of B and T CD4<sup>+</sup> cells. The extracts did not produce toxic effects in mice in either study. It is concluded that the ethanol extract and aqueous fraction CA3 of *A. chica* have antitumor effect after oral administration, confirming its use in traditional medicine. The activity of the ethanol extract-EE seems to be related to the potent cytotoxic and pro-apoptotic activities, as well as its anti-inflammatory and antiangiogenic activities. The antitumor effect presented by the aqueous fraction CA3 is possibly related to their anti-inflammatory and antiangiogenic activities. These results suggest biotechnological potential of the extracts of *A. chica* for obtaining new antitumor drugs.

*Keywords:* *Arrabidaea chica*, Bignoniaceae, flavonoids, antitumor activity, anti-inflammatory activity



## INTRODUÇÃO

O câncer é a principal causa de mortalidade em todo o mundo (Kumar et al., 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê 84 milhões de mortes por câncer nos próximos 10 anos. O quadro é mais grave nos países pouco desenvolvidos e em desenvolvimento pela limitação ou inexistência de recursos disponíveis para a prevenção, diagnóstico, cuidados com o paciente e tratamento. Apesar da grande evolução em relação aos conhecimentos básicos sobre etiologia, progressão e prognóstico da doença, o mesmo não se reflete no desenvolvimento de técnicas eficientes de prevenção e cura. Novas estratégias para redução de mortes por câncer são necessárias (Kumar et al., 2007; Raj Kapoor et al., 2007).

Ao longo da história, os produtos naturais têm proporcionado uma rica fonte de compostos com aplicações nos campos da medicina, farmácia e biologia. Dentro da esfera do câncer, um número importante de novos medicamentos comercializados foi obtido de fontes naturais (Mann, 2002; Molinski et al., 2009). Segundo a OMS (2002), a utilização de medicamentos provenientes de plantas medicinais na forma de tintura, decocção e tabletes é uma prática antiga e utilizada por 60% da população mundial. O uso ocorre principalmente nos países em desenvolvimento, onde há dependência da medicina tradicional para o tratamento de uma variedade de doenças (Ahmad et al., 2011).

A busca por novas substâncias com atividade citotóxica associada à menor toxicidade para células normais têm sido o principal foco das pesquisas na descoberta de novas drogas antitumorais (Kohn et al., 2006). A enorme diversidade estrutural dos compostos naturais e seu potencial de bioatividade fizeram com que vários produtos isolados de plantas e microorganismos marinhos servissem como modelo para o

desenvolvimento de novas drogas. Além disso, a modificação molecular de grupos funcionais dos compostos modelo é capaz de gerar análogos estruturais com melhor potencial terapêutico, isto é, maior atividade farmacológica e menos efeitos colaterais (Mann, 2002; Molinski et al., 2009).

No Brasil várias espécies de plantas são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de neoplasias (Matos, 1988). Entretanto, são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, pois as pesquisas voltadas para a avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos ainda são insipientes (Ferro et al., 2006).

A *Arrabidaea chica* é uma Bignoniaceae encontrada principalmente na América tropical e África (Takemura et al., 1995) e suas folhas são muito utilizadas na medicina popular para o tratamento do câncer. É utilizada também para o tratamento de cólica intestinal, diarreia e como agente antiinflamatório, antianêmico e adstringente, (Takemura et al., 1995; Zorn et al., 2001).

Já foi comprovada a ação antifúngica e antiinflamatória de seus extratos, mas as pesquisas que justifiquem suas atividades farmacológicas ou que determinem seus mecanismos de ação ainda são escassas (Barbosa et al., 2008). A identificação de atividade antitumoral de plantas da mesma família como a *Capalga ovata* (Fujiwara et al., 1998) e a *Tabebuia avellanedaea* (Queiroz et al., 2008) favorece a teoria de que a *A. chica*, além dos efeitos antiinflamatório e antisséptico (Zorn, 2001) apresenta também efeito antitumoral.

Assim, esse trabalho objetivou avaliar as ações antitumoral, antiinflamatória e antiangiogênica de extratos da *Arrabidaea chica* através de estudos *in vitro* e *in vivo*.

## Capítulo 1

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1. Produtos naturais e agentes antitumorais derivados de plantas medicinais.

Os produtos naturais derivados de plantas, microrganismos e animais marinhos são há muito tempo fonte tradicional de novas drogas (Li & Vederas, 2007, Molinski et al., 2009). O termo produto natural é geralmente considerado um sinônimo de metabólito secundário. Essas substâncias normalmente têm baixo peso molecular (abaixo de 3000 daltons) e sua função relacionada-se à sobrevivência das espécies repelindo ou atraindo outros microrganismos (Kinghorn et al., 2009).

Em 1804 Friedrich Wilhelm Sertürner isolou a morfina a partir da planta *Papaver somniferum*. Esse foi o primeiro composto puro farmacologicamente ativo isolado e também o primeiro a ser comercializado pela Merck em 1826 (Li & Vederas, 2007; Ji et al., 2009). Esse fato iniciou uma nova era na qual drogas derivadas de plantas poderiam ser purificadas, estudadas e administradas em doses precisas independente da fonte ou a idade do material de origem (Li & Vederas, 2007).

A análise estrutural dos compostos naturais e a possibilidade de sintetizá-los permitiu aos cientistas modificar suas estruturas a fim de suprimir ou acentuar determinadas características como solubilidade, eficiência ou estabilidade no corpo humano (Ji et al., 2009).

Estima-se que atualmente 60% das drogas são provenientes de produtos naturais na sua forma natural ou como análogos sinteticamente modificados (Li & Vederas, 2007; Ji et al., 2009; Kinghorn

et al., 2009). Antibióticos como a penicilina derivada do fungo *Penicillium notatum* (Ji et al., 2009), antiparasitários como a avermectina, imunossuppressores e drogas antitumorais como a doxorubicina e o taxol (*Taxus brevifolia*) revolucionaram a medicina. O resultado foi um aumento impactante na expectativa de vida em grande parte do mundo (Li & Vederas, 2007).

As pesquisas com produtos naturais têm duas bases diferentes: a identificação de compostos isolados com atividade farmacológica e a pesquisa de misturas complexas como extratos, chás, estudo de uma planta ou parte de uma planta a ser usada como remédio. Esses estudos geralmente se iniciam a partir da informação tradicional do uso da planta como remédio ou da descrição de sua toxicidade (Suffredini et al., 2006).

Ainda, as pesquisas sobre o conhecimento e uso tradicional de plantas medicinais contribuem para a perpetuação do patrimônio cultural tradicional. Permitem também aperfeiçoar o desenvolvimento de preparados terapêuticos de baixo custo e organizar os conhecimentos tradicionais de maneira a utilizá-los em processos de desenvolvimento tecnológico (Ferro, 2006).

Segundo a OMS (2002), o uso de medicamentos provenientes de plantas medicinais na forma de tintura, decocção e tabletes é uma prática antiga utilizada por 60% da população mundial. Isso ocorre principalmente nos países pouco desenvolvidos e em desenvolvimento, onde há dependência da medicina tradicional para o tratamento de uma variedade de doenças (Ahmad et al., 1998).

Estima-se que apenas 17% das espécies de plantas em todo o mundo já foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Newman & Cragg, 2007).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo e mais de 55 mil espécies já foram catalogadas. É bastante provável que pelo menos a metade dessas espécies apresente alguma propriedade terapêutica de interesse para a população (Guerra & Nodari, 2007). Fica claro que a flora nacional representa um potencial enorme para a descoberta de novos medicamentos (Newman & Cragg, 2007).

A utilização de plantas e suas preparações são há muito tempo uma alternativa importante no tratamento do câncer (Mann, 2002, Suffredini et al., 2006). Substâncias citotóxicas derivadas de plantas, como por exemplo alcalóides da vinca (vincristina) ou paclitaxel (Taxol) são frequentemente utilizados na oncologia como potentes quimioterápicos ou como um modelo para a síntese de novas drogas (Thatte et al., 2000). Índios americanos utilizavam com sucesso o extrato de *Podophyllum peltatum* no tratamento de câncer de pele. O principal constituinte desse extrato, podofilotoxina, pertence ao mesmo grupo de agentes antitumorais do etoposídeo. Em 1958 foram descobertas a vincristina e vimblastina, isoladas da planta *Vinca rosea* que contribuem para o tratamento de vários tipos de câncer (Mann, 2002).

A radioterapia e a quimioterapia são os tratamentos de primeira escolha para as neoplasias, mas não apresentam toxicidade seletiva, causando sérios efeitos adversos como inibição da resposta imunológica e mielossupressão (Fischer & Schulze-Osthoff, 2005). A baixa seletividade dos agentes quimioterápicos, diferentes graus de toxicidade para tecidos normais e o rápido desenvolvimento de resistência à droga são fatores limitantes ao sucesso do tratamento. Portanto, existe grande

necessidade para novas e melhores terapias antitumorais incluindo a identificação de novos agentes quimioterápicos (Kohn et al., 2006).

Uma grande vantagem da identificação de novas drogas antitumorais é a possibilidade das novas estruturas básicas servirem como fonte para construção de análogos sintéticos com propriedades biológicas aumentadas (Mann, 2002), gerando compostos com maior eficácia e menores efeitos colaterais comparado aos compostos originais (Molinski et al., 2009).

As necessidades do mercado farmacêutico e o reconhecimento por parte das instituições privadas e governamentais de que pesquisas com plantas medicinais usadas na medicina popular auxiliam o desenvolvimento de novas drogas levaram ao aumento do número de publicações neste campo. No Brasil cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (Filho & Yunes, 1998). Isso deixa claro a importância das pesquisas acerca do potencial das espécies vegetais, visto que um grande número de plantas medicinais utilizadas pela população ainda não foram estudadas quanto à sua atividade farmacológica.

A OMS define planta medicinal como "todo e qualquer vegetal que possui em um ou mais órgãos substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (OMS, 1998).

A Secretaria de Vigilância Sanitária (portaria nº 6 de 31/01/1995) define droga vegetal como "a planta ou suas partes, que após processo de coleta, secagem, estabilização e conservação, justificam seu emprego na preparação de medicamento".

Também define como produto

fitoterápico “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação, podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos pela legislação vigente. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas”.

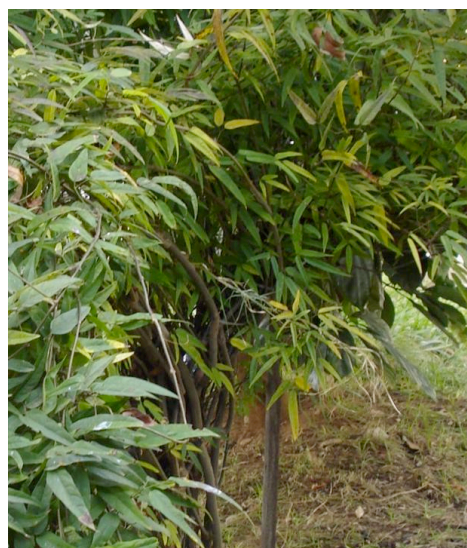
Preparado fitoterápico intermediário é “o produto vegetal triturado, pulverizado, rasurado, extrato, tintura, óleo fixo ou volátil, cera, suco e outros, obtido de plantas frescas e de drogas vegetais, através de operações de fracionamento, extração, purificação ou concentração utilizado na preparação de produto fitoterápico”. E finalmente, princípio ativo, que foi definido como a “substância ou grupo delas quimicamente caracterizadas cuja ação farmacológica é conhecida e responsável total ou parcialmente pelos efeitos terapêuticos do produto fitoterápico”.

## **2. *Arrabidaea chica***

### **2.1. Descrição botânica**

Reino: Plantae  
Divisão: Magnoliophyta  
Classe: Magnoliopsida  
Subclasse: Asteridae  
Ordem: Scrophulariales  
Família: Bignoniaceae  
Genero: *Arrabidaea*  
Espécie: *Arrabidaea chica*

A *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot pertence à família Bignoniaceae que contem cerca de 120 gêneros e 800 espécies. É encontrada principalmente nas Américas Central e do Sul e na região amazônica (Takemura et al., 1995). É uma planta trepadeira com flores róseas ou violáceas, dispostas em panículas piramidais. É conhecida popularmente como crajiru, pariri, carajuru, puca panga, coapiranga, cipó-cruz e chica (Fig.1).



**Figura 1. Foto de um exemplar de *Arrabidaea chica***

No início do século XX a *A. chica* era comercializada pelo seu corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo (Chapman et al., 1927) obtido a partir da fermentação de suas folhas.

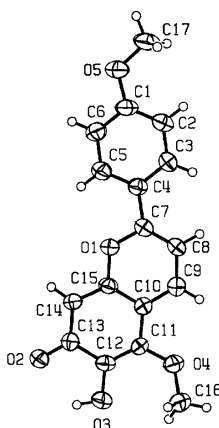
A *A. chica* era tradicionalmente utilizada pelos índios da Amazônia para pintura do corpo em seus rituais e de tecidos (Barbosa et al., 2008). Também a utilizavam como protetor solar e repelente de insetos (Barbosa et al., 2008), para limpeza de feridas crônicas, tratamento de doenças da pele como micoses e herpes (Mors et al., 2000; Kalil Filho et al., 2000) e para o tratamento de conjuntivite aguda (Kalil filho et al., 2000).

Atualmente, a *A. chica* é utilizada na medicina popular para o tratamento de

diversas doenças. É empregada como agente antiinflamatório, antianêmico e adstringente. O chá das folhas ingerido de forma continuada é empregado no tratamento de anemia, inflamações uterinas, cólicas intestinais, diarreia sanguinolenta e enterocolite (Takemura et al, 1995; Mors et al., 2000; Zorn et al, 2001). Há ainda relatos de grande efeito para o tratamento do câncer de boca, de útero e leucemia (Kalil Filho, 2000).

## 2.2. Composição química

Desde o início do século XX a *A. chica* foi questão de investigação química com o objetivo de determinar a composição de seu corante. Chapman et al. (1927) isolaram uma 3-desoxiantocianidina denominada Carajurina. Sua estrutura foi determinada anos depois como sendo 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (Zorn et al., 2001) (Fig.2).



**Figura 2. Estrutura química da carajurina.**  
**Fonte: Devia et al., 2002.**

Posteriormente, diversas substâncias foram identificadas nas folhas da *A. chica*, tais como antocianinas, flavonóides, taninos e fitoesteróis. Em 2001, foi realizado o isolamento de duas novas 3-desoxiantocianidinas das partes aéreas da *Arrabidaea chica*, a 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium e 6,7,3'-trihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (Zorn et al., 2001). Além disso, a carajurona, com estrutura definida como 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxi-flavilium por Harborne em 1967 teve sua estrutura revisada para 6,7,4-trihidroxi-5-metoxiflavilium (Zorn et al., 2001).

As antocianinas são flavonóides amplamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho, presentes em flores e frutos (Wang & Stoner, 2008). Essas

substâncias, pertencentes ao grupo de compostos fenólicos, são responsáveis pela coloração vermelho-escuro das folhas da *A. chica*.

Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de antocianinas reduz o risco de doenças cardiovasculares, diabetes, artrite e câncer devido, pelo menos em parte, às suas atividades antioxidante e antiinflamatória (Wang & Stoner, 2008). As antocianinas servem como antioxidantes naturais e protegem e reparam a integridade do DNA genômico (Ding et al., 2006).

Takemura et al. (1995) realizaram o isolamento de uma flavona das folhas da *A. chica* denominada carajuflavona, com a seguinte estrutura 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5 metoxiflavona (Fig 3). Zorn et al. (2001) isolaram a flavona acetina.

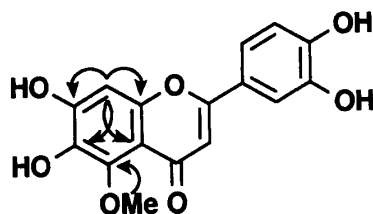


Figura 3. Estrutura química da carajouflavona. Fonte: Takemura et al., 1995.

A partir do extrato metanólico das folhas da *A. chica* foi também identificado a luteolina (Takemura et al., 1995). E a partir do extrato etanólico foram isolados

3 flavonóides: 4'-hidroxi-3,7-dimetoxiflavone, denominada I pelos autores (Fig. 4), Vicenin-2 e campferol (Barbosa et al., 2008).

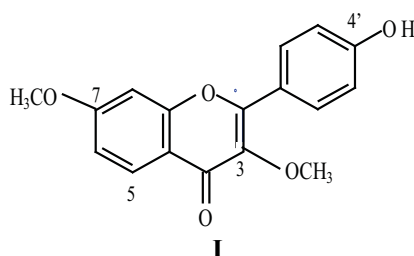


Figura 4: Estrutura química de 4'-hidroxi-3,7-dimetoxiflavone. Fonte: Barbosa et al., 2008.

O conteúdo de fenólicos e flavonóides foram determinados sendo  $10,2 \pm 0,1$  mg/g e  $4,5 \pm 0,1$  mg/g, respectivamente, para folhas e  $0,06 \pm 0,00$  mg/g de fenólicos para caule. O maior conteúdo de polifenóis nas folhas se deve à maior exposição a luz e está relacionado à função de filtrar raios UV. Não foi detectado flavonóides no caule (Silva et al., 2007).

Existe bastante interesse nos compostos fenólicos por apresentarem atividades antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (Silva

et al., 2007).

Os compostos fenólicos podem ser classificados em flavonóides e não flavonóides. Do primeiro grupo fazem parte os flavonóis (catequina, campferol) e antocianinas.

O teor de flavonóides totais nas tinturas (30%, 50% e 70% de etanol) e nos extratos aquosos (infusão e decocção) obtidos das folhas foram determinadas (Pinto, 2004 citado por Barbosa et al., 2008) (Tab. 1).

**Tabela 1. Conteúdo total de flavonóides em preparados de *A. chica*.**

Amostra	Concentração (g%)
Extrato aquoso: infusão	1,300
Extrato aquoso: decocção	1,842
Tintura 30%	4,866
Tintura 50%	10,489
Tintura 70%	14,969

Fonte: Pinto, 2004 citado por Barbosa et al., 2008. *Braz J. Pharmacogn.* 18(4): Out./Dez. 2008.

Recentemente, Barbosa et al. (2008) realizaram uma abordagem fitoquímica sobre *A. chica*, detectando diferentes classes metabólicas no extrato etanólico, tais como antocianidinas, antocianinas, antraquinona, catequinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, esteróides, xantonas e taninos, flavanonóis e

flavanona (Fig.5).

Sabe-se pouco sobre a composição mineral da *A. chica*. Um estudo recente mostrou a presença de cálcio (4,15mg%), fósforo (30µg%), manganês (0,26µg%) e ferro (12,4mg%) (Magalhães et al., 2009).

**Figura 5. Classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico da *A. chica*.**

Metabolic Class	Alkaloids	Anthocyanidins	Anthocyanins	Antraquinone	Catechins	Organic acids	Reducing sugars	Steroids	Xanthones	Coumarines	Tannins	Flavanonols	Flavanone	Heart glycosides	Saponines
EtE	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	ND	(+)	(+)	(+)	I	ND

ND: Not determined; I: Only indication.

**Fonte: Barbosa et al., 2008. Braz J. Pharmacogn. 18(4): Out./Dez. 2008.**

### 2.3. Ação biológica

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram intensa atividade antiinflamatória do extrato de *A. chica* (Takemura et al., 1995; Zorn et al., 2001; Oliveira et al., 2008).

Takemura et al. (1995) testaram *ex vivo* em neutrófilos de coelho a atividade antiinflamatória da carajuflavona e da luteolina isoladas do extrato da *A. chica*. A luteolina apresentou alta atividade de inibição da liberação de enzimas e produção de superóxido por neutrófilos estimulados por peptídeo FMLP (formyl-methionil-leucyl-phenylalanine). O FMLP ativa a NADP oxidase localizada na membrana plasmática levando a produção de ânion superóxido que é fonte de todas as outras espécies reativas de oxigênio geradas na explosão respiratória do neutrófilo (Filho, 2006).

O efeito antiinflamatório do extrato lipofílico da *A. chica* e da carajurina foi avaliado *in vitro* pela inibição do fator nuclear-κB (NF-κB) (Zorn et al., 2001). O NF-κB regula a transcrição de genes de

várias citocinas inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas inflamatórias como iNOS e COX-2. Portanto, a sua inibição pode modular o processo inflamatório (Zorn et al., 2001). Além disso, o NF-κB está envolvido na regulação da transcrição de metaloproteases da matriz e enzimas angiogênicas que desempenham papel importante na invasão celular e formação de metástases (Ding et al., 2006). A ativação do NF-κB está associada ao crescimento e desenvolvimento tumoral e foi demonstrado que sua inibição reduz a motilidade de células tumorais mamárias altamente invasivas (Ding et al., 2006). Tanto a carajurina isolada quanto o extrato lipofílico da *A. chica* inibiram a ativação do NF-κB indicando que além das 3-desoxiantocianidinas, outras substâncias ainda não identificadas presentes no extrato são responsáveis pela ação antiinflamatória observada (Zorn et al., 2001). A carajurina apresentou comportamento semelhante ao do flavonóide quercetina e provavelmente os mecanismos de ação sejam os mesmos. A quercetina inibe a ligação do NF-κB ao

DNA celular pela interferência na degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  e também pela inibição da atividade de IKK (Zorn et al., 2001).

Os flavonóides são conhecidos por sua significativa capacidade de sequestrar radicais livres *in vivo* e *in vitro* e têm propriedades de estabilização de membrana celular (Adedapo et al., 2008). O extrato etanólico da *A. chica* apresenta grande potencial antioxidante. Essa atividade antioxidante está possivelmente relacionada à presença de antocianidinas (Jorge et al., 2008) e à presença de luteolina (Amaral et al., 2002).

Oliveira et al. (2008) estudaram os efeitos do extrato aquoso da *A. chica* sobre o edema induzido por serpentes *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* em camundongos albinos pelas vias oral, intraperitoneal e subcutânea. Os resultados indicaram que o extrato contém substâncias químicas com atividade antiinflamatória quando administrados pelas vias subcutânea (10,6g/kg peso) e intraperitoneal (2,5g/kg peso), não apresentando efeito por via oral. A histopatologia demonstrou inibição do infiltrado de granulócitos e da miocitólise induzidos pelas toxinas das serpentes.

De-Souza et al. (2009) observaram que o extrato da *A. chica* influencia o metabolismo hepático, inibindo a respiração acoplada a fosforilação de ADP, aumentando a hidrólise de ATP na mitocôndria. Esses efeitos são característicos de drogas antiinflamatórias não esteroideais.

O extrato hidro alcoólico da *A. chica* induziu efeito anti-hipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos, provavelmente devido à diminuição da resistência vascular periférica com possível envolvimento do influxo de Ca<sup>+2</sup> através dos canais de cálcio tipo L operados por voltagem. Além disso, o extrato promoveu diminuição

significativa na concentração sérica de glicose, na dose de 250mg/kg/dia por via oral (Catargenes, 2009).

O extrato metanólico bruto da *A. chica* contendo carajurina e carajurona apresentou atividade cicatrizante *in vitro* e *in vivo*. O extrato estimulou de forma dose dependente o crescimento celular de fibroblastos com EC<sub>50</sub>=30 $\mu$ g/mL *in vitro*. Além disso, na concentração de 250 $\mu$ g/mL, aumentou a produção de colágeno de forma semelhante à alantoína (250 $\mu$ g/mL) e vitamina C (25 $\mu$ g/mL). Nos experimentos *in vivo*, ratos Wistar apresentaram 13% de redução de área das úlceras induzidas na pele após dois dias de tratamento tópico com o extrato bruto da *A. chica*. Após 10 dias, o grupo apresentou 96% de feridas cicatrizadas com marcante deposição de colágeno no local. No grupo controle, tratado com salina, observou-se somente 36% de feridas cicatrizadas e leve deposição de colágeno no local da injúria (Jorge et al., 2008). A atividade cicatrizante do extrato foi relacionada ao estímulo à proliferação de fibroblastos e produção de colágeno além da sua moderada atividade antioxidante.

O extrato etanólico na concentração de 4mg/mL induziu 41% de lise nas formas tripomastigotas do *Trypanosoma Cruzi*, demonstrando um significativo efeito tripanocida. Esse efeito pode ser atribuído aos ácidos triterpenóides e às naftoquinonas do extrato. O extrato etanólico apresentou ainda inibição total do crescimento do fungo *Trichophyton mentagrophytes*. A atividade antifúngica pode estar relacionada à presença de quinonas e flavonóides no extrato (Barbosa et al., 2008).

## 2.4. Toxicidade

As plantas podem apresentar substâncias potencialmente perigosas à saúde e por esta razão devem ser utilizadas com cautela, respeitando seus riscos



toxicológicos (Maciel et al., 2002). A toxicidade de plantas medicinais é um sério problema de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, interação com outras drogas e a toxicidade ocorrem comumente (Ferro et al., 2006). A associação de estudos fitoquímicos e farmacológicos torna-se cada vez mais importante para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (Maciel et al., 2002).

Testes de toxicidade aguda do extrato aquoso indicaram que a DL50 em camundongos ultrapassa 2g/kg por via intraperitoneal e 6g/kg via oral. Nos testes de toxicidade crônica nenhum sinal ou sintoma anormal, ou alterações histopatológicas foram observadas (Oliveira et al., 2008).

Um estudo utilizando extrato hidroalcoólico da *A. chica* mostrou que doses de até 2g/kg de peso corporal administradas por via intraperitoneal em camundongos não causou letalidade ou toxicidade durante os 14 dias de observação (Catárgenes, 2009). No mesmo estudo, foi demonstrado que a administração de até 3.5g/kg por via oral para ratos não provoca sinais de toxicidade ou morte. A dose de 5g/kg provocou apenas diarreia nos animais nos primeiros dias de administração (Catárgenes, 2009).

Quando testado como substância antisséptica e administrado na cavidade pleural, o extrato aquoso da *A. chica* induziu leve ou nenhuma reação inflamatória na pleura e parênquima pulmonar de ratos Wistar (Westphal et al., 2007).

### 3. Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea. É um tumor transplantável e se desenvolve nas formas sólida e ascítica quando inoculado no tecido subcutâneo e na cavidade

peritoneal, respectivamente (Dagli, 1992a).

O tumor de Ehrlich pode ser transplantado para qualquer linhagem de camundongo, provavelmente devido à perda da expressão do MHC na membrana celular (Bergami-Santos et al., 2004).

O tumor de Ehrlich tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo da progressão tumoral e na investigação dos efeitos antineoplásicos de várias moléculas e compostos biológicos (Matsuzaki et al., 2006).

É composto por células intensamente pleomórficas e anaplásicas que apresentam elevada relação núcleo/citoplasma, núcleos com cromatina frouxa, nucléolos múltiplos e proeminentes e elevado índice mitótico com mitoses atípicas. O estroma é constituído por capilares delgados sendo comum a presença de extensas áreas de necrose e hemorragia (Silva et al., 2004).

O tumor apresenta crescimento discreto nos primeiros dias após a inoculação subcutânea acelerando o crescimento posteriormente (Reis et al., 2009). A taxa metabólica avaliada por marcador histoquímico (AgNOR) mostrou que o pico de proliferação no tumor sólido ocorre a partir do sétimo dia pós inoculação (Silva et al., 2006).

Já na forma ascítica, o volume do líquido ascítico e o número de células aumentam progressivamente (Matsuzaki et al., 2006) e o pico de proliferação das células é precoce, ocorrendo no sétimo dia pós inoculação (Silva et al., 2006).

O desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich é acompanhado por esplenomegalia, hematopoese esplênica, neutrofilia e trombocitopenia (Segura et al., 2000).

O número e o tipo de células que

constituem o infiltrado inflamatório nos tumores sólidos estão relacionados à produção local de quimiocinas pelas células do tumor e do estroma (Balkwill, 2004).

A resposta inflamatória no tumor sólido de Ehrlich é caracterizada pela infiltração discreta de linfócitos e neutrófilos no tecido circundante e no interior da massa tumoral, com significativa dilatação e aumento da permeabilidade vascular (Dagli et al., 1992b).

A angiogênese é um fenômeno complexo que promove o crescimento tumoral e sobrevivência celular, além de influenciar na migração das células tumorais e formação de metástases (Schindler & Mentlein, 2006). Dagli et al. (1992b) descreveram extensas áreas de necrose no tumor sólido de Ehrlich 30 dias pós inoculação. As células viáveis se localizavam principalmente ao redor de vasos sanguíneos. É bastante claro que o desenvolvimento rápido e persistente de capilares sanguíneos a fim de suprir células tumorais com nutrientes e oxigênio é essencial para o desenvolvimento de neoplasias sólidas (Schindler & Mentlein, 2006).

O estímulo para angiogênese tumoral é produzido diretamente pelas próprias células neoplásicas e em menor grau e indiretamente pelas células inflamatórias recrutadas no sítio tumoral. As quimiocinas produzidas pelas células neoplásicas malignas são geralmente angiogênicas. A proliferação vascular aumentada está diretamente relacionada à maior incidência de metástases e pior prognóstico (Schindler & Mentlein, 2006).

Postula-se que células inflamatórias infiltradas no sítio tumoral representam a reação imune do organismo contra o crescimento desse tecido (Estrela-Lima et al., 2010). Por outro lado, a resposta inflamatória produzida pela presença das células tumorais é importante para o

desenvolvimento neoplásico.

Quimiocinas e citocinas liberadas durante a resposta inflamatória estimulam a proliferação celular e angiogênese e inibem a apoptose (Estrela-Lima et al., 2010).

Reis et al. (2009) estudaram o influxo de células inflamatórias durante 30 dias de crescimento do tumor sólido de Ehrlich. Neutrófilos foram recrutados para o tumor na mesma proporção durante todo período avaliado (7, 14 e 30 dias). O mesmo foi observado para a migração de macrófagos. Dagli et al. (1992b) observaram que a relação entre células polimorfonucleares/mononucleares infiltradas no tumor de Ehrlich era semelhante no 15º dia pós inoculação do tumor.

A citotoxicidade mediada por células é importante na vigilância imunológica contra os processos malignos. Linfócitos TCD4 secretam IL-2 que estimula a proliferação e citotoxicidade de linfócitos T, bem como aumenta a atividade microbicida e citotóxica de células NK, linfócitos B, macrófagos e monócitos (Andre et al., 2004). As células do tumor de Ehrlich não expressam o MHC na membrana celular. Esta característica exclui o principal papel dos linfócitos T citotóxicos durante o desenvolvimento tumoral, indicando que talvez a imunidade celular não seja o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra esse tumor (Bergami-Santos et al., 2004).

Não há um consenso em relação à efetividade da resposta antitumoral mediada pelos linfócitos ou pela subpopulação predominante no sítio tumoral (Estrela-Lima et al., 2010). A identificação dos tipos celulares infiltrados no tumor de Ehrlich auxilia o melhor entendimento da interação reposita imune e desenvolvimento tumoral. Observar os efeitos do tratamento com extratos da *Arrabidaea chica* sobre essa

interação foi um dos objetivos desse estudo.

### **HIPÓTESE**

A *Arrabidaea chica* contém componentes farmacológicos ativos com atividades antineoplásica e imunomoduladora.

### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar o potencial antitumoral de extratos da *A. chica* através de estudos *in vitro* e *in vivo*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o perfil fitoquímico do extrato etanólico e fração aquosa CA3 do extrato de *A. Chica*.

Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica dos extratos aquosos, etanólico e metanólico *A. Chica* em células leucêmicas humanas (Jurkat e HL60) e nas células de tumor mamário MCF-7 por avaliação da proliferação celular.

Avaliar o potencial pro-apoptótico dos extratos nas duas linhagens leucêmicas humanas.

Avaliar o potencial anti-inflamatório e antiangiogênico dos extratos etanólico-EE e fração aquosa CA3 em modelo murino de implante de esponja.

Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* dos extratos aquosos EAB, CA3 e CO3 e do extrato etanólico-EE em camundongos portadores do tumor de Ehrlich sólidos quanto aos aspectos:

- toxicidade aguda;
- desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich e;
- potencial imunomodulador dos extratos pela caracterização *ex vivo* das células mononucleares inflamatórias: linfócitos TCD4+, TCD8+, NK, e linfócitos B presentes no exsudato inflamatório associado ao tumor sólido de Ehrlich e no sangue.

## Capítulo 2

### **Atividades citotóxica e pró-apoptótica de extratos da *Arrabidaea chica* em linhagens de células tumorais leucêmicas e mamária *in vitro***

#### **RESUMO**

Afim de verificar as atividades citotóxica e pró-apoptótica da *Arrabidaea chica* empregou-se diferentes métodos de extração para obtenção de extratos aquosos, etanólicos e metanólico a partir de folhas secas. Obteve-se os extratos aquosos EAB, CA2, CA3, CO2 e CO3, o extrato metanólico-MAC, o etanólico-EE e suas frações EE-CA2, EE-CA3, EE-CO2 e EE-CO3. O perfil cromatográfico de todos os extratos foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O potencial citotóxico desses extratos foi investigado pela triagem em modelos *in vitro* utilizando-se células leucêmicas humanas das linhagens Jurkat (leucemia linfóide) e HL60 (leucemia mielóide) e o carcinoma mamário MCF-7. As substâncias de melhor atividade citotóxica tiveram a IC<sub>50</sub> determinada e foram selecionadas para investigação do potencial pró-apoptótico por meio de citometria de fluxo. Os extratos com maior potencial citotóxico foram o extrato etanólico EE e sua fração EE-CO3. Os extratos aquosos (EAB, CA2, CA3, CO2, CO3) e metanólico-MAC não apresentaram atividade citotóxica significativa contra as células estudadas. O extrato etanólico-EE a 50µg/mL apresentou potente atividade citotóxica contra células Jurkat e HL60, com valores semelhantes ao da vincristina utilizado como controle positivo (1µg/mL). O valor de IC<sub>50</sub> para o extrato etanólico-EE nas linhagens HL60 e Jurkat foi de 26,93µg/mL e 27,91µg/mL respectivamente. O resultado foi superior ao obtido para sua fração EE-CO3 que apresentou valores de IC<sub>50</sub> para as linhagens HL60 e Jurkat de 38,47µg/mL e >100µg/mL respectivamente. Os ensaios de citometria de fluxo demonstraram que o extrato etanólico-EE (50µg/mL) induz fragmentação de DNA nas células HL60 e Jurkat, sugerindo seu potencial pró-apoptótico. Os resultados apontam que o extrato etanólico-EE apresenta atividade citotóxica e pró-apoptótica. Essa atividade está possivelmente relacionada à presença de campferol, identificado pela CLAE. Esse extrato apresenta grande potencial como ferramenta farmacológica para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antitumoral.

**Palavras-chave:** *Arrabidaea chica*; atividade citotóxica; antitumoral; apoptose.

## ABSTRACT

In order to investigate the cytotoxic potential of aqueous (EAB, CA2, CA3, CO2, CO3), methanol (MAC), ethanol extracts and its fractions (EE-CA2, EE-CA3, EE-CO2, EE-CO3) of *Arrabidaea chica* an *in vitro* screening was performed using Jurkat and HL60 leukemia cells and breast carcinoma MCF-7. The chromatographic profile of all extracts was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The substances with better cytotoxic activity had the IC<sub>50</sub> values determined and were selected for further investigation concerning their pro-apoptotic potential. The ethanol extract EE (50µg/mL) showed potent cytotoxic activity, with values similar to that of vincristine, used as positive control (1µg/mL). This result was considered of high potency considering that the sample refers to a crude extract when compared to the positive control. The IC<sub>50</sub> value for the ethanol extract-EE in HL60 and Jurkat cell lines were 26,93µg/mL and 27,91µg/mL respectively. The ethanol extract-EE (50 µg/mL) induces DNA fragmentation of leukemic cells as assessed by flow cytometry assays. These results indicate that the ethanol extract-EE has potent cytotoxic and pro-apoptotic activities. This activity is likely related to the presence of kaempferol as identified by HPLC. The ethanol extract showed potential as a pharmacological tool for the development of new antitumor drugs.

Keywords: *Arrabidaea chica*, cytotoxic activity, antitumor, apoptosis.

## INTRODUÇÃO

A biodiversidade vegetal no Brasil é considerada uma das mais importantes fontes de material natural no mundo. A utilização de plantas medicinais para o tratamento de doenças é uma prática antiga. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as plantas medicinais têm importância na assistência primária à saúde de indivíduos e comunidades sendo utilizada por 85% da população mundial, abrangendo os países em desenvolvimento e os países desenvolvidos.

A identificação de substâncias que possam modular a apoptose têm potencial de alterar a progressão natural de doenças como o câncer, infecções virais, doenças auto-imunes e doenças neuro-degenerativas.

Em vista da importância das plantas medicinais para a sociedade atual, os estudos de extratos vegetais com atividade antitumoral têm se intensificado na busca de novos agentes quimioterápicos mais seguros e efetivos para o tratamento do câncer.

A *Arrabidaea chica* é uma Bignoniaceae encontrada em todo o Brasil e conhecida por pariri, crajiru, carajuru ou chica. Suas folhas são muito utilizadas popularmente como agente antiinflamatório, antianêmico, adstringente e para o tratamento de cólica intestinal, diarreia sanguinolenta e leucemia (Zorn et al., 2001). Possui atividades medicinais antifúngica e antiinflamatória (Barbosa et al., 2008).

Considerando seu uso na medicina popular e que não há relatos na literatura no que concerne à sua atividade antitumoral, o presente trabalho teve como objetivos:

- obtenção de diferentes extratos aquosos, etanólico e metanólico da *A. chica*;

- avaliar a atividade antitumoral dos extratos aquosos, etanólico e metanólico da *A. chica* nas linhagens celulares Jurkat (leucemia de células T humana), HL60 (mielóide) e MCF-7 (tumor mamário) *in vitro*;

- determinar a IC<sub>50</sub> dos extratos que apresentaram melhor atividade antitumoral;

- e identificar o potencial pró-apoptótico dos extratos da *A. chica* pela avaliação da fragmentação do DNA celular por citometria de fluxo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e extração

Amostras da *Arrabidaea chica* foram coletadas em localidade afastada do centro urbano em Maringá, Paraná em novembro de 2008. Uma exsiccata encontra-se depositada no Herbário da UNICAMP, em Campinas, São Paulo, sob o número UEC 145.956.

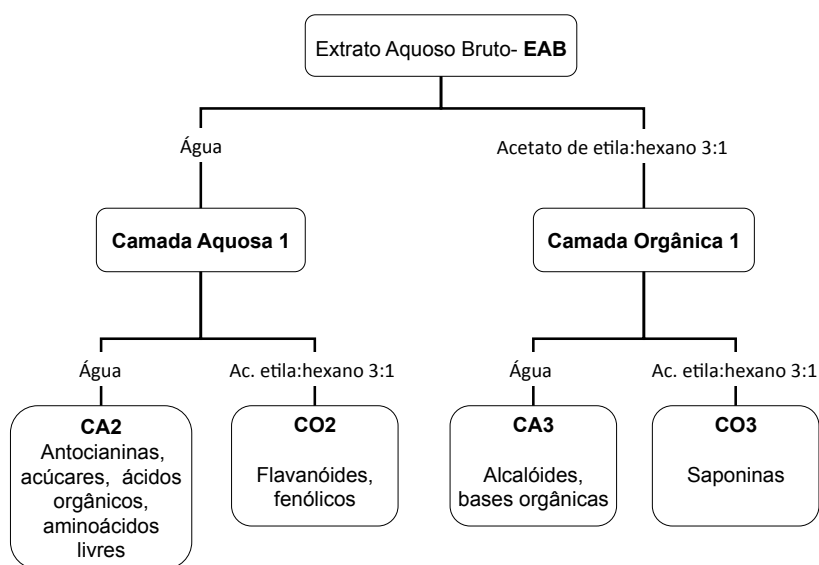
As amostras da *A. chica* foram secas em temperatura ambiente por um período de 30 dias. As folhas foram separadas e trituradas em liquidificador até obtenção de um pó. Os extratos foram preparados no laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais.

### Extratos aquosos

O extrato aquoso foi preparado pela adição de água destilada ao pó das folhas da *A. chica* (1:10 peso/volume) em temperatura ambiente. Após uma hora de banho ultrassônico a solução foi filtrada originando o extrato aquoso bruto (EAB). Uma amostra desse extrato bruto foi liofilizada e estocada a -20°C. No dia de experimentação o EAB foi dissolvido em DMSO na dose desejada.

O EAB foi fracionado pela extração por solventes (Matos, 1988) em sub-extratos ricos em diferentes grupos químicos (Fig. 1). Foram feitas partições com acetato de etila e hexano, 1:1, obtendo-se as seguintes frações: camada aquosa 2 (CA2), constituída por antocianinas, aminoácidos livres, ácidos orgânicos e açúcares; camada orgânica 2 (CO2),

contendo flavonóides e compostos fenólicos; camada aquosa 3 (CA3) constituída por alcalóides e bases orgânicas; e camada orgânica 3 (CO3) constituída por saponinas. As frações CA2 e CA3 foram liofilizadas. Todos os extratos foram estocados a -20°C para utilização nos experimentos *in vitro* ou *in vivo*.



**Figura 6. Metodologia de extração do extrato aquoso bruto e obtenção das frações aquosas da *A. chica*.**

### Extrato etanólico (EE)

O extrato etanólico foi obtido de acordo com protocolo de extração descrito por Leite et al. (2006). As folhas secas trituradas foram submetidas a extração por etanol. A solução de etanol foi concentrada em rotavapor até completa retirada do solvente. A fração bruta do extrato de etanol foi submetida a extração pelo hexano em sistema fechado por duas horas. Após remoção do solvente por filtração foi obtida uma fração insolúvel em hexano (extrato etanólico-EE) utilizado nos experimentos.

### Fracionamento do extrato etanólico:

Foi realizado o fracionamento do extrato etanólico-EE seguindo o seguinte protocolo: O extrato etanólico-EE foi diluído em água e posteriormente teve seu pH basicificado com hidróxido de sódio. Foi adicionado acetato de etila:hexano 1:1 e separada duas camadas: orgânica 1 (CO1) e aquosa 1 (CA1). A CA1 foi acidificada com ácido clorídrico (pH=1,0) e adicionou-se acetato de etila:hexano 1:1 separando-se as camadas aquosa 2 (EE-CA2) e orgânica 2 (EE-CO2). Foi adicionado à camada orgânica 1 água acidificada (pH=1,0) e separada outras duas frações: camada aquosa 3 (EE-CA3) e camada orgânica 3 (EE-CO3). Obteve-

se então a partir do EE as seguintes frações EE-CA2, EE-CA3, EE-CO2, EE-CO3 (Fig. 7). Todos os sub-extratos foram armazenados em microtubos a -20°C até o momento de utilização. As camadas EE-CA2 e EE-CA3 foram liofilizadas.

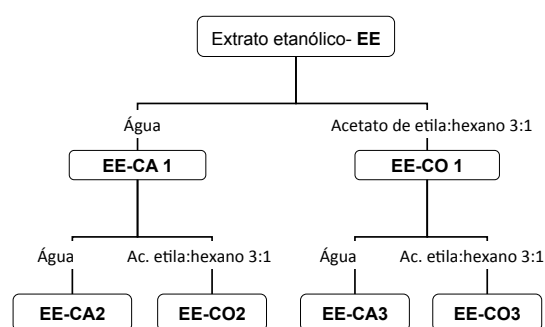


Figura 7. Fracionamento do extrato etanólico-EE da *A. chica*.

### Extrato metanólico (MAC)

O extrato metanólico foi obtido utilizando-se o protocolo de Jorge et al. (2008). As folhas secas trituradas foram submetidas a extração por metanol/0,03% ácido cítrico em temperatura ambiente. Após filtração, o solvente foi eliminado em rotavapor originando o extrato bruto metanólico (MAC).

A análise por cromatografia (CLAE) do extrato MAC demonstrou a presença de carajurina e carajurona (Jorge et al., 2008).

### Cromatografia líquida de alta eficiência

O perfil cromatográfico de todos os extratos foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As análises por CLAE foram feitas em um cromatógrafo líquido Cromatógrafo SHIMADZU Série 20 A, coluna de fase reversa ODS Hypersil (250 x 4,6mm) (SUPELCO) utilizando um sistema

gradiente linear do eluente A, metanol e eluente B, tampão fosfato pH 4,5. Para separação dos compostos empregou-se o gradiente linear no tempo inicial da eluição de 0%A a 100% A, entre 30 a 40 minutos. O volume injetado da amostra foi de 20µL e a detecção foi realizada pelo detector UV-Vis, Ch1 a 280 nm e Ch2 a 254 nm. Também foi realizada no comprimento de onda de 450nm.

### Ensaio de proliferação celular

A atividade antitumoral dos extratos da *A. chica* foi estudada nas linhagens celulares Jurkat (leucemia de células T humana), HL60 (mielóide) e MCF-7 (tumor mamário).

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo com 7mL de meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina e gentamicina 100µg/mL. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para o ensaio de proliferação celular em microplaca de 96 poços, 50.000 células de cada linhagem foram plaqueadas em cada poço. Foram adicionados os diferentes extratos (EAB, CA2, CA3, CO2, CO3, MAC, etanólico-EE, EE-CA2, EE-CA3, EE-CO2, EE-CO3) em diferentes concentrações (25, 50 ou 100µg/mL), vincristina (1µg/mL) e dimetilsulfóxido 0,01% (DMSO). Ao final de 48 horas de incubação, 20uL de uma solução à 5mg/mL de MTT foi adicionada a cada poço. As culturas foram incubadas por 4 horas para metabolização do MTT à formazan pelas células viáveis. Após este tempo, o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan solubilizados com 200uL de isopropanol (0,04N de HCl). Após homogeneização, seguiu-se a leitura em espectrofotômetro a 590nm (Monks et al, 1991).

O quimioterápico vincristina foi utilizado como controle positivo na concentração de 1µg/mL. A concentração final de DMSO nos experimentos foi de 0,01%



(concentração que não produz efeito citotóxico). O potencial antitumoral foi definido pela inibição da taxa de proliferação celular, calculada em relação ao controle DMSO. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. O extrato foi considerado ativo quando apresentou percentual de inibição da proliferação celular maior que 50%.

Os dados foram submetidos a ANOVA e avaliados pelo teste SNK utilizando o programa GraphPad Prism 5.

### **Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento celular (IC<sub>50</sub>) pelos extratos ativos (etanólico-EE e EE-CO3)**

Os extratos ativos foram submetidos à avaliação de sua concentração inibidora de 50% da proliferação celular, IC<sub>50</sub>, nas linhagens HL60 e Jurkat no tempo de 48 horas. Foi determinado também a IC<sub>50</sub> do quimioterápico vincristina, usado como controle positivo.

Foi feita a diluição seriada com variação de concentração de 100µg/mL a 0,01µg/mL. A inibição da taxa de proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Para determinação da IC<sub>50</sub> utilizou-se o programa GraphPad Prism 5, tendo sido construídas curvas de regressão nas concentrações testadas.

### **Avaliação da fragmentação do DNA nas linhagens HL60 e Jurkat**

Com a finalidade de identificar o potencial pró-apoptótico dos extratos ativos da *A. chica*, foi realizada a avaliação da fragmentação do DNA celular por citometria de fluxo.

A fragmentação do DNA é um evento que pode ser mensurado em tempos variáveis, em função do tipo celular e natureza do estímulo pró-apoptótico. Células Jurkat e HL60 foram tratadas

com os extratos ativos da *A. chica* na concentração de 50 µg/mL por 24 horas. A vincristina foi utilizada como controle positivo e DMSO como controle negativo.

A fragmentação do DNA celular foi avaliada pela marcação com iodeto de propídeo (IP) e análise por citometria de fluxo. O iodeto de propídeo se intercala com o DNA celular permitindo a quantificação do conteúdo de DNA sub-diplóide e DNA de células em diferentes fases do ciclo celular. Para análise do conteúdo de DNA sub-diplóide (fragmentação de DNA) foram construídos histogramas de conteúdo de DNA (eixo X) versus fluorescência IP (eixo Y). A análise foi realizada programa BQ CellQuest Pro (Becton Dickinson) tendo sido analisados 10.000 eventos.

Os ensaios foram realizados com as linhagens celulares que apresentaram maior susceptibilidade aos extratos. O DMSO (0,01%) foi utilizado como controle negativo e a vincristina (20µg/mL) como controle positivo.

Os dados foram expressos em percentual de fragmentação do DNA. Valores de fragmentação de DNA iguais ou inferiores a 10% são considerados aceitáveis para estudos *in vitro*. Os dados foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste SNK (p<0,05). Utilizou-se o programa GraphPad Prism5.

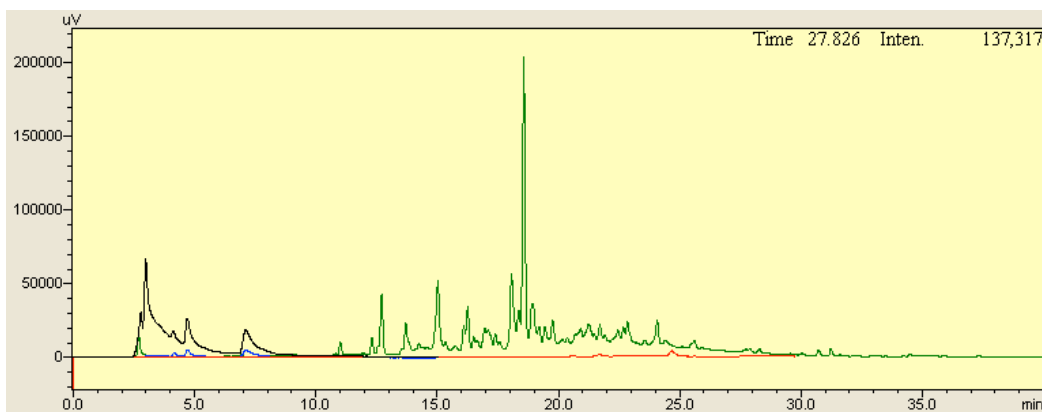
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Perfil cromatográfico dos extratos**

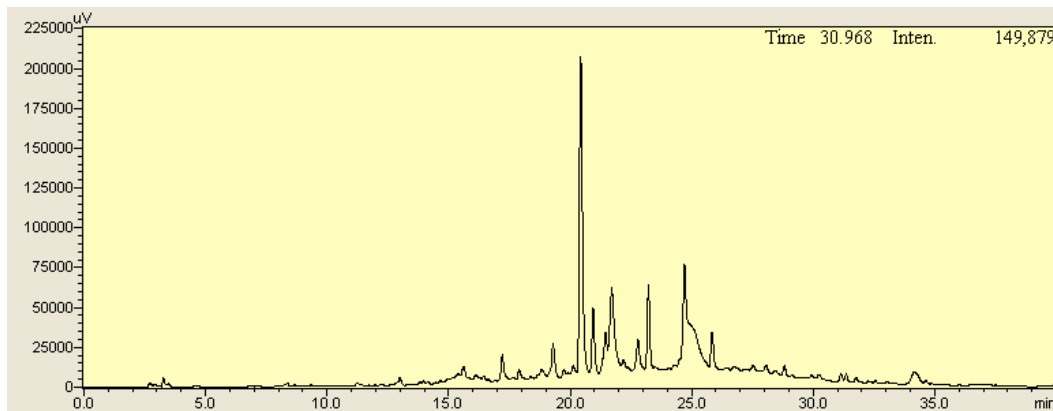
Extratos de plantas tem sido usados como drogas sem averiguação da presença das substâncias ativas ou comumente encontradas na espécie vegetal. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem prestado grande auxílio

nesse aspecto uma vez que mostra o perfil cromatográfico do extrato, tornando possível a detecção das substâncias normalmente presentes e/ou responsáveis pelas atividades farmacológicas da planta, mesmo em pequenas concentrações

(Jacome et al., 1999). A figura 8 mostra o perfil cromatográfico qualitativo dos extratos aquosos da *A. chica* à 280nm. O perfil cromatográfico qualitativo do extrato metanólico-MAC à 280nm está indicado na figura 9.



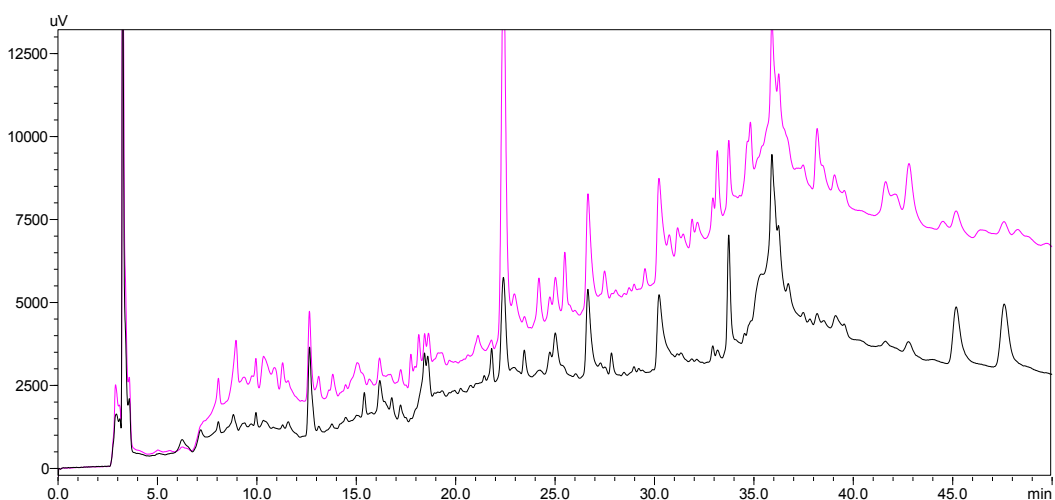
**Figura 8.** Perfil cromatográfico do extrato aquoso bruto-EAB (linha preta) e frações aquosas CA2 (linha vermelha), CO2 (linha verde) e CO3 (linha azul). Condições cromatográficas: Fase móvel: A: Metanol e B: tampão fosfato pH 4,5, gradiente de 0%A a 100% A em 30 min. Detector UV-Vis, detecção em  $\lambda=280\text{nm}$ .



**Figura 9.** Perfil cromatográfico do extrato metanólico-MAC. Condições cromatográficas: Fase móvel: A: Metanol e B: tampão fosfato, pH 4,5, gradiente de 0%A a 100% A em 30 min. Detector UV-Vis, detecção em  $\lambda=280\text{nm}$ .

O perfil cromatográfico qualitativo da fração EE-CO3 está representado na figura 10. Takemura et al. (1995) isolaram o flavonóide luteolina a partir do extrato metanólico das folhas da *A. chica*.

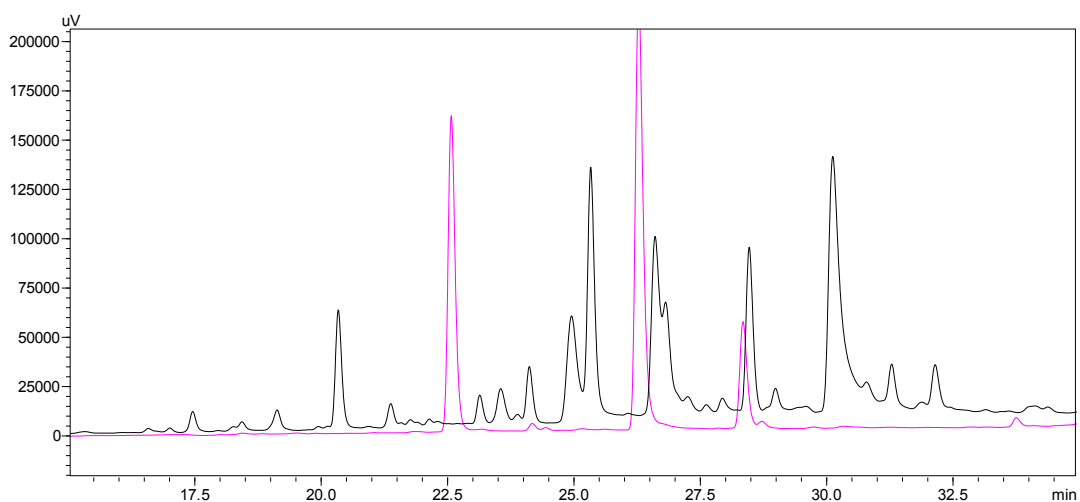
Possivelmente, a luteolina está presente no extrato metanólico-MAC. Entretanto, esse flavonóide não foi utilizado como padrão nesse experimento, não sendo possível confirmar sua presença.



**Figura 10. Perfil cromatográfico qualitativo do extrato EE-CO3. Condições cromatográficas: Fase móvel: A: Metanol e B: tampão fosfato pH 4,5, gradiente de 0%A a 100% A em 30 min. Detector UV-Vis, detecção em  $\lambda=280\text{nm}$  (linha preta) ou  $\lambda=450\text{nm}$  (linha rosa).**

A figura 11 indica o perfil cromatográfico qualitativo do extrato etanólico-EE e do pool dos padrões de flavonóides utilizados: campferol, quercetina e rutina. Os tempos de retenção para campferol, quercetina e rutina foram 28,5; 22,5 e 26,0 respectivamente. A mesma condição cromatográfica usada para o padrão de flavonóides foi utilizada para analisar os

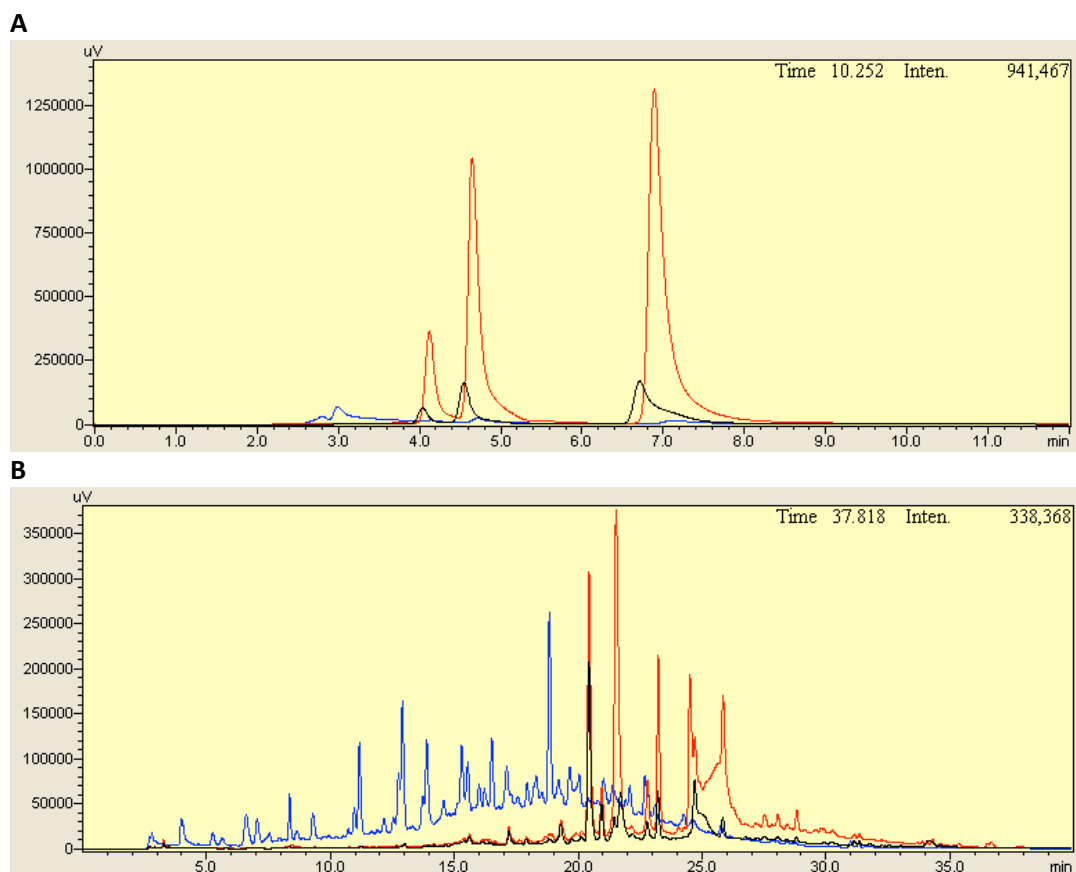
extratos da *A. chica*. O extrato etanólico-EE apresentou um pico no mesmo tempo de retenção (28,5 min) visualizado para o campferol no pool de flavonóides (Fig. 10). Barbosa et al. (2008) isolaram outros dois flavonóides a partir do extrato etanólico: 4'-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone e Vicenin-2.



**Figura 11. Perfil cromatográfico qualitativo de uma amostra contendo os três padrões de flavonóides (campferol, rutina e quercetina) em rosa e perfil do extrato etanólico-EE em preto. Nota-se a presença de campferol no EE pelo pico presente aos 28,5 min. Condições cromatográficas: Fase móvel: A: Metanol e B: tampão fosfato pH 4,5, gradiente de 0%A a 100% A em 30 min. Detector UV-Vis, detecção em  $\lambda=370\text{nm}$ .**

A figura 12 indica o cromatograma dos extratos aquoso EAB, etanólico-EE e metanólico-MAC para comparação à  $\lambda=450\text{nm}$  (A) e  $\lambda=280\text{nm}$  (B). Analisando a figura 12, observa-se que os extratos MAC e EE concentram as substâncias presentes no EAB, além disso, EAB e MAC apresentam picos nos mesmos tempos de retenção, mas com

intensidades diferentes. O extrato etanólico-EE tem pico mais elevado e interessante é que isso se reflete na sua atividade. Como será visto adiante, EE e MAC apresentam atividade citotóxica, entretanto somente EE tem atividade significativa no ponto de vista farmacológico.



**Figura 12. Perfil cromatográfico qualitativo para comparação dos extratos aquoso bruto-EAB (azul), etanólico-EE (vermelho) e metanólico-MAC (preto). Condições cromatográficas: Fase móvel: A: Metanol e B: tampão fosfato pH 4,5, gradiente de 0%A a 100% A em 30 min. Detector UV-Vis, detecção em  $\lambda=450\text{nm}$  (A) e  $\lambda=280\text{nm}$  (B).**

### **Avaliação dos extratos aquosos, etanólico e metanólico na proliferação de células tumorais humanas**

A atividade antitumoral dos extratos aquosos EAB, CA3, CA2, CO3 e CO2, etanólico-EE e metanólico-MAC a  $50\mu\text{g/mL}$  foi avaliada nas culturas de células Jurkat e HL60 em dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados encontram-se sumarizados na figura 13 e tabela 2 a

seguir. A vincristina foi utilizada como controle positivo na concentração de  $1\mu\text{g/mL}$ , e o DMSO (0,01%) como controle negativo. Os resultados do DMSO foram considerados como 0% de inibição da proliferação celular.

Os extratos aquosos não apresentaram atividade citotóxica significativa para as duas linhagens celulares (Fig.13). O mesmo resultado foi observado para o extrato metanólico-MAC.

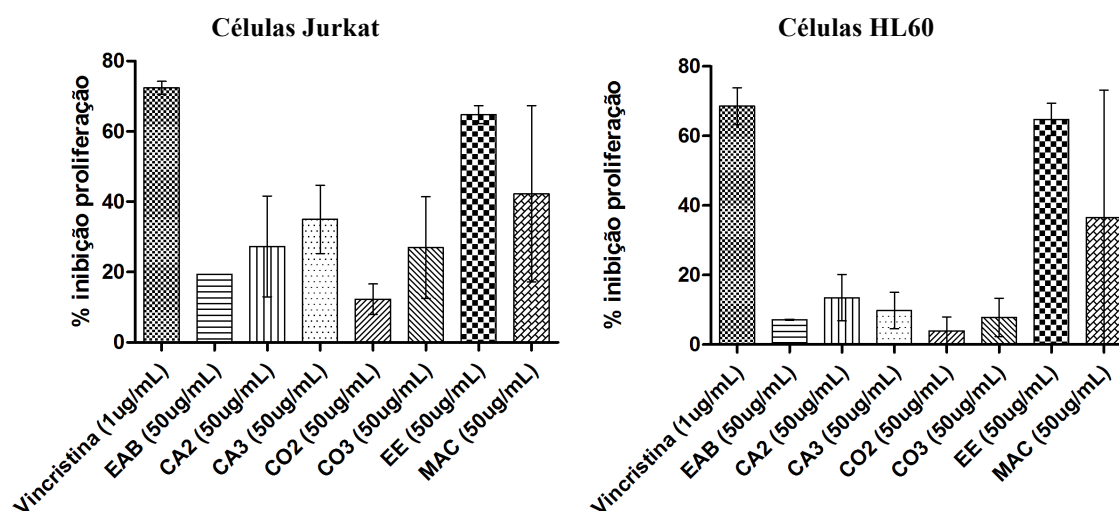


Figura 13. Porcentagem da inibição da proliferação de células Jurkat e HL60 após o tratamento com extratos da *A. chicha* (50µg/mL) ou vincristina (1µg/mL) por 48h. Os dados representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

O extrato etanólico-EE a 50 µg/mL apresentou atividade citotóxica para as células Jurkat (65,0%) e HL60 (65,0%). A atividade foi semelhante a da vincristina (69,0 e 72,0% respectivamente de inibição da proliferação celular a 1µg/mL). Esse resultado pode ser considerado promissor considerando que as amostras testadas se referem a extratos brutos que apresentam resultados semelhantes ao controle positivo, substância já isolada, vincristina.

O extrato etanólico-EE contém o flavonóide campferol. Juntamente com outras substâncias presentes acredita-se que ele seja responsável pela atividade observada. De acordo com Fellows (1992) citado por Kohn et al. (2006), os compostos polares são os principais componentes do extrato etanólico. Barbosa et al. (2008) identificaram várias substâncias no extrato etanólico, entre elas, antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

Tabela 2. Inibição da proliferação celular em células Jurkat e HL60

Tratamento	Células	
	Linhagem HL60 (%)	Linhagem Jurkat (%)
Vincristina	69,0±13,0 a	72,0±3,7 a
EAB	7,2±13,0 b	19,0±3,7 b
CA2	13,0±9,5 b	27,0±20,0 b
CA3	9,8±7,3 b	36,0±14,0 b
CO2	4,0±5,6 b	12,0±6,1 b
CO3	7,9±7,8 b	27,0±20,0 b
EE	65,0±10,0 a	65,0±3,6 a
MAC	37,0±52,0 b	42,0±35,0 b

Os dados representam a média±desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

### Avaliação do extrato etanólico-EE e suas frações na proliferação de células tumorais humanas

Tendo em vista seu efeito citotóxico, o extrato etanólico-EE foi fracionado no intuito de isolar grupos de substâncias ativas.

Para avaliação da citotoxicidade dos extratos a vincristina foi utilizada como controle positivo na concentração de 1µg/mL, e o DMSO (0,01%) como controle negativo. Os resultados do DMSO foram considerados como 0% de inibição da proliferação celular.

As frações EE-CA2, EE-CA3 e EE-CO2 não apresentaram atividade de inibição da proliferação celular significativa para nenhuma das linhagens estudadas nas concentrações testadas (25µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL).

O extrato EE-CO3 apresentou atividade citotóxica de maneira dose-dependente (Fig.14). Observa-se que a melhor atividade é atingida com a concentração de 100µg/mL.

A atividade do extrato etanólico-EE para a linhagem Jurkat na concentração de 50 ou 100µg/mL é semelhante à atividade da vincristina (1µg/mL) (Tab. 3). Os resultados da triagem indicam que o extrato EE e sua fração CO3 apresentam maior atividade antitumoral *in vitro*. Nenhum extrato estudado ou a vincristina utilizada como controle teve atividade significativa contra células MCF-7.

A substância foi considerada ativa na triagem quando apresentou atividade citotóxica acima de 50%.

**Tabela 3. Inibição da proliferação celular em células Jurkat, HL60 e MCF-7**

Tratamento	Células (%)		
	Linhagem Jurkat	Linhagem HL60	Linhagem MCF-7
Vincristina	28,0±6,9 a	68,0±13,0 a	15,57±11,52 a
EE 25µg/mL	14,0±7,7 b	65,0±5,2 a	16,5±15,53 a
EE 50µg/mL	33,0±12,0 a	63,0±14,0 a	19,9±11,5 a
EE 100µg/mL	44,0±13,0 a	70,0±16,0 a	32,0±23,29 a
EE-CO3 25µg/mL	0,9±1,8 b	12,3±12,7 b	13,7±19,4 a
EE-CO3 50µg/mL	2,6±3,1 b	50,9±15,7 a	13,0±0,3 a
EE-CO3 100µg/mL	20,8±19,6 a	77,1±10,4 a	47,0±17,1 a

Os dados representam a média±desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

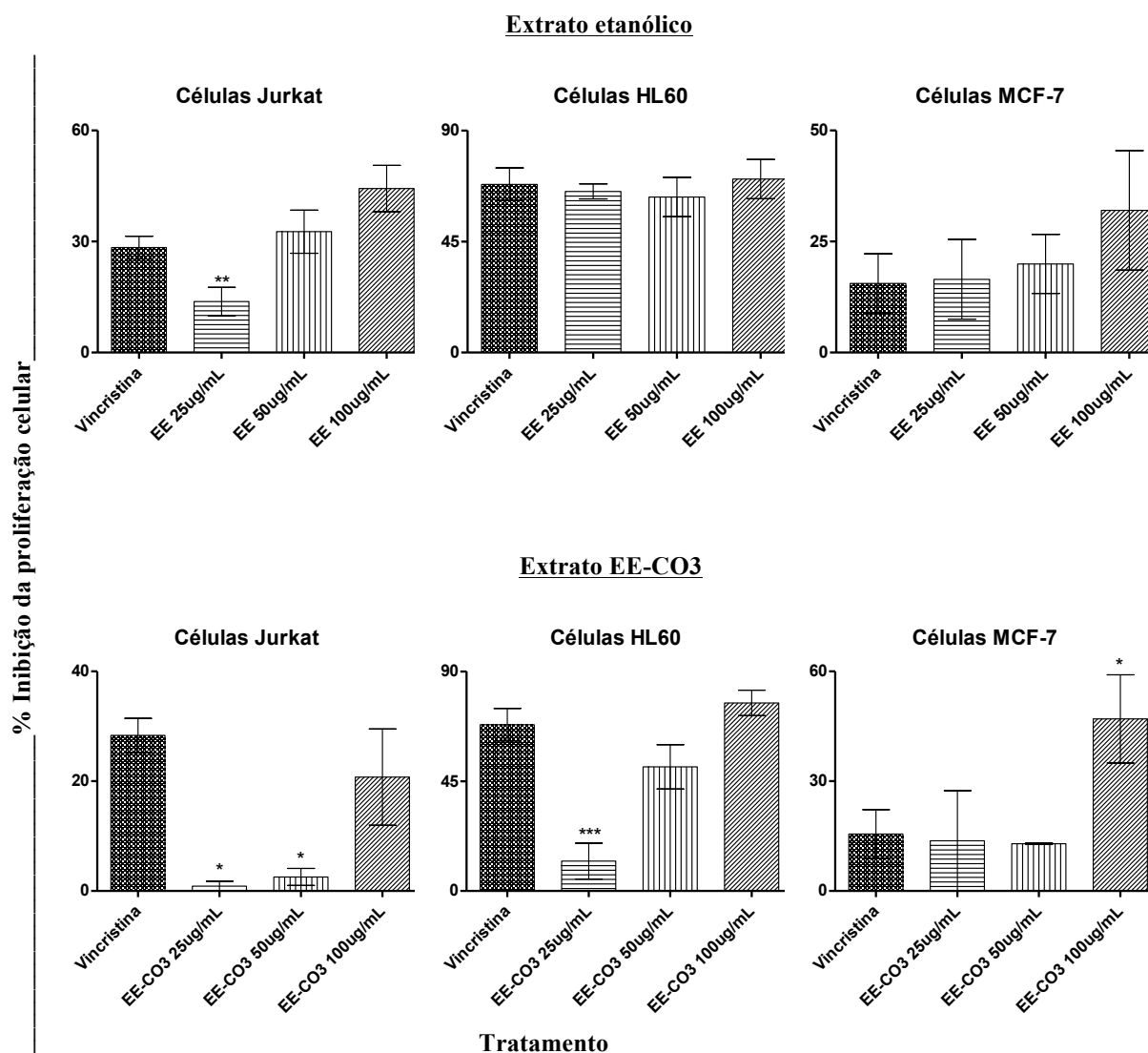


Figura 14. Porcentagem da inibição da proliferação de células Jurkat, HL60 e MCF-7 após o tratamento com extratos da *A. chica* (25, 50 ou 100µg/mL) ou vincristina (1µg/mL) por 48h. Os dados representam as médias de três experimentos independentes realizados em triplicata.

**Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento celular (IC<sub>50</sub>) pelos extratos ativos (EE e EE-CO3)**

As frações ativas EE e sua fração EE-CO3 tiveram sua IC<sub>50</sub> determinada nas

linhagens HL60 e Jurkat, no tempo de 48 horas. A IC<sub>50</sub> do quimioterápico vincristina também foi determinada para a linhagem HL60. As curvas de inibição dos extratos estão apresentadas na figura 15 a seguir.

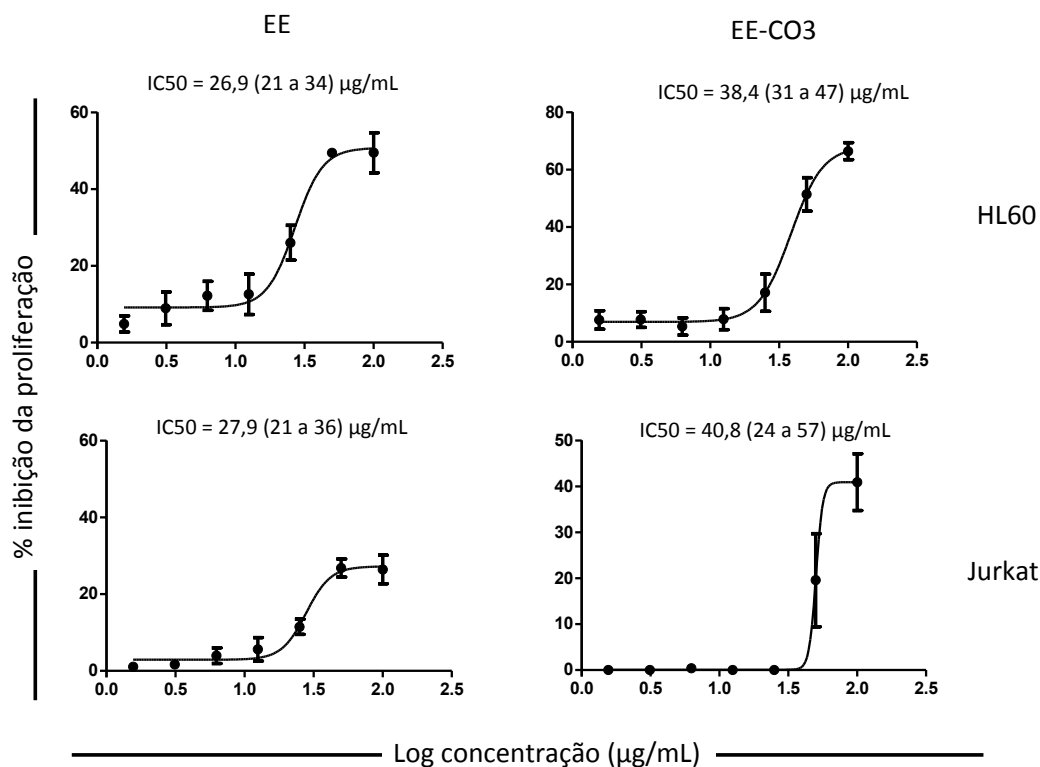


Figura 15. Curvas representativas da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular dos extratos etanólico EE e sua fração EE-CO3 em linhagens leucêmicas. As linhagens foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos por 48 horas e a viabilidade das células foi determinada pelo ensaio de MTT. Dados representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata.

Menores valores de IC<sub>50</sub> implicam em maior citotoxicidade. Os resultados indicam que a citotoxicidade para os dois extratos é um pouco maior para a linhagem HL60 (Tab.4). Essa diferença pode indicar uma atividade específica para cada tipo celular. O extrato EE apresenta menor valor de IC<sub>50</sub> comparado à sua fração EE-CO3 para as duas linhagens celulares, indicando maior citotoxicidade. Esse dado sugere uma ação sinérgica das substâncias presentes no extrato EE.

Vale ressaltar que o critério para a atividade citotóxica de extratos brutos estabelecido pelo *American National Cancer Institute* (ANCI) é de IC<sub>50</sub><30µg/mL nos ensaios preliminares (Raj Kapoor et al., 2007). O extrato etanólico-EE apresentou valores de IC<sub>50</sub><30µg/mL para as duas linhagens testadas.

A fração EE-CO3 apresenta elevado valor de IC<sub>50</sub> para as células Jurkat (>100µg/mL).



**Tabela 4. Valores de IC<sub>50</sub> dos extratos etanólico-EE e fração EE-CO3 nas linhagens celulares Jurkat e HL60**

Células	Tratamento	IC50 (µg/mL)	Intervalo de confiança
HL60	EE	26,93 µg/mL	21,8 a 34,4 µg/mL
	EE-CO3	38,47 µg/mL	31,2 a 47,4 µg/mL
	Vincristina	0,01 µg/mL	0,001 a 0,06 µg/mL
Jurkat	EE	27,91 µg/mL	21,5 a 36,3 µg/mL
	EE-CO3	>100 µg/mL	-

A determinação da IC<sub>50</sub> para a linhagem MCF-7 não foi realizada pois os valores de inibição da proliferação celular obtidos a partir da triagem inicial demonstraram que até mesmo na concentração de 100µg/mL os extratos não apresentaram atividade citotóxica significativa contra essa linhagem.

#### **Avaliação da fragmentação do DNA nas linhagens HL60 e Jurkat**

A maioria das substâncias quimioterápicas em uso clínico induz apoptose das células malignas (Kumar et al., 2007). Portanto, a avaliação desses parâmetros apoptóticos são de grande relevância para o desenvolvimento de fármacos contra o câncer (Sellers & Fisher, 1999).

As células HL60 tratadas com o extrato etanólico-EE na concentração de 50µg/mL apresentaram valores significativamente maiores de fragmentação do DNA celular (85,3±1,4%) comparado ao controle (DMSO 0,01%) (2,9±0,6%) (p<0,0001). O resultado obtido para o tratamento com o extrato etanólico-EE se compara ao observado para a vincristina (87,0±1,5%), usada como controle positivo (p<0,0001).

Para a linhagem celular Jurkat observa-se menor atividade do extrato etanólico-EE. Mas mesmo para essas células, observa-se que o extrato induz fragmentação significativa do DNA celular (38,0±5,5%) comparado ao controle (1,8±0,65%) (p<0,0001). A atividade de indução da fragmentação do DNA celular da vincristina foi superior (73,0±3,8%) àquela apresentada pelo extrato etanólico-EE e controle (Tab.5).

Ren et al., (2010) reportaram que quercetina e campferol apresentam significativo efeito anti-leucêmico *in vitro*. Esses flavonóides induziram parada do ciclo celular em G2/M e apoptose de células HL60. Além disso inibiram a expressão de survivin, que protege as células tumorais de ativarem a apoptose.

A eficácia de um agente quimioterápico está relacionado à propensão intrínseca da célula tumoral em desencadear a apoptose, entre outros mecanismos (Kumar et al., 2007; Pinto et al., 2009b). Nesse estudo foi observado que ocorre variação da resposta ao tratamento de acordo com a linhagem celular utilizada.

**Tabela 5. Fragmentação do DNA de células Jurkat e HL60 (%)**

Tratamento	Linhagem HL60 (%)	Linhagem Jurkat (%)
Controle	2,95±0,55a	1,80±0,65a
Vincristina	87,00±1,46b	73,00±3,80b
EE	85,34±1,44b	38,00±5,50c
CA3	2,50±0,78a	1,50±0,11a

Dados apresentados como média±desvio padrão. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,0001$ ).

A fração aquosa CA3 não induziu fragmentação significativa de DNA para as linhagens HL60 ( $2,5 \pm 0,8$ ) ou Jurkat ( $1,5 \pm 0,1$ ) após tratamento por 24 horas. O percentual de células com o DNA

fragmentado foi semelhante ao apresentado na cultura controle, tratadas com DMSO, para os dois tipos celulares (Fig. 16).

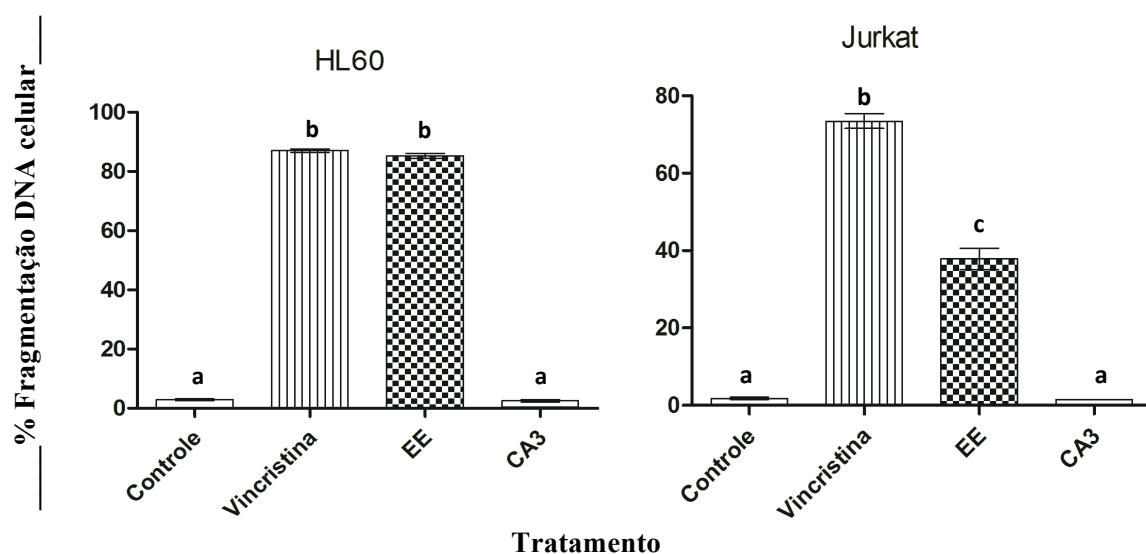
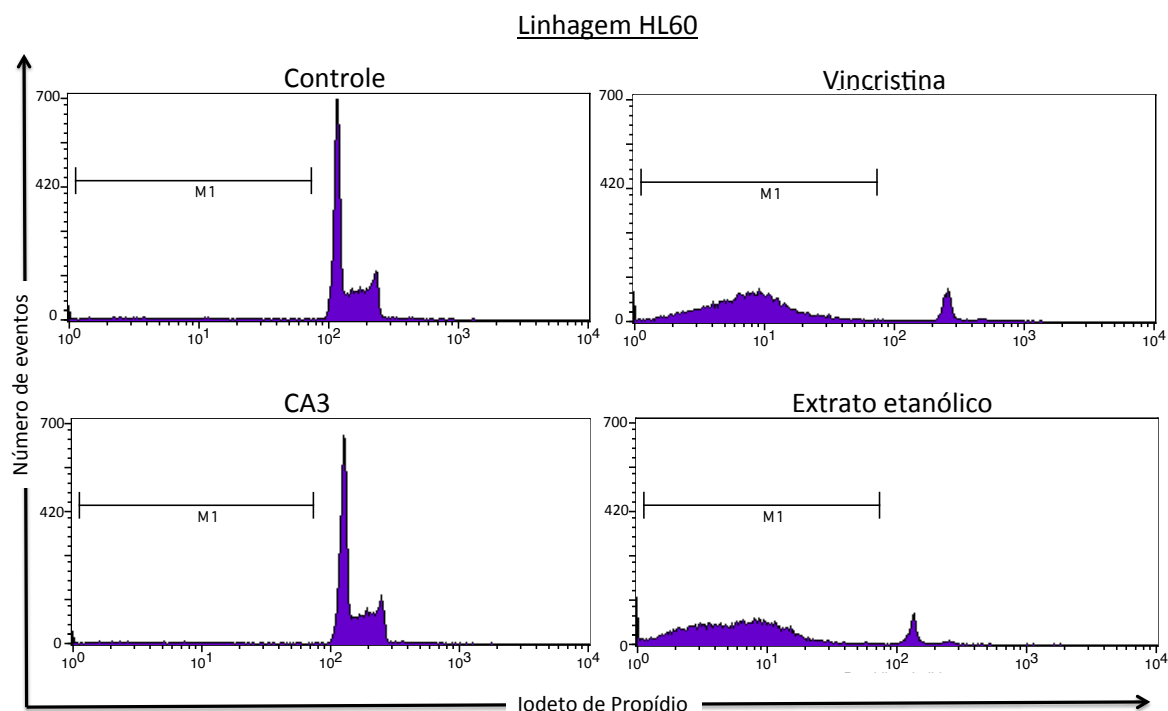


Figura 16. Avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide de células HL60 e Jurkat tratadas com os extratos etanólico (50ug/mL) e aquoso CA3 (50ug/mL) da *A. chica* e vincristina (controle positivo) ou DMSO (controle negativo). Dados representativos de três experimentos independentes (\*  $p < 0,001$ , teste T-Student).



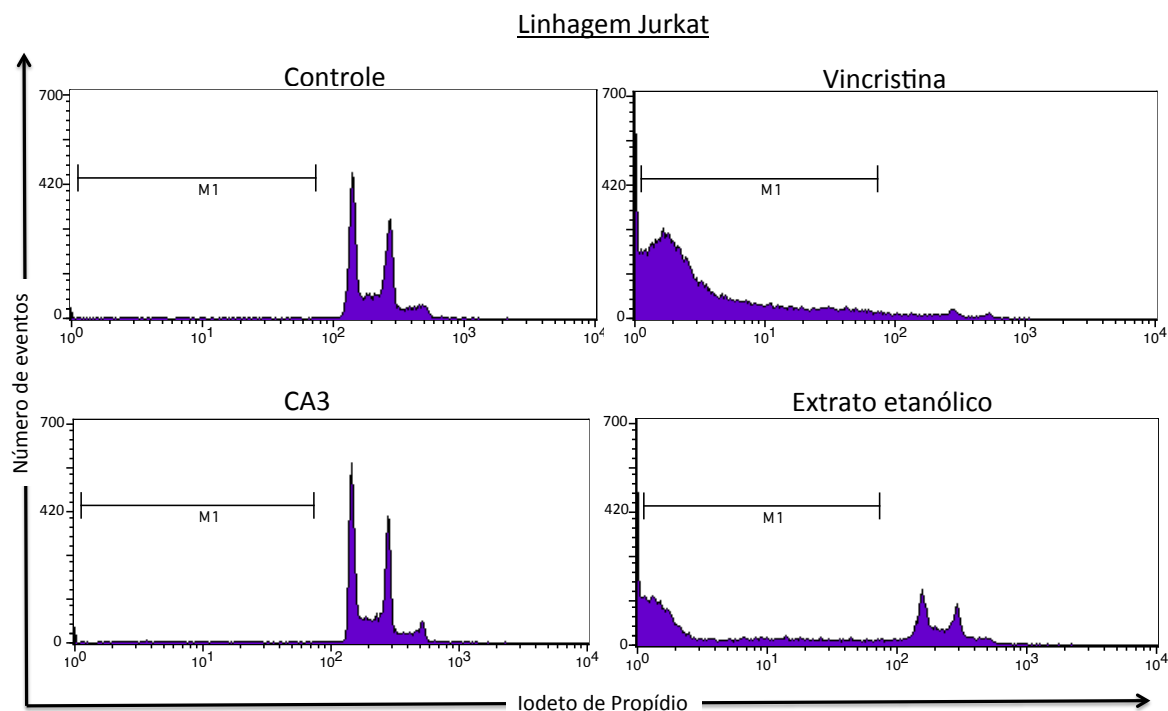
**Figura 17.** Avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide de células HL60 tratadas com os extratos etanólico e aquoso CA3 da *A. chica*. Células foram incubadas com os extratos a 50ug/mL durante 24 horas, e posteriormente, marcadas com iodeto de propídeo e quantificadas por citometria de fluxo. Dados representativos três experimentos independentes (\*  $p < 0,05$ , teste T-Student). Histograma apresenta o conteúdo de DNA (eixo X, fluorescência do IP) versus número de eventos (eixo Y).

O histograma das culturas celulares, Jurkat ou HL60, tratadas com o extrato aquoso CA3 é semelhante ao da cultura controle, já que o extrato não apresentou atividade citotóxica contra as células tumorais (Fig. 17 e Fig.18).

Em relação ao tratamento com o extrato etanólico-EE, a análise dos histogramas da linhagem Jurkat indica que o extrato não induz fragmentação do DNA celular semelhante à atividade do quimioterápico vincristina. Entretanto, a taxa de fragmentação do DNA celular é significativamente maior em relação ao controle (Fig. 18).

Possivelmente a atividade antitumoral observada no extrato etanólico-EE se deve a presença de antocianinas e flavonóides. A análise cromatográfica (CLAE) do extrato indicou a presença campferol. Além desse flavonóide, Barbosa et al. (2008) isolaram outros dois flavonóides a partir do extrato etanólico da *A. chica*: 4'-hidroxi-3,7-dimetoxi flavona e vicenin-2.

A ação medicinal dos compostos fenólicos é principalmente atribuída à sua capacidade antioxidante, quelação de íons metálicos redox ativos, modulação da expressão gênica e interação com as vias de sinalização celular (Soobrattee et al., 2005).



**Figura 18.** Avaliação do conteúdo de DNA sub-diplóide de células Jurkat tratadas com os extratos etanólico e aquoso CA3 da *A. chica*. Células foram incubadas com os extratos a 50ug/mL durante 24 horas, e posteriormente, marcadas com iodeto de propídeo e quantificadas por citometria de fluxo. Dados representativos de três experimentos independentes (\*  $p < 0,05$ , teste T-Student). Histograma apresenta o conteúdo de DNA (eixo X, fluorescência do IP) versus número de eventos (eixo Y).

O resultado apresentado pelo extrato etanólico-EE foi considerado promissor levando-se em consideração que se trata de um extrato bruto, comparado à vincristina usada como controle. Esses resultados estimulam o desenvolvimento de futuros trabalhos direcionados à purificação e isolamento das substâncias ativas dos extratos da *A. chica* com atividade antitumoral.

Futuramente espera-se avaliar o efeito dos extratos sobre os genes supressores tumorais que regulam a transcrição nuclear e o ciclo celular. Especialmente a proteína p53, produto do gene p53, considerada a guardiã do genoma, por controlar a replicação do DNA, a proliferação celular e a apoptose.

Além disso, o desenvolvimento de futuros estudos envolvendo os membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 devem ser realizados a fim de elucidar quais são

os mecanismos envolvidos no efeito pró-apoptótico apresentado pelo extrato etanólico-EE da *A. chica*.

## CONCLUSÃO

O método de extração do extrato etanólico-EE é o mais eficiente em isolar as substâncias ativas da *A. chica*.

Dentre os extratos da *A. chica* testados, o extrato etanólico-EE, rico em flavonóides, foi o extrato com maior potencial como agente antitumoral.

O aumento do conteúdo de DNA subdiplóide, observado pela indução de fragmentação do DNA nas células HL60 e Jurkat tratadas com esse extrato, sugere que o mesmo possui um potencial pró-apoptótico.

### Capítulo 3

#### **Atividade antiinflamatória e antiangiogênica do extrato etanólico e fração aquosa CA3 da *Arrabidaea chica***

#### **RESUMO**

As substâncias com atividade anti-angiogênicas são ferramentas terapêuticas importantes no tratamento do câncer. A planta *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae) apresenta efeitos biológicos incluindo atividades antiinflamatória e antitumoral por mecanismos ainda pouco elucidados. Nesse estudo, investigou-se os efeitos de extratos de folhas da *A. chica* sobre a angiogênese e a migração de células inflamatórias em modelo de implante de esponja murino. Esponjas de poliuretano-poliéster foram implantadas em 32 camundongos Swiss tratados por via oral durante 10 dias com os extratos etanólico-EE nas concentrações de 30 ou 300mg/kg ou fração aquosa CA3 (300mg/kg/dia). Os implantes foram processados para a avaliação da concentração de hemoglobina (Hb), utilizado como um índice indireto da angiogênese e determinação da concentração de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O acúmulo de neutrófilos e macrófagos foi determinado pela medição das atividades da mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-B-D-glicosaminidase (NAG), respectivamente. O soro foi obtido para determinação do perfil protéico total por refratometria e fracionado por eletroforese. A concentração das citocinas Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4, IL-5) foi determinada no soro por citometria de fluxo (CBA - *cytometric beads array*). Os tratamentos com o extrato etanólico-EE e a fração aquosa CA3 reduziram a neoformação vascular no implantes de esponja sem alterar os valores de VEGF. Além disso, causaram redução no número de neutrófilos infiltrados na esponja, medidos pela atividade de MPO. O tratamento com os extratos da *A. chica* não alteraram o peso úmido e o recrutamento de macrófagos (atividade da NAG) nos implantes de esponja. Também não houve alterações no perfil protéico sérico para qualquer grupo estudado ou nas concentrações das citocinas Th1/Th2 séricas circulantes. Conclui-se que o extrato etanólico-EE e a fração aquosa da *A. chica* apresentam atividade antiinflamatória interferindo na atividade de neutrófilos e atividade antiangiogênica, sem alterar a concentração local de VEGF ou os valores circulantes das citocinas Th1/Th2.

Palavras chave: *Arrabidaea chica*, NAG, MPO, inflamação, angiogênese

## ABSTRACT

Substances with anti-angiogenic activity are valid therapeutic tools in cancer treatment. *Arrabidaea chica* has been reported to have multiple biological effects including anti-inflammatory and anti-tumor activity in vitro and in vivo by mechanisms still poorly understood. The aim of this study was to investigate the effects of ethanol (EE) and aqueous (CA3) extracts of *A. chica* on inflammatory angiogenesis using the murine sponge model over a 10-day period. Polyester-polyurethane sponges were implanted in mice (n=32) treated with CA3 (300mg/kg/day) or ethanolic-EE extracts (30 or 300mg/kg/day) orally for ten days. The implants were processed for the assessment of hemoglobin used as an index for angiogenesis and to determine the concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF). Accumulation of neutrophils and macrophages was determined by measuring myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl-B-D-glucosaminidase (NAG) activities respectively. Also the serum protein profile was evaluated by agarose gel electrophoresis. No adverse side effects due to treatment were observed. The concentration of Th1 cytokines (IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) and Th2 cytokines (IL-4, IL-5) in serum was determined by flow cytometry (*CBA - cytometric bead array*). Blood vessel formation was reduced by the treatments with ethanol-EE and CA3 extracts without changes in VEGF concentration. In addition, the treatments reduced the number of neutrophils infiltrated into the sponge implants, as measured by MPO activity. The treatments with ethanol-EE and CA3 extracts did not alter the wet weight and the recruitment of macrophages (NAG activity) in the sponge implants. There were no changes in serum protein profile for any group studied nor the serum concentrations of Th1/Th2 cytokines. The results indicate that ethanol extract-EE and aqueous fraction-CA3 of *A. chica* have anti-inflammatory activity interfering with the mobility of neutrophils and antiangiogenic activity, without affecting local concentration of VEGF or circulating levels of Th1/Th2 cytokines.

Keywords: *Arrabidaea chica*, NAG, MPO, inflammation, angiogenesis

## INTRODUÇÃO

A angiogênese e inflamação são componentes fundamentais para a manutenção de uma variedade de condições patológicas (Albini et al., 2005). A inibição da formação de vasos sanguíneos e do influxo de células inflamatórias para os sítios de lesões representa uma ferramenta terapêutica válida para controle de processos fisiopatológicos (Moura et al., 2011).

Os benefícios terapêuticos de metabólitos secundários de plantas têm sido focados em muitos estudos. A *Arrabidaea chica* é uma Bignoniaceae encontrada principalmente na América tropical e África (Takemura et al., 1995). Suas folhas são empregadas na medicina popular para cicatrização de feridas, cólica intestinal, afecções na pele, disfunções no sangue e leucemia (Takemura et al, 1995; Zorn et al 2001; Barbosa et al, 2008). A atividade anti-inflamatória de seus extratos tem sido relatada (Zorn et al, 2001; Oliveira et al, 2008), no entanto, o mecanismo de ação ainda é pouco compreendido.

O extrato lipofílico de *A. chica* inibe a transcrição do fator NF- $\kappa$ B que desempenha um papel fundamental no controle da expressão de enzimas pró-inflamatórias, tais como iNOS e COX-2 (Zorn et al., 2001). O extrato aquoso administrado para ratos envenenados pelos venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* inibe a infiltração de leucócitos e a miocitolise provocada pelo veneno (Oliveira et al, 2008). Os extratos aquoso e etanólico apresentaram efeito antitumoral contra o tumor sólido de Ehrlich em camundongos Swiss e efeito imunomodulador (Ribeiro et al., 2012). Além disso, o extrato etanólico possui atividade citotóxica (Ribeiro et al., 2010) e anti-apoptótica *in vitro*. O extrato etanólico inibe a proliferação celular e induz apoptose de células leucêmicas Jurkat e HL60,

possivelmente relacionado à presença de flavonóides.

Sabe-se que várias moléculas como antioxidantes, retinóides e flavonóides tem potencial antiangiogênico (Noonan et al., 2007). O chá verde por exemplo, contém o flavonóide epigallocatequina galate que apresenta efeito inibitório direto na angiogênese *in vivo* por mecanismos que envolvem a regulação de metaloproteases, interferência na sinalização e produção de VEGF. Os polifenóis reduzem a angiogênese, em parte, por diminuir a produção de VEGF (Beltz et al., 2006).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é considerado o principal fator envolvido na angiogênese tumoral e a terapia antiangiogênica com substâncias capazes de bloquear sua função e suprimir o crescimento tumoral é bastante promissora para tratamentos clínicos (Noonan et al., 2007).

Tendo em vista que extratos da *A. chica* apresentam efeito antiinflamatório (Zorn et al., 2001) por mecanismos pouco elucidados e sabendo que os flavonoides representam um dos seus metabólitos secundários, propôs-se verificar se os extratos aquoso CA3 e etanólico (EE) da *A. chica* apresentam efeito inibitório sobre a angiogênese inflamatória utilizando o modelo murino de implante de esponja.

### Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato aquoso CA3 e do extrato etanólico da *A. chica* na inflamação e angiogênese em modelo de implante de esponja murino.

### Objetivos específicos

Avaliar o componente inflamatório (neutrófilos e macrófagos) do tecido conjuntivo fibrovascular induzido pelo implante de esponja e sua modulação pelo tratamento com os extratos.

Caracterizar através de parâmetros bioquímicos a angiogênese e sua modulação pelo tratamento com os extratos.

Avaliar o efeito dos extratos na produção de citocinas pró-inflamatória no implante de esponja.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Extratos

Os extratos utilizados nesse experimento foram o extrato etanólico-EE e a fração aquosa CA3.

### Implantação dos discos de esponja

Foram utilizados 32 camundongos Swiss (Moura et al., 2011). Os discos de esponja de poliéster-poliuretano (8x5mm e 4,6g de peso) (Vitafoam Ltd., Manchester, UK) foram usados como matriz para o crescimento do tecido fibrovascular. O disco de esponja foi embebido em etanol 70% por 12 horas e esterilizado por fervura em água destilada durante 15 minutos antes de ser introduzido no animal.

Os animais foram anestesiados com a associação cloridrato de quetamina (50mg/kg) e xilazina (50mg/kg) por via subcutânea. A região dorso-lombar foi tricotomizada e foi feita a antissepsia da pele usando etanol 70%. O tecido subcutâneo foi divulsionado e o implante inserido na linha média dorsal, 2 cm acima da região de incisão.

Os animais foram mantidos em caixas individuais com ração comercial e água *ad libitum*. Foram formados quatro grupos (n=8) tratados por via oral, por gavagem durante 10 dias. Grupo 1: controle, recebeu água (200µL), grupo 2: extrato etanólico-EE (30µg/kg PV), grupo 3: extrato etanólico-EE (300µg/kg PV), grupo 4: extrato CA3 (300µg/kg PV),

todos diluídos em água com volume final de 200µL.

Após 10 dias de tratamento os animais foram sacrificados e coletou-se sangue sem anticoagulante para obtenção do soro utilizado para a determinação do valor da proteína sérica total por refratometria e dos valores das proteínas fracionadas: albumina, alfa, beta e gama-globulinas por eletroforese em gel de agarose, utilizando tampão Tris e corante Ponceau.

Os discos de esponjas foram cuidadosamente removidos, dissecados do tecido aderente, pesados e analisados quanto ao processo angiogênico e inflamatório.

### Quantificação da angiogênese através da dosagem de hemoglobina (Hb)

Os implantes de esponja foram pesados e processados (Moura et al., 2011). A neovascularização foi avaliada pela quantificação de hemoglobina presente nos implantes através de método colorimétrico pelo método de Drabkin & Austin (1932) adaptado como índice de neovascularização por Plunkett et al., (1990).

Neste método a hemoglobina reage com o reagente de Drabkin formando cianometahemoglobina. A absorbância final a 540nm é proporcional à concentração de hemoglobina. Assim, quanto maior for a vascularização, maior a quantidade de sangue no local e, por conseguinte maior a concentração de hemoglobina.

Os implantes foram pesados e homogeneizados em 2mL de reagente de Drabkin (Kit de dosagem hemoglobina-Labtest). O homogenato foi centrifugado por 20min a 4000g e o sobrenadante filtrado em filtro 0.22 µm (Millipore).

As amostras (200uL) foram adicionadas em duplicata a uma placa de 96 poços. A concentração de hemoglobina das



amostras foi determinada através de leitura espectrofométrica a 540nm, usando leitor de microplacas de ELISA (SPECTRAMax PLUS, microplate spectrophotometer, Molecular Devices; Califórnia/USA). As leituras foram

comparadas à curva-padrão de hemoglobina (Fig.19) previamente estabelecida. A concentração de hemoglobina foi expressa em  $\mu\text{g/mL}$ .

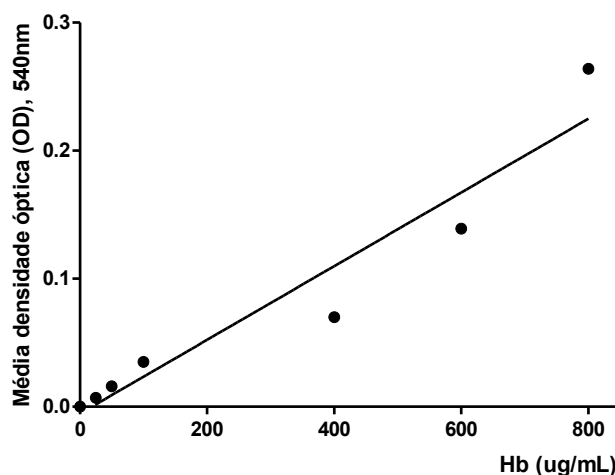


Figura 19. Curva padrão da concentração de hemoglobina em  $\mu\text{g/mL}$ .

### **Técnica para dosagem da atividade de Mieloperoxidase (MPO)**

O recrutamento de neutrófilos foi medido pela atividade da mieloperoxidase (MPO) que é uma enzima encontrada nos seus grânulos azurófilos. A dosagem de MPO tem sido usada com sucesso como um marcador bioquímico de recrutamento de neutrófilos na lesão e permite demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (Mullane et al., 1985; Cross et al., 2003).

Após a dosagem da hemoglobina, o sedimento obtido foi pesado e solubilizado em 2mL de tampão fosfato de sódio a 80mM, pH 6,0. Transferiram-se 300 $\mu\text{L}$  da amostra para um microtubo e foram acrescidos 600 $\mu\text{L}$  de HTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio-Sigma) a 0,75%, em tampão fosfato de sódio a 80mM, pH 5,4, misturada, sonicada durante 10 segundos e centrifugada a 2.700g por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi usado no ensaio enzimático. Foram adicionados ao microtubo 100 $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 1,2mM em tampão fosfato de sódio 80mM pH 5,4; 100 $\mu\text{L}$  de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-Sigma) a 6,4mM diluído em DMSO (dimetilsulfóxido-Merck) e 200 $\mu\text{L}$  do sobrenadante das amostras. Esses reagentes foram incubados a temperatura ambiente durante 1 minuto. Após este período, foi adicionado  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ácido sulfúrico) a 4M para paralisar a reação. Transferiu-se 200 $\mu\text{L}$  do produto da reação para a placa de ELISA e foi feita a leitura em espectrofotômetro a 450nm. A atividade de MPO foi expressa em densidade óptica (OD)/mg de peso úmido do tecido.

### **Técnica para dosagem de atividade de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG)**

A N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. Esta técnica é utilizada para quantificar a infiltração

destas células nos sítios inflamatórios (Bailey 1988).

Após a dosagem da hemoglobina, o sedimento obtido foi pesado e solubilizado em 2mL de solução de NaCl a 0,9% w/v contendo 0,1% v/v de Triton X-100. Procedeu-se à centrifugação a 3000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado para o ensaio enzimático.

Foram adicionadas à placa de microtitulação de 96 poços 100µL do sobrenadante em duplicata; 100µL de substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-

glicosamina - Sigma) 2,24 mM em tampão citrato/fosfato de sódio 0,1M pH 4,5. Após uma incubação a 37°C durante 10 minutos. Para paralisar a reação foram adicionado 100µL de tampão glicina pH 10,6 (misturados volumes iguais de glicina a 0,8M; NaCl a 0,8M e NaOH a 0,8M) em cada poço. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor ELISA a 400nm. Os resultados foram expressos como atividade NAG em densidade óptica (OD)/mg de peso úmido do implante, comparados a uma curva padrão com 6 pontos (Fig.20).

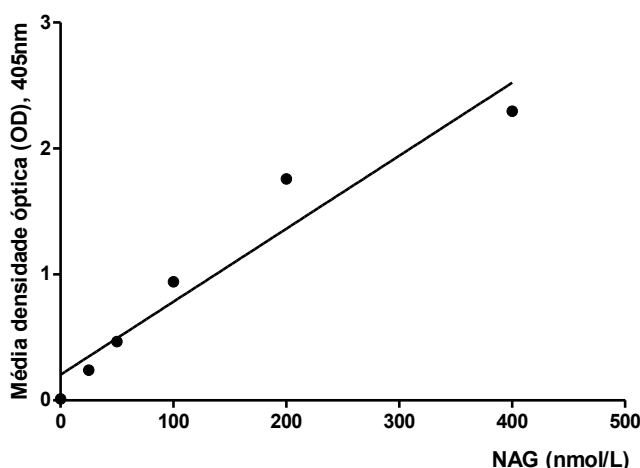


Figura 20. Curva padrão da concentração de NAG em nmol/L.

### Ensaio imunoenzimático para dosagem de VEGF e TNF-α

As concentrações de VEGF e TNF-α foram determinadas no sobrenadante da dosagem de hemoglobina, utilizando-se kit específico para cada citocina e de acordo com o protocolo do fabricante. Os ensaios foram realizados usando placa de microtitulação (ELISA).

Para tanto, 100µL do sobrenadante da

dosagem de hemoglobina foram homogeneizadas em 500µL de PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween-20 (Difco), centrifugadas a 12.000g a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante foi reservado.

Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata e os resultados foram expressos em µg/mL. Uma curva-padrão foi obtida usando diluições seriadas a partir de 1000pg (picogramas)/mL (Fig.21).

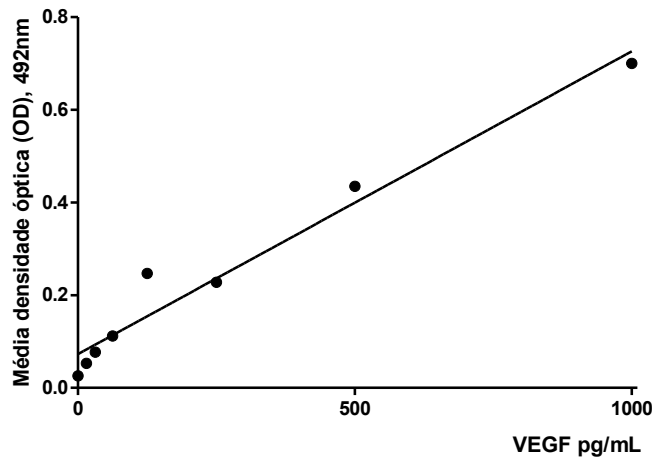


Figura 21. Curva padrão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em pg/mL.

#### **Avaliação da concentração de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-2, IL-4) no soro**

Foi utilizado o kit BD CBA Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit para determinar a concentração de: Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL-5), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF) no soro de camundongos Swiss com implantes de esponjas tratados com os extratos etanólico-EE e aquoso-CA3 (300mg/kg) da *A. chica*. O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante.

#### **Avaliação bioquímica sérica: análise da função renal e função hepática e determinação do perfil protéico total e fracionado**

Afim de verificar possíveis efeitos colaterais devido ao tratamento a função hepática foi avaliada pela concentração de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro. A função renal também foi avaliada pela dosagem de uréia e creatinina no soro. As concentrações foram estabelecidas por análise colorimétrica com o auxílio de kits comerciais (Bioclin-Belo Horizonte, MG, Brasil) utilizando um analisador bioquímico (TP Analyzer Basic,

Thermoplate).

O valor da proteína total sérica foi determinado em refratômetro manual (Ningbo Utech International CO LTDA, modelo 301). O perfil protéico fracionado foi obtido por eletroforese em gel de agarose, utilizando tampão Tris e corrente de 100V por 32 minutos. O gel foi corado e escaneado e a leitura das bandas realizada em software Celm SE-250.

Os valores relativos (%) e absolutos (g/dL) das frações protéicas foram determinadas a partir da concentração das proteínas totais obtidas pelo refratômetro (Ningbo Utech International CO LTDA, modelo 301). A relação albumina/globulina foi calculada como albumina/(a1+a2+b+y globulinas).

#### **Avaliação histológica dos implantes de esponja**

Os implantes de três animais por grupo foram dissecados do tecido subcutâneo e fixados em formol 10% neutro e tamponado. Posteriormente foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções de 4 $\mu$ m foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) (Luna, 1968) para avaliação histológica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

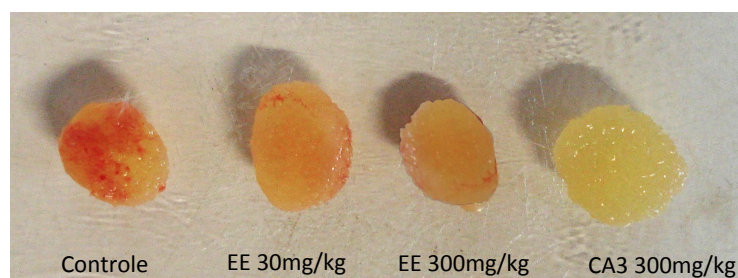
### Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias±desvio padrão. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a diferença entre grupos verificada pelo teste de Student Newman-keuls.

Os resultados foram considerados significativos para  $P < 0,05$ . O programa estatístico usado foi o GraphPad Prism 5.

O modelo murinho de implante de esponja foi utilizado para avaliar o efeito dos extratos etanólico-EE da fração aquosa CA3 sobre a inflamação e angiogênese. Também foi avaliado o perfil de citocinas, perfil protéico sérico total e fracionado e as funções renal e hepática.

A matriz esponjosa foi bem tolerada por todos os animais e nenhum sinal macroscópico de infecção ou rejeição do implante foi observado durante todo o período experimental (Fig. 22).



**Figura 22.** Fotografia dos implantes de esponja retirados dos animais dos grupos controle e tratados com os extratos aquoso CA3 e etanólico-EE da *A. chica*.

A administração por via oral dos extratos etanólico (30 ou 300mg/kg) e aquoso CA3 (300mg/kg) durante todo período experimental não mostrou sinais de toxicidade, tais como diarreia, perda de peso, alterações na atividade motora dos animais.

A avaliação das funções hepática e renal indicaram que o tratamento com o extrato etanólico a 300mg/kg ou o extrato aquoso

CA3 a 300mg/kg não produz alterações nos órgãos (Tabela 6).

Testes de toxicidade aguda indicaram que a  $DL_{50}$  do extrato aquoso da *A. chica* em camundongo ultrapassa 6g/kg por via oral. Nenhum sinal de toxicidade foi observado nos testes de toxicidade crônica (Oliveira et al., 2008).

**Tabela 6. Função renal e hepática de camundongos com implantes de esponja tratados com os extratos etanólico-EE (300mg/kg) e aquoso CA3 (300mg/kg) da *A. chica*. Concentração sérica de uréia, creatinina, ALT e AST**

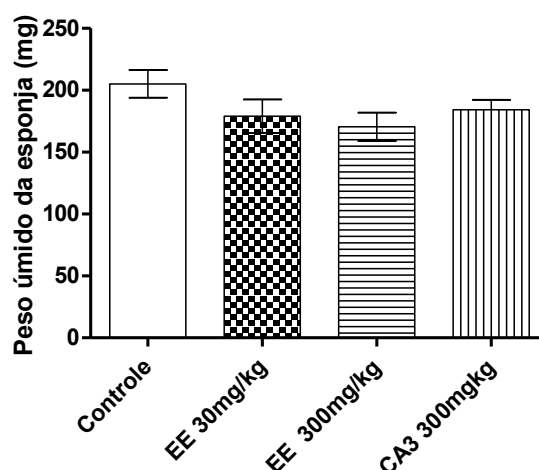
	Controle	EE (300mg/kg)	CA3 (300mg/kg)
Ureia (mg/dL)	61.69±4.50	52.53±9.63	59.44±17.18
Creatinina (mg/dL)	0.37±0.09	0.38±0.03	0.44±0.08
ALT (U/I)	39.52±5.42	36.42±15.08	32.95±5.27
AST (U/I)	134.7±29.45	132.9±50.95	143.5±25.25

Dados apresentados como média±desvio padrão. Não houve diferença entre grupos ( $P \leq 0,05$ ).

### Infiltrado inflamatório

A infiltração celular e deposição de matriz extracelular nos implantes de esponja foram avaliadas

quantitativamente a partir do peso úmido das esponjas. Observou-se que os tratamentos com diferentes extratos da *A. chica* não alteraram o peso úmido dos implantes (Fig. 23).



**Figura 23. Peso úmido (g) dos implantes de esponja dos grupos controle (salina) e tratados com o extrato etanólico (EE) ou a fração aquosa CA3 (CA3) da *A. chica*. Não houve diferença para peso úmido entre os grupos tratados e o grupo controle. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. \*  $P < 0,05$ .**

### Avaliação da inflamação nos implantes de esponja

A dosagem da MPO possibilita demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa e correlaciona-se fortemente com a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação.

O tratamento dos animais por 10 dias com os extratos etanólico-EE nas concentrações de 30 ou 300mg/kg e CA3

na concentração de 300mg/kg provocou diminuição da concentração da enzima pró-inflamatória mieloperoxidase (MPO), indicando menor quantidade de neutrófilos recrutados na esponja (Fig. 24A).

A mieloperoxidase é uma enzima encontrada em neutrófilos e difere estrutural e imunologicamente da peroxidase de eosinófilo (EPO). A MPO é um importante agente bactericida que catalisa a formação de hipoclorito a partir

de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e cloreto (Sorensen & Borregaard, 1999).

No presente trabalho, tanto o extrato etanólico quanto o extrato aquoso administrados pela via oral foram capazes de inibir a migração de neutrófilos, sugerindo uma ação sobre fatores pró-inflamatórios.

Já foi demonstrado que o extrato aquoso da *A. chica* administrado pelas vias intraperitoneal (2,5g/kg peso) ou subcutânea (10,6g/kg) é capaz de inibir a infiltração de granulócitos induzida pelo veneno de *B. atrox* e *C. durissus ruruima* no tecido. Entretanto, pela via oral, não apresenta efeito antiinflamatório em nenhuma das doses testadas (Oliveira et al., 2008). Os autores sugerem a presença de substâncias no extrato capazes de inibir as toxinas do veneno que induzem o processo inflamatório ou capazes de inibir fatores endógenos que estimulam os processos pró-inflamatórios.

O extrato da *A. chica* inibe o fator nuclear-κB (NF-κB) (Zorn et al., 2001). Sabe-se que o NF-κB atua em genes pró-inflamatórios que geram mediadores da inflamação e moléculas de adesão importantes para o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação (Barnes & Karin, 1997). A inibição do NF-κB interfere na expressão de genes cujos produtos mediam as respostas imune e inflamatória.

Nesse sentido, pode-se supor que a menor migração de neutrófilos poderia estar relacionada à inibição do NF-κB e conseqüentemente da expressão do gene para o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) importante para o recrutamento e ativação de neutrófilos.

Os neutrófilos desempenham um papel importante na angiogenese liberando quimiocinas que causam a invasão de células endoteliais e formação de vasos sanguíneos (Albini et al., 2005). O reduzido número de neutrófilos nos

grupos tratados pode estar contribuindo para a menor neoformação vascular observada nos implantes de esponja. Alteração da função dessas células já foi relatada (Takemura et al., 1995).

Takemura et al. (1995) testaram a atividade antiinflamatória *ex vivo* da carajuflavona e da luteolina isoladas do extrato da *A. chica* em neutrófilos de coelho. A luteolina apresentou alta atividade de inibição da liberação de enzimas e produção de superóxido por neutrófilos estimulados por peptídeo *formyl-methionil-leucyl-phenylalanine* (FMLP). O FMLP ativa a NADP oxidase localizada na membrana plasmática levando a produção de ânion superóxido que é fonte de todas as outras espécies reativas de oxigênio geradas na explosão respiratória do neutrófilo (Filho, 2006).

A atividade de N-acetil-B-D-glicosaminidase (NAG), indicando o recrutamento de macrófagos, não foi afetada pelos tratamentos com os extratos etanólico-EE ou CA3 (Fig. 24B).

A NAG é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A dosagem do NAG é uma técnica utilizada como índice da infiltração dessas células nos sítios inflamatórios (Bailey, 1988).

O extrato aquoso da *A. chica* interfere na atividade de macrófagos *in vitro*. De acordo com Oliveira et al. (2008) há inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos elicitados por tioglicolato, estimulados por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) *in vitro*.

Os extratos etanólico-EE e CA3 da *A. chica* reduziram o recrutamento de neutrófilos. A realização de estudos a fim de investigar se os extratos teriam efeito também sobre sua atividade, bem como sobre a atividade de macrófagos, trariam maiores informações sobre o mecanismo de ação antiinflamatória apresentado pelos extratos.

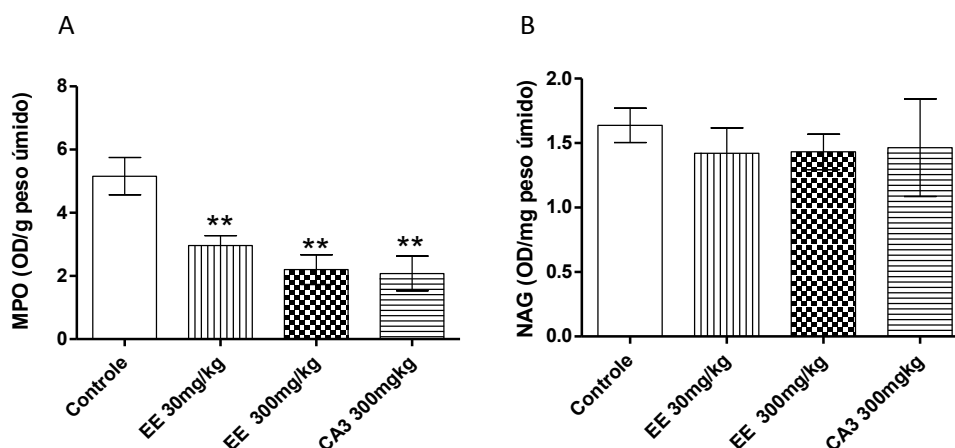


Figura 24. Atividades das enzimas MPO (A) e NAG (B) nos grupos controle (salina) e tratados com o extrato etanólico (EE) ou a fração aquosa CA3 (CA3) da *A. chica*. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,01$ .

### Avaliação da angiogênese nos implantes de esponja

A dosagem da concentração de hemoglobina (Hb) nos implantes foi utilizada como um índice indireto para estimar-se a neofomação vascular. Tendo em vista que o VEGF é considerado um marcador molecular da angiogênese, também foram avaliados os níveis dessa citocina nos implantes.

A administração diária do extrato EE da *A. chica* na concentração de 30mg/kg não afetou a concentração de Hb nos implantes de esponja. Entretanto na concentração de 300mg/kg tanto o extrato EE quanto o extrato CA3 reduziram significativamente a concentração de hemoglobina nos implantes ( $p < 0,01$ ), indicando diminuição do número de vasos neoformados (Fig. 25).

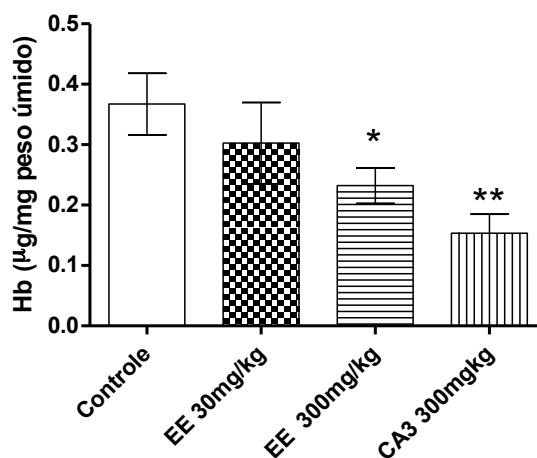


Figura 25. Concentração de Hb nos implantes nos grupos controle e tratados com extrato etanólico (EE) ou fração aquosa (CA3) da *A. chica*. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,05$ .

A dosagem de VEGF foi realizada semente nos grupos tratados com 300mg/kg de extrato (EE-300mg/kg e CA3-300mg/kg), que apresentaram atividades antiinflamatória e também antiangiogênica. Curiosamente, embora tenham efeito sobre a neoformação vascular, os níveis de VEGF não se alteraram nos grupos tratados em relação ao controle (Fig. 26).

Dentre os fatores angiogênicos, o VEGF é o mais importante mitógeno seletivo para células endoteliais *in vitro*. Ele induz

a angiogênese *in vivo* e aumenta grandemente a permeabilidade vascular (Schindler & Mentlein, 2006).

O extrato aquoso bruto da *A. chica* foi estudado como uma alternativa para o tratamento da queimadura ocular utilizando coelhos como modelo experimental. A formação vascular na córnea foi inibida, mas não suprimida pelo extrato. Esse resultado foi semelhante ao apresentado pela dexametasona, utilizada como controle (Garrido, 2006).

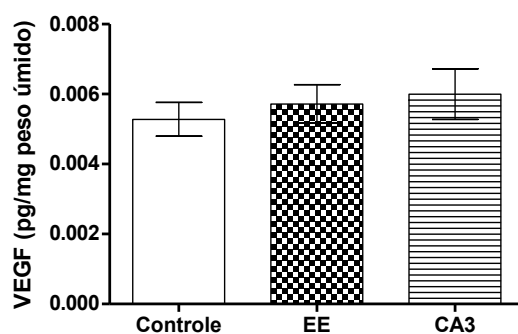


Figura 26. Concentração de VEGF nos grupos controle e tratados com extrato etanólico (EE) ou fração aquosa (CA3) da *A. chica*. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,05$ .

Flavonóides como epigallocatequina galate, o principal flavonóide do chá verde, e genisteína inibem a angiogênese e a expressão e liberação de VEGF (albin et al., 2005; Schindler & Mentlein, 2006). Além disso, considerando que o campferol reduz significativamente a expressão do gene para VEGF em linhagens de câncer de ovário (OVCAR-3 e A2780/CP70) (Luo et al., 2009) era esperado que os flavonóides presentes nos extratos da *A. chica* também regulassem a expressão/liberação do VEGF. Entretanto, os mecanismos envolvidos no menor desenvolvimento de capilares sanguíneos nos implantes de esponja não estão relacionados à alterações na concentração do VEGF.

Outros mecanismos podem estar envolvidos. Os flavonóides interferem nos eventos iniciais da angiogênese, incluindo a proliferação celular, produção de enzimas proteolíticas necessárias para destruição da membrana basal vascular e migração celular (Fotsis et al., 1997). Já foi demonstrado que a luteolina, um dos flavonóides sabidamente presente nas folhas da *A. chica*, inibe a proliferação de células endoteliais (linhagem BBCE) estimuladas pelo fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) *in vitro* (Fotsis et al., 1997).



### Avaliação da concentração de citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e Th2 (IL-4, IL-5) séricas

As concentrações das citocinas interleucina-5 (IL-5), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foram determinadas no soro de

camundongos tratados com os extratos etanólico-EE e aquoso CA3 (300mg/kg). Os tratamentos não alteraram os valores das citocinas estudadas (Figura 27).

As citocinas IL-2 e IL-4 não foram detectadas no soro.

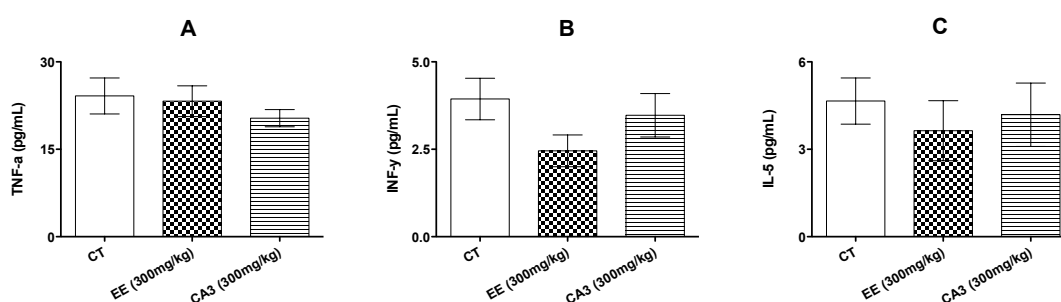


Figura 27. Efeito dos extratos aquoso CA3 (300mg/kg) e etanólico EE (300mg/kg) da *A. chica* sobre a concentração de citocinas Th1/Th2 no soro de camundongos com implantes de esponja: TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B) and IL-5 (C). Não houve diferença entre os grupos estudados ( $p < 0.05$ ). Valores indicam média e desvio padrão de 8 animais por grupo.

O TNF- $\alpha$  é produzido por vários tipos celulares incluindo macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células endoteliais (Barcelos et al., 2005). Levando em consideração que ocorra uma correlação entre a concentração de TNF- $\alpha$  circulante e presente nos implantes, postula-se que os macrófagos e as células endoteliais sejam os principais responsáveis pela produção dessa citocina nos implantes de esponja, já que o número de neutrófilos encontra-se reduzido nos grupos tratados.

O TNF- $\alpha$  controla a angiogênese através da regulação da síntese de mediadores secundários tais como fator ativador plaquetário, IL-8, VEGF e bFGF (Barcelos et al., 2005). Por outro lado, o TNF- $\alpha$  induz a migração de células endoteliais *in vitro* e angiogênese *in vivo*. O efeito resultante parece ser dependente da concentração local ou do tempo de exposição à citocina Barcelos et al., 2005). Nesse estudo, nem as concentrações circulantes (Fig. 27A) ou local (Fig. 28) diferiu entre grupos tratados e controle.

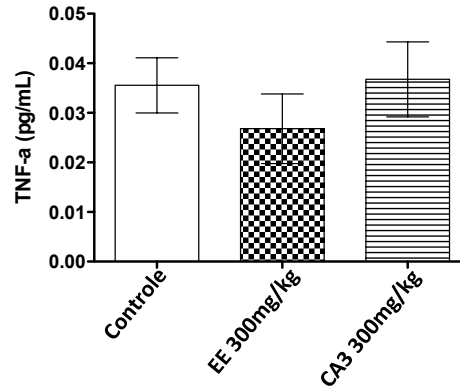


Figura 28. Efeito dos extratos aquoso CA3 (300mg/kg) e etanólico EE (300mg/kg) da *A. chica* sobre a concentração de TNF- $\alpha$  nos implantes de esponja: Não houve diferença entre os grupos estudados ( $p < 0.05$ ). Valores indicam média e desvio padrão de 8 animais por grupo.

### Avaliação do perfil protéico sérico total e fracionado

A resposta de fase aguda é uma reação sistêmica proeminente à distúrbios na homeostasia local ou sistêmica causados por infecção, cirurgia, trauma, neoplasia ou lesão tissular. Essa resposta sistêmica é iniciada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias no local de lesão e acompanhada pela elevação de várias proteínas plasmáticas, denominadas proteínas de fase aguda (PFA) (Gruys et al., 2005).

A concentração das PFA circulantes está relacionada à gravidade da doença subjacente. Assim, a quantificação das PFA proporciona um meio fácil de avaliar a presença e extensão do processo patológico causador da resposta (Eckersall, 2000).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle para nenhuma das frações de

globulinas (Fig. 29). Entretanto, o grupo tratado com a fração aquosa CA3 apresentou valor de gama-globulinas mais elevado comparado aos dois tratamentos com o extrato etanólico-EE. O valor mensurado das PFA é resultante da produção e catabolismo. Algumas proteínas de fase aguda podem ser mensuradas após 5 a 8 horas do estímulo inicial, mas seus valores declinam após 48 horas (Gruys et al., 2005). Nesse experimento, o proteinograma foi realizado 10 dias após o implante da esponja e tratamento dos animais. Esse resultado também confirma a ausência de contaminação por microrganismos nos implantes de esponja. Durante o estímulo contínuo, como na infecção por microrganismos, a concentração das PFA permanecem elevadas em comparação aos valores normais (Gruys et al., 2005).

Também não houve diferença para proteínas totais, albumina ou relação A/G (Fig. 30).

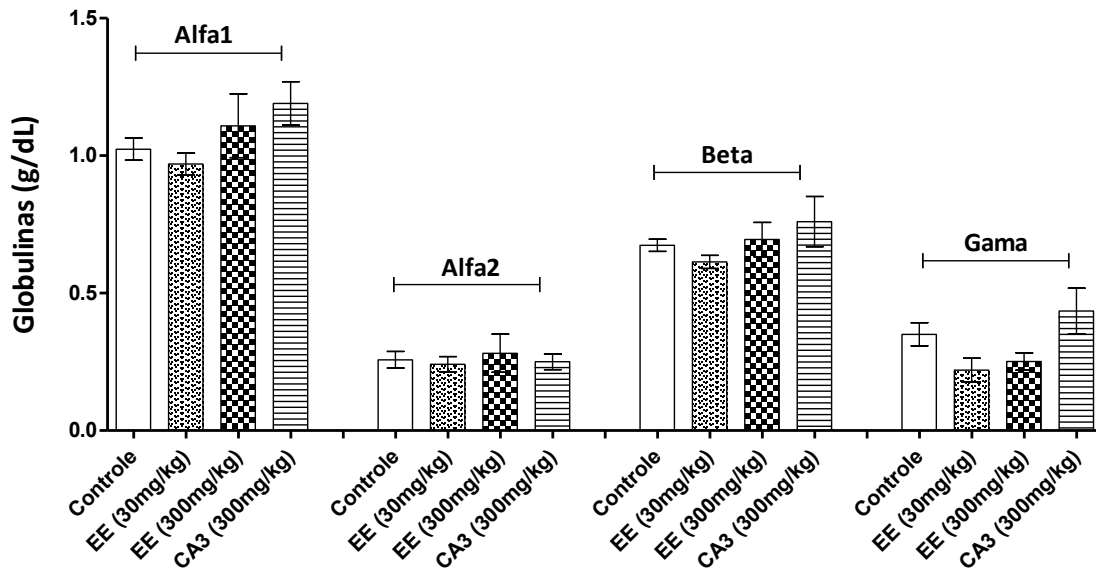


Figura 29. Valores de globulinas plasmáticas de camundongos com implante de esponja tratados com diferentes extratos de *A. chica*.

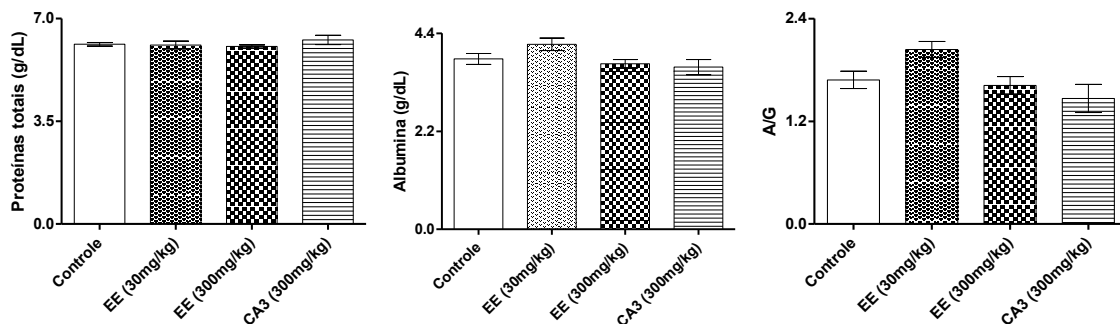
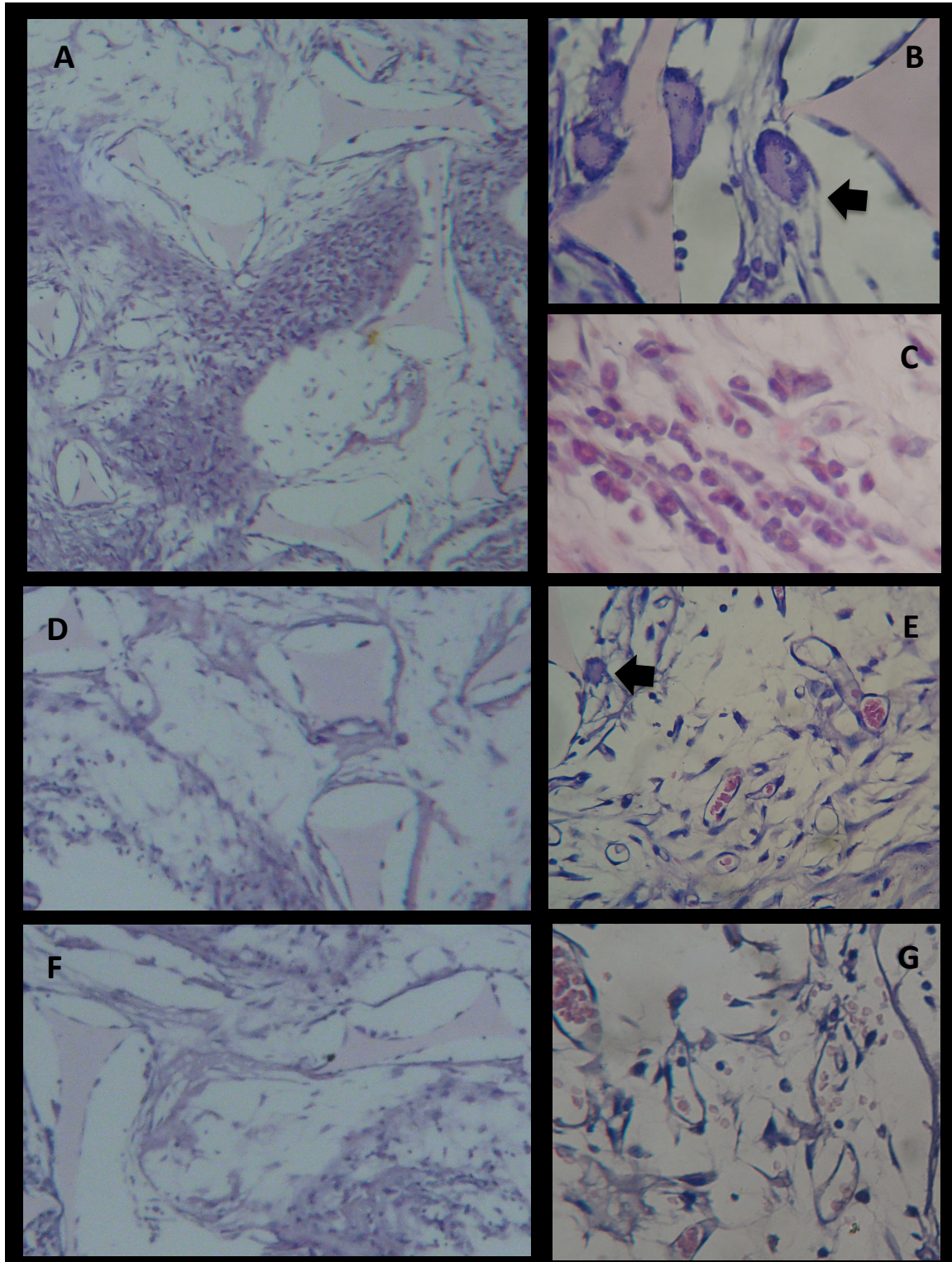


Figura 30. Valores de proteína total e albumina séricas e relação albumina:globulina de camundongos com implantes de esponja tratados com diferentes extratos de *A. chica*.

### Avaliação histológica dos implantes de esponja

Os implantes dos animais do grupo controle apresentavam moderada formação de tecido de granulação caracterizado pela proliferação de fibroblastos, intensa formação neovascular e presença de infiltrado inflamatório rico em neutrófilos e macrófagos (Fig. 31).

Os animais tratados com o extrato etanólico-EE e a fração aquosa CA3 da *A. chica* apresentaram tecido fibrovascular com menor quantidade de vasos neoformados comparado ao controle. Além disso, o infiltrado inflamatório era discreto e composto preferencialmente por macrófagos. Pequena quantidade de neutrófilos foi observada. O quadro histológico confirma os achados anteriores, destacando-se a menor presença de neutrófilos infiltrados no tecido.



**Figura 31.** Fotomicrografias de esponjas implantadas em camundongos Swiss (HE). A) Esponja de animal do grupo controle. Grande quantidade de tecido de granulação e abundante infiltrado inflamatório neutrofilico-histiocitário, 10x. B) Esponja de animal do grupo controle. Presença de células gigantes (seta) no infiltrado inflamatório, 40x. C) Esponja de animal do grupo controle. Neutrófilos infiltrados no implante, 40x. D) Esponja de animal tratado com extrato etanólico-EE apresentando tecido de granulação com moderado infiltrado inflamatório, 10x. E) Maior aumento do implante de esponja da foto D. Tecido fibrovascular contendo vasos neoformados, fibroblastos e discreta presença de infiltrado inflamatório histiocítico linfocitário, 40x. F) Animal tratado pela fração aquosa CA3. Tecido de granulação com moderada infiltração de células inflamatórias, 10x. G) Maior aumento do implante de esponja da foto F. Presença de fibroblastos, vasos neoformados com discreto infiltrado inflamatório histiocítico linfocitário, 40x.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo confirmam a atividade antiinflamatória já descrita para os extratos da *A. chica* e apresentam novos dados indicando atividade antiangiogênica.

Quando administrados por via oral, por gavagem, na concentração de 300mg/kg PV e após 10 dias de tratamento os extratos inibem a migração de neutrófilos para os implantes de esponja sem

interferir na migração de macrófagos. Os resultados também indicam a presença de substâncias antiangiogênicas nos extratos etanólico-EE e CA3. Os extratos não interferem na concentração de VEGF no local da injúria.

Futuros experimentos devem ser conduzidos a fim de elucidar os mecanismos de ação ligados aos efeitos antiinflamatórios e antiangiogênicos dos extratos da *A. chica*.

## Capítulo 4

### Efeito de extratos da *Arrabidaea chica* sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich e modulação do sistema imune

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de extratos aquosos e etanólico-EE da *Arrabidaea chica* sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich em camundongos Swiss e sobre a resposta do sistema imune ao tumor. Os extratos etanólico-EE e a fração aquosa CA3 na dose de 30mg/kg reduziram o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich após 10 dias de tratamento por via oral. O grupo tratado com o extrato etanólico-EE apresentou aumento dos neutrófilos e das  $\alpha 1$  e  $\beta$  globulinas, com diminuição das  $\alpha 2$  globulinas. Além disso, o extrato etanólico-EE reduziu o percentual de linfócitos TCD4<sup>+</sup> no sangue mas não alterou o infiltrado inflamatório associado ao tumor, sugerindo que o efeito antitumoral apresentado está associado à ação direta do extrato sobre as células tumorais. O extrato CA3 reduziu o desenvolvimento tumoral sem alterar o perfil de proteínas plasmáticas. Entretanto, reduziu a porcentagem de LTCD4<sup>+</sup> no sangue e, no microambiente tumoral, esse tratamento diminuiu a infiltração de LTCD3<sup>+</sup>, especialmente devido à redução de LTCD8<sup>+</sup> e células NK. Suspeita-se que a ação antitumoral apresentada pela fração aquosa CA3 está relacionada à sua atividade antiinflamatória. Nenhum extrato testado produziu efeitos tóxicos nos animais. Conclui-se que o extrato etanólico-EE e a fração aquosa CA3 da *Arrabidaea chica* apresentam efeito antitumoral e imunomodulador que pode ser atribuído à presença de flavonóides, como o campferol identificado pela cromatografia líquida de alta eficiência. Esses efeitos parecem estar relacionados à mecanismos de ação distintos para cada extrato. Esse estudo demonstra o potencial da *A. chica* como agente antitumoral e reforça seu potencial imunomodulador, confirmando o efeito farmacológico atribuído ao seu uso pela medicina tradicional.

Palavras chave: *Arrabidaea chica*, Bignoniaceae, flavonóides, tumor de Ehrlich, atividade antitumoral.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of aqueous and ethanol-EE extracts of *Arrabidaea chica* on the development of solid Ehrlich tumor in mice and the effects in the immune system. The ethanol extract-EE and aqueous fraction CA3 at 30 mg/kg reduced the development of Ehrlich solid tumor after 10 days of oral treatment. The group treated with the ethanol extract-EE showed increased levels of neutrophils and of  $\alpha 1$  and  $\beta$  globulins, with a decrease of  $\alpha 2$  globulins. Furthermore, ethanol extract-EE reduced the percentage of TCD4<sup>+</sup> cells in blood but did not alter the percentage of inflammatory mononuclear cells associated with tumor. This results suggest that the antitumor effect presented by the ethanol extract-EE is associated with a direct action on tumor cells. Also the anti-inflammatory and pro-apoptotic activities already demonstrated. The aqueous fraction-CA3 reduced tumor development without altering plasmatic proteins. However, the treatment with CA3 reduced the percentage of TCD4<sup>+</sup> lymphocytes in blood. At the tumor microenvironment, this treatment decreased the percentage of TCD3<sup>+</sup> cells, especially due to a reduction of TCD8<sup>+</sup> and NK cells. It seems that the antitumor activity presented by the aqueous fraction-CA3 is related to its anti-inflammatory and antiangiogenic activities. None of the extracts tested produced toxic effects in animals. In conclusion, the ethanol extract-EE and aqueous fraction-CA3 of *Arrabidaea chica* have immunomodulatory and antitumor activities attributed to the presence of flavonoids, such as kaempferol identified by High Performance Liquid Chromatography. These effects appear to be related to different mechanisms of action for each extract. This study demonstrates the potential of *A. chica* as an antitumor agent confirming its use by traditional medicine.

Keywords: *Arrabidaea chica*, Bignoniaceae, flavonoids, Ehrlich tumor, antitumor activity.

## INTRODUÇÃO

A *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot, Bignoniaceae, é uma planta arbustiva que ocorre na América tropical, particularmente na Bacia Amazônica, e conhecida popularmente como "Pariri", "Crajiru", "Carajuru" ou "Carajiru" (Correa, 1931; van den Berg, 1993). Suas folhas têm sido tradicionalmente usadas pelos índios brasileiros como corante nas pinturas corporais para rituais, como agente protetor da pele contra os raios solares e como repelente de insetos.

Desde o início do século passado a investigação da *A. chica* teve como objetivo a determinação da composição química do corante (Chapman et al., 1927). Foi realizado o isolamento de uma flavona (Takemura, 1995) e de três antocianidinas (Zorn et al., 2001). O teor de flavonóides totais nas tinturas (30%, 50% e 70% de etanol) e nos extratos aquosos (infusão e decocção) foram determinadas (Pinto, 2004 citado por Barbosa et al., 2008). O teor de compostos fenólicos e flavonóides nas folhas também foram determinados,  $\pm$  10,2 mg/g, e 0,06 mg/g, respectivamente (Silva et al., 2007).

Recentemente, Barbosa et al. (2008) realizaram uma abordagem fitoquímica sobre *A. chica*, detectando diferentes classes metabólicas no extrato etanólico. Foram evidenciados antocianidinas, antocianinas, antraquinona, catequinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, esteróides, xantonas, taninos, flavanonois e flavanona.

Atualmente, a *A. chica* é amplamente utilizada na medicina popular para a cicatrização de feridas, tratamento de inflamações, cólicas intestinais, diarreias sanguinolentas, anemia, hemorragias e leucemia (Zorn et al, 2001; Jorge et al, 2008). O efeito antiinflamatório do seu extrato já foi demonstrado *in vitro*, com a inibição do fator de transcrição NF-kB

(Zorn et al., 2001) e *in vivo* (Oliveira et al., 2008). Além disso, atividades cicatrizante e antioxidante foram relatadas, possivelmente relacionadas à presença de antocianidinas (Jorge et al., 2008). No entanto, a atividade antitumoral da planta continua a ser um foco de investigação.

Ao longo dos últimos anos, o câncer tem permanecido uma das principais causas de morte e o número de indivíduos que vivem com câncer continua a se expandir. Assim, a maior parte das pesquisas atuais é dedicada ao desenvolvimento de novas substâncias antitumorais (Xia et al., 2004).

Tendo em vista o reino vegetal como fonte potencial de constituintes químicos com atividade citotóxica e antitumoral (Kim et al, 2005; Indap et al, 2006) e considerando a diversidade de compostos bioativos sintetizados pelas plantas, estudou-se o potencial antitumoral *in vivo* dos extratos etanólico e aquosos de *A. chica* utilizando como modelo o tumor de Ehrlich sólido. Levando em consideração a importância da inter-relação entre inflamação e desenvolvimento tumoral, outro objetivo desse estudo foi caracterizar e avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre as subpopulações de linfócitos no sangue e associadas ao tumor sólido de Ehrlich em camundongos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Planta e extratos

A fim de mimetizar o uso popular da *Arrabidaea chica* para tratamento do câncer na forma de chá obtido de suas folhas secas, foi utilizado nesse experimento o extrato aquoso bruto (EAB). Com o intuito de identificar os grupos químicos associados à ação terapêutica antitumoral da *A. chica*, testou-se as frações aquosas CA3 constituída por alcalóides e bases



orgânicas e a fração CO3 constituída por saponinas. Além disso, foi testado o extrato etanólico-EE rico em flavonóides caempferol e luteolina e antocianinas.

### **Procedimento Experimental**

Esse projeto seguiu as normas estipuladas pelos protocolos de experimentação animal do Comitê de Ética para Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Foram utilizados 25 camundongos fêmeas da linhagem Swiss, não isogênicas, com 60 dias de idade e peso entre 25 e 30g, obtidos do biotério do ICB da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Geral do ICB em caixas de poliestireno (cinco animais cada) com temperatura controlada e fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), recebendo água e ração comercial *ad libitum*.

Os animais foram divididos em cinco grupos (n=5): tratados com os extratos aquosos: bruto (EAB), e suas frações CA3 e CO3; extrato etanólico-EE e um grupo controle, tratado com água destilada.

Após uma semana de adaptação os animais foram inoculados via subcutânea com 0,05ml de uma suspensão celular contendo  $2,5 \times 10^6$  células tumorais viáveis, entre os coxins plantares do membro posterior esquerdo para a obtenção do tumor de Ehrlich na forma sólida (Guerra, 1983). As células carcinogênicas foram obtidas do Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Foi administrado diariamente por gavagem 300µL de cada extrato da *A. chica* na concentração de 30mg/kg PV. O tratamento foi iniciado no terceiro dia após a inoculação do tumor de Ehrlich e

teve duração de 10 dias. A dose de 30mg/kg PV foi baseada no trabalho de Queiroz et al. (2008) que estudaram os efeitos da *Tabebuia avellanadae*, pertencente à mesma família da *A. chica*, sobre a resposta hematopoiética de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

### **Avaliação do tumor**

A curva de crescimento tumoral foi avaliada pela mensuração em triplicata da espessura da pata inoculada com as células tumorais. Para tanto, foi utilizado um micrômetro de uma polegada, com sensibilidade de centésimos de milímetros. O procedimento foi repetido a cada 48 horas até o final do experimento.

As patas inoculadas (sem o coxim, utilizado para fenotipagem) foram fixadas em formol 10% neutro e tamponado. Posteriormente foram desmineralizadas em solução de ácido fórmico a 10% tamponado com citrato de sódio para pH 4.5 sob vácuo moderado. Secções de 4µm foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) (Luna, 1968) para análise histológica do tumor. Linfonodos poplíteos e vísceras foram analisadas para verificação de metástases.

### **Fenotipagem das células inflamatórias do tumor no contexto *ex vivo***

Um fragmento do coxim plantar inoculado foi coletado e acondicionado em frasco estéril contendo 5mL de meio RPMI para identificação das células mononucleares associadas ao tumor por citometria de fluxo em aparelho Becton Dickinson FACScan. Procedimento seguido:

1. O coxim plantar com o tumor foi retirado e acondicionado em tubo falcon contendo 5mL de meio RPMI.
2. o tecido foi transferido para um microtubo (ependorf) e macerado com 0,05mL de meio RPMI.

3. o material ficou decantando por 15 minutos em gelo. Posteriormente, coletou-se o sobrenadante que foi centrifugado a 1200 rpm por 7 minutos.
4. retirou-se o sobrenadante até ficar somente 150µL no ependorf.
5. ressuspendeu-se o pelet nos 150 µL que restaram.
6. coletou-se 30µL da suspensão que foi incubada com 5µL dos anticorpos de interesse (anti-CD3 PERCP, anti-CD5 PERCP, anti-CD4 FITC, anti-CD8 PECY5, anti-CD19 FITC e anti-NK1.1 FITC).
7. Após homogeneização no vórtex o material foi incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.
8. adicionou-se 1mL da solução de lise (billing) seguida de imediata homogeneização no vórtex.
9. incubou-se novamente por 3 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.
10. Foi adicionado 1mL de PBS-W, homogeneizado e centrifugado a 1300 rpm por 7 minutos em 18°C.
11. o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 2mL de PBD-W seguido de homogeneização no vórtex.
12. centrifugou-se a 1300 rpm por 7 minutos a 18°C.
13. verteu-se o material e posteriormente ressuspendeu-se a suspensão celular em 150uL de solução fixadora MFF
16. Foi realizada a leitura no citômetro de fluxo.

Os dados foram analisados utilizando-se o programa FlowJo, Flow Cytometry Analysis, versão 7.6.1 (Tree Star Inc.). As médias foram comparadas pelo teste T de Student ( $P < 0,05$ ).

### **Avaliações hematológicas e bioquímicas plasmáticas**

Os camundongos foram anestesiados com 50mg/kg de cloridrato de quetamina associada a 50mg/kg de xilazina por via intramuscular (Harkness et al., 1993). O sangue foi colhido via retro-orbital com auxílio de tubos de micro-hematócrito

(Anderson, 1998) em microtubos de 1,5mL contendo 5µl de EDTA 10%.

O número global de eritrócitos e leucócitos e o valor da hemoglobina foi determinado em hemocitômetro (CELM DA 500®, CELM- Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP, Brasil). O hematócrito foi determinado em centrífuga para microhematócrito (Microspin, São Paulo, Brasil). Foram calculados os seguintes índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Esfregaços sanguíneos foram corados pelo método de Maygrünwald-Giemsa para contagem diferencial de leucócitos (Thrall, 2004).

O valor da proteína total plasmática foi determinado em refratômetro manual (Ningbo Utech International CO LTDA, modelo 301). O perfil protéico fracionado foi obtido utilizando fitas de celulose e tampão veronal (Naoum, 1990) expostas a 100V por 32 minutos. As fitas foram escaneadas e a leitura das bandas realizada em software Celm SE-250.

Os valores relativos (%) e absolutos (g/dL) das frações proteicas foram determinadas a partir da concentração das proteínas totais obtidas pelo refratômetro (Ningbo Utech International CO LTDA, modelo 301). A relação albumina/globulina foi calculada como albumina/(a1+a2+b+y globulinas).

### **Fenotipagem das células inflamatórias do sangue no contexto *ex vivo***

Foi avaliada a concentração de monócitos, linfócitos TCD4, TCD8 e linfócitos B e células natural Killer (NK). Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais para a marcação fenotípica de superfície citoplasmática: anti-CD3 PERCP, anti-CD5 PERCP, anti-CD4 FITC, anti-CD8 PECY5, anti-CD19 FITC e anti-NK1.1 FITC.

### **Avaliação de possíveis efeitos colaterais**

Afim de verificar possíveis efeitos colaterais devido ao tratamento, os animais foram pesados no início e no final do período experimental e a diferença percentual no ganho de peso foi avaliada (Adedapo et al., 2008). Também foi observado o comportamento, pelagem, apetite e presença de diarreia até o dia do sacrifício.

Baço e fígado foram coletados e pesados em balança analítica para determinação do peso relativo do órgão (peso do órgão/peso do animal). Imediatamente após a pesagem, foram fixados em formol a 10% neutro e tamponado e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. O mesmo processamento foi feito para rim, coração e pulmão. Secções de cada tecido foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica.

Foi também realizada a dosagem de uréia no plasma dos animais.

### **Análise estatística**

Todas as medidas paramétricas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%.

Os testes utilizados para comparação de médias foram SNK quando  $cv < 25\%$  ou Duncan para  $cv > 25\%$  (Sampaio, 1998). Hemácias, hemoglobina, VG, CHCM, Proteínas totais, uréia, albumina apresentaram  $cv < 25$ . Neutrófilos e monócitos, alfa 1, alfa 2, beta e gama globulinas apresentaram o  $cv > 25$ , portanto analisados pelo teste de Duncan. HCM, VCM e leucócitos totais

apresentaram dados quase normais foram analisados pelo teste SNK. A curva de crescimento tumoral foi analisada pelos testes não paramétricos de Kruskal Wallis e Friedman.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Avaliação do tumor**

O desenvolvimento do tumor de Ehrlich foi confirmado pela histologia da pata inoculada.

A mensuração da pata implantada com as células tumorais foi considerado o melhor parâmetro para a avaliação do crescimento tumoral (Silva et al., 2004). Houve crescimento contínuo do tumor durante todo o período do experimento em todos os grupos, avaliado pela medida da espessura da pata.

A curva de crescimento do tumor de Ehrlich apresenta um comportamento exponencial a partir do terceiro dia após a inoculação até o 28º dia (Dagli et al., 1992b). O grupo controle apresentou diferenças significativas no crescimento do tumor entre o terceiro e quinto dias comparado ao 12º dia (Fig. 32).

A taxa de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos difere de acordo com o local da implantação. Na forma ascítica o pico de proliferação ocorre precocemente sete dias após a inoculação das células. No entanto, na forma sólida, o pico de proliferação ocorre tardiamente, após o sétimo dia de implantação (Silva et al., 2006). Neste experimento, como pode ser observado na figura 30, houve um aumento na taxa de crescimento a partir do sétimo dia.

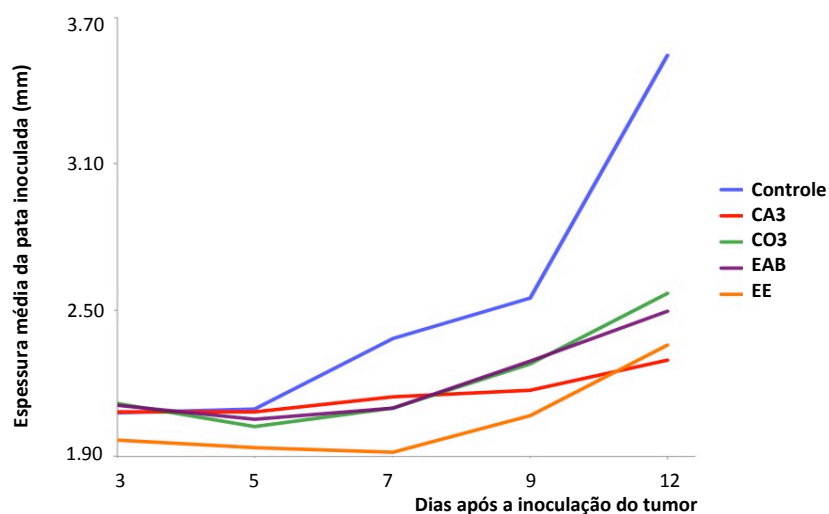


Figura 32. Curva de crescimento (mm) do tumor sólido de Ehrlich em camundongos Swiss tratados com extratos da *A. chica* (extratos aquosos CA3, CO3 ou EAB ou extrato etanólico - EE) ou água (grupo Controle) durante 12 dias.

Curiosamente, o comportamento do tumor nos grupos tratados com CA3 e EE avaliado pela curva de crescimento foi diferente daquela apresentada pelo controle. Ambos os grupos apresentaram crescimento constante, não havendo picos conforme demonstrado pela semelhança entre as mensurações das patas nos dias avaliados (Tab.7).

Houve uma significativa redução no crescimento do tumor nos animais

tratados com extrato etanólico-EE e fração aquosa CA3 no 12º dia pós implantação comparado ao grupo controle. Os extratos EAB ou CO3 não apresentaram efeito inibitório no desenvolvimento tumoral. Nesses dois grupos o crescimento do tumor foi semelhante ao observado para o grupo controle, houve pico de crescimento do tumor no 7º dia pós inoculação e crescimento acelerado até o 12º dia.

Tabela 7. Mensuração da espessura da pata após inoculação do tumor de Ehrlich em camundongos tratados com diferentes extratos da *A. chica* por 10 dias

Grupo	Dia pós inoculação do tumor				
	3	5	7	9	12
Controle	2.078±0.08 aA	2.092±0.06 aA	2.307±0.18 aAB	2.451±0.46 aAB	3.237±0.75 aB
CA3	2.084±0.11 aA	2.081±0.06 aA	2.145±0.20 aA	2.173±0.20 aA	2.294±0.32 bA*
CO3	2.117±0.06 aAB	2.023±0.09 aA	2.098±0.18 aAB	2.281±0.28 aAB	2.568±0.40 aB
EAB	2.108±0.10 aA	2.053±0.08 aA	2.512±0.13 aAB	2.290±0.33 aAB	2.495±0.51 aB
EE	1.968±0.14 aA	1.935±0.13 aA	1.918±0.11 bA	2.067±0.22 aA	2.357±0.47 bA*

Valores apresentados como média ± desvio padrão. Valores com letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas para linhas e minúsculas para colunas.

Os resultados indicam que os extratos etanólico-EE e CA3 da *A. chica* apresentam ação antitumoral. O extrato etanólico da *A. chica* contém diferentes

classes de substâncias como fenólicos, taninos, flavonóis, antocianinas, ácidos orgânicos e açúcares (Barbosa et al., 2008). Postula-se que a atividade

antitumoral esteja relacionada a presença de compostos fenólicos. O conteúdo de fenólicos e flavonóides nas folhas da *A. chica* é de 10 mg/g e 4mg/g respectivamente (Silva et al.; 2007).

A ação medicinal dos compostos fenólicos esta principalmente ligada à sua capacidade antioxidante, ligação aos radicais livres, quelação de íons metálicos redox ativos, modulação da expressão gênica e interação com as vias de sinalização celular (Soobrattee et al., 2005). Já foi demonstrado em testes *in vitro* que alguns flavonóides, incluindo o campferol, inibem a liberação de VEGF por células tumorais mamárias. O VEGF é um peptídeo angiogênico e estimula a neoformação vascular requerida para a progressão e desenvolvimento tumoral. Ele não é estocado nas células, sua síntese está correlacionada à sua liberação (Schindler & Mentlein, 2006). O campferol juntamente com outros flavonóides já identificados no extrato etanólico da *A. chica* (4'-hidroxi-3,7-dimetoxi flavona e vicenin-2) (Barbosa et al.; 2008) poderiam influenciar na síntese de VEGF pelas células tumorais de Ehrlich contribuindo para a atividade antitumoral do extrato etanólico-EE.

A terapia antiangiogênica ou prevenção de vascularização (angioprevenção) demonstram efeito sobre a expectativa de vida de pacientes com câncer (Albini et al., 2005). A descoberta de novos agentes sintéticos ou naturais com propriedades antiinflamatória que levam à atenuação e ou inibição da neoformação vascular e influxo de células inflamatórias para o local da lesão representam uma forma de controle dos processos patológicos (Albini et al., 2005).

Anteriormente, foi demonstrado que o extrato etanólico-EE apresenta potente atividade citotóxica *in vitro* (Ribeiro et al., 2010) sugerindo um potencial pró-apoptótico para células Jurkat e HL60. Um efeito direto do extrato etanólico-EE sobre as células tumorais *in vivo* não pode

ser descartado, entretanto, vale ressaltar que após a administração oral ocorre metabolização do extrato. O tratamento intraperitoneal deveria ser considerado, pois além de evitar a metabolização hepática, supostamente a biodisponibilidade das substância ativas do extrato será mais alta. Contudo, em nossos estudos optamos pela administração oral, já que esta via é a primeira a ser considerada na busca de novos fármacos.

A redução do tumor observada no grupo tratado com a fração aquosa CA3 pode ter ocorrido por mecanismos indiretos ligados à inibição do crescimento tumoral. Tanto CA3 quanto EE apresentaram atividade antiangiogênica no modelo de implante de esponja murinho e demonstraram possuir atividade antiinflamatória, interferindo na migração de neutrófilos. A redução da neovascularização é uma importante forma de combate ao câncer e é o modo de ação de vários quimioterápicos (Schindler & Mentlein, 2006). Seriam esses os mecanismos envolvidos na redução do tumor *in vivo*? Mais estudos são necessários para determinar o modo exato de ação do extratos.

A redução no tamanho do tumor no grupo tratado com o extrato etanólico-EE foi acompanhada por um aumento significativo do número de neutrófilos no sangue. Infiltrado inflamatório neutrofílico no tecido tumoral também foi característico desse grupo. O tratamento com o extrato CA3, que também reduziu o crescimento do tumor, não alterou o número de neutrófilos no sangue ou diferiu do grupo controle em relação à morfologia tumoral.

Nas fases iniciais de desenvolvimento dos tumores sólidos ocorre infiltração significativa de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T. É pouco conhecido o papel dos neutrófilos na progressão tumoral (Jaganjac et al., 2010). Eles são responsáveis pela sinalização dos

macrófagos que apresentam atividade antitumoral pela produção de citocinas como a IL-12. Por sua vez, a IL-12 estimula a proliferação e atividade de linfócitos T e células NK (Reis et al., 2009).

Reis et al. (2009) estudaram o efeito de L-arginina e L-NAME sobre o influxo de leucócitos durante o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich. Os autores observaram que a L-arginina aumenta a infiltração de neutrófilos e L-NAME reduz essa migração para o tumor. Observaram ainda que a redução do número de neutrófilos estava associada à maior área de parênquima tumoral, sugerindo que os neutrófilos possuem ação direta no desenvolvimento tumoral.

A ativação dos neutrófilos é acompanhada por intensa produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de enzimas hidrolíticas. Neutrófilos ativados causam lise inespecífica de células tumorais mediado pelas ROS (Jaganjac et al., 2010).

### **Morfologia tumoral**

A morfologia tumoral foi semelhante em todos os grupos. As células tumorais formavam cordões sólidos invadindo e substituindo os tecidos muscular e ósseo. As células apresentaram moderado pleomorfismo. Por vezes observou-se grupos de células grandes e ovais, com citoplasma abundante, vacuolizado e com bordas indistintas, levemente basofílico. O núcleo era oval, basofílico com dois ou mais nucléolos evidentes. Outras vezes as células neoplásicas apresentavam-se pequenas e ovaladas, com citoplasma basofílico e núcleo oval com cromatina

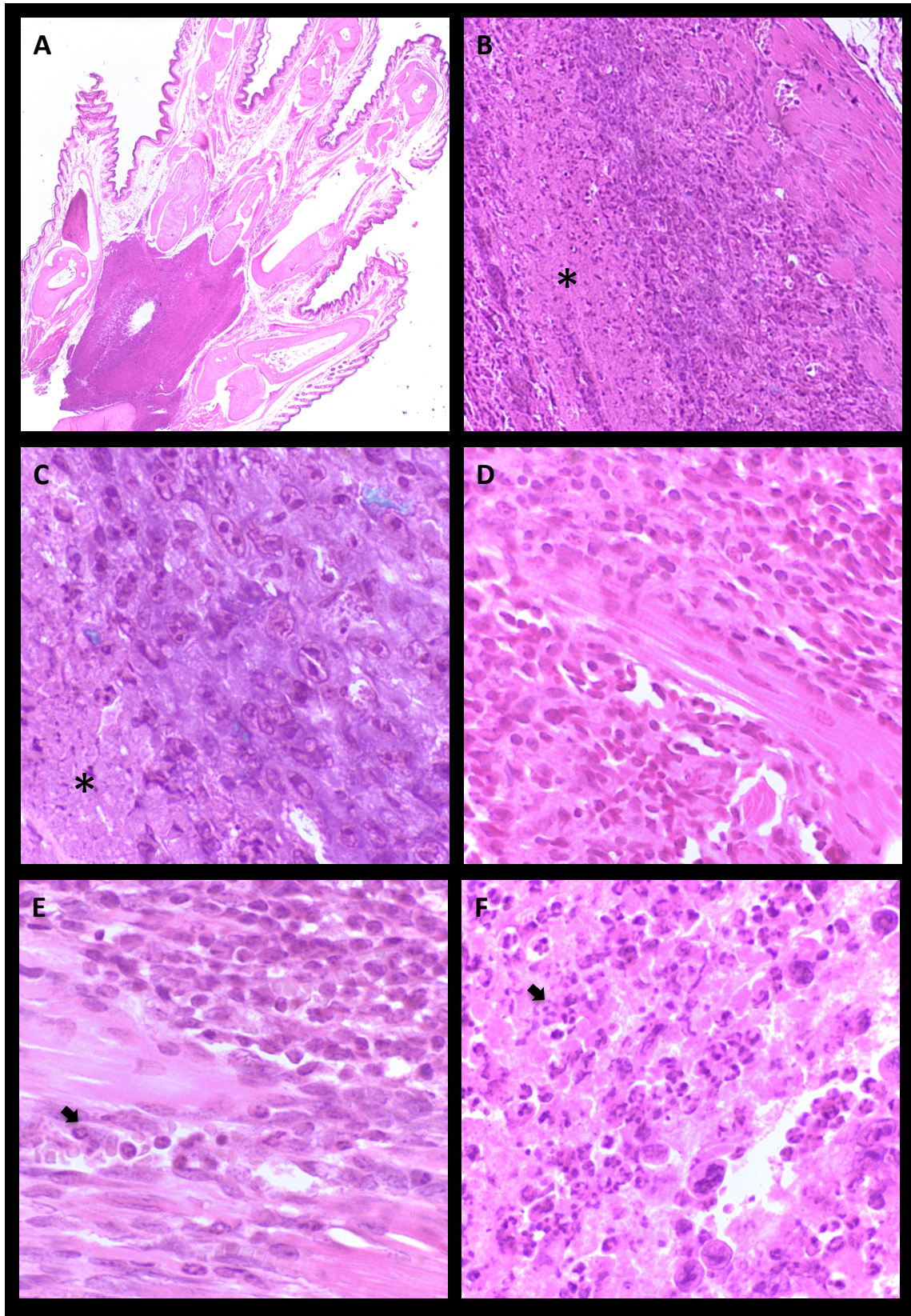
condensada. Figuras de mitose moderadas, algumas atípicas. O infiltrado inflamatório era predominantemente linfo-histiocitário moderado a leve com poucos neutrófilos. Exceção para o grupo tratado com o extrato etanólico-EE que apresentou infiltrado neutrofilico, linfo-histiocitário moderado. Em todos os grupos havia extensas áreas de necrose com discretas áreas de hemorragia (Fig 33).

Não foi observado metástases em nenhum órgão analisado (coração, pulmão, fígado, baço, rim) ou para o linfonodo poplíteo. Os linfonodos apresentavam-se aumentados de volume, com hiperplasia dos folículos linfóides e centros germinativos ativos.

A ocorrência de metástases não é comum no tumor de Ehrlich. Exceção é feita para o linfonodo regional, especialmente após o sétimo dia de inoculação do tumor (Dagli et al, 1992b). Entretanto mesmo nesse local, poucos focos de metástases foram observados por Dagli et al. (1992b), sendo a causa desconhecida.

Nesse experimento, não houve metástase para linfonodo regional em nenhum grupo, incluindo o controle. Talvez após as passagens intraperitoneais para manutenção do tumor nos animais tenha sido gerado um clone celular menos agressivo. De acordo com Dagli et al. (1992a), uma vez iniciada, a progressão neoplásica é geralmente acompanhada de aumento da instabilidade genética. Isso pode gerar a diversidade fenotípica manifestada por diferentes clones de células tumorais.





**Figura 33. Fotomicrografias (HE) de tumores de Ehrlich em coxim plantar de camundongos. A) Perda de tecidos muscular e ósseo em animal do grupo EE pela infiltração das células tumorais, 5x. B) Extensa área de necrose (\*) próxima ao parênquima tumoral viável em animal do grupo controle, 10x. C) Células tumorais grandes com núcleo oval contendo múltiplos nucléolos evidentes e citoplasma vacuolizado com bordas indistintas. Área de necrose (\*). Animal do grupo CA3, 40x. D) Células tumorais pequenas, alongadas, com núcleo condensado e citoplasma com bordas indistintas. Animal do grupo EE, 40x. E) Infiltrado inflamatório com poucos neutrófilos (seta) em animal do grupo controle, 40x. F) Grande quantidade de neutrófilos (seta), na maioria degenerados, infiltrados no tecido tumoral de animal do grupo EE, 40x.**

## Avaliação da toxicidade

Os tratamentos com os extratos aquosos ou etanólico foi bem tolerado pelos animais por 10 dias. Não foram observados comportamentos anormais, apatia ou diarreia nos animais durante todo o período experimental.

O acompanhamento do peso dos animais é utilizado como parâmetro para quantificar a toxicidade de um tratamento (Seifert et al., 2008; Liu et al., 2010). Os animais foram pesados no início e no final do experimento. Não houve diferença para peso médio dos

camundongos entre grupos em nenhum período examinado (Tab. 8), um indicativo de que os extratos utilizados não apresentaram toxicidade. A diferença percentual no ganho de peso também foi semelhante para todos os grupos, sugerindo que o extrato não tem efeito sobre a taxa de conversão alimentar ou no consumo de alimentos pelos animais. Polifenóis, particularmente as proantocianinas podem interferir no consumo e digestibilidade dos alimentos (Adedapo et al., 2008). As folhas da *A. chica* possuem aproximadamente 10mg/g de substâncias fenólicas (Silva et al., 2007).

**Tabela 8. Peso médio corporal dos camundongos tratados com extratos da *A. chica* por 10 dias**

Grupo	Controle	CA3	CO3	EAB	EE
Início	28.2±2.0 a	26.9±1.5 a	27.3±0.4 a	27.0±2.3 a	27.2±1.4 a
Final	31.8±2.7 a	29.7±1.1 a	29.2±1.0 a	30.6±1.4 a	29.5±1.7 a
Diferença de peso (%)	1,13	1,10	1,07	1,13	1,08

Resultados expressam média±desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem estatisticamente ( $P \geq 0,05$ ).

O peso relativo do fígado e baço foi calculado pela equação: peso do órgão/peso do animal. Não houve diferença significativa entre o peso relativo do fígado para nenhum dos tratamentos em relação ao grupo controle (Tab. 8). Comparando os tratamentos entre si, observa-se que o peso relativo do fígado apresentado pelo grupo CA3 foi significativamente menor do que o apresentado pelo grupo CO3. Também não houve diferença significativa para peso relativo do baço entre grupos (Tab. 9). Esse resultado pode ser considerado favorável, pois a literatura mostra que a hiperplasia esplênica decorrente de hematopoiese extramedular está

associada a um prognóstico desfavorável (Queiroz et al., 2008).

Os tratamentos não alteraram a concentração de uréia dosada no plasma dos animais comparado ao grupo controle. Os valores obtidos foram de 31.8±5.2 para o grupo controle, 40.0±6.5 para o grupo tratado com CA3, 43.4±7.4 no grupo CO3, 40.9±9.0 no grupo EAB e 35.8±7.7 no grupo tratado com o extrato etanólico-EE. Não foi possível realizar a dosagem de creatinina para melhor definição da função renal nos grupos devido à pequena quantidade de amostra de plasma que se obtêm de camundongos.

**Tabela 9. Peso (g) relativo do fígado e baço de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich tratados com diferentes extratos da *A. chica* por 10 dias**

Órgão	Controle	CA3	CO3	EAB	EE
Fígado	0,065±0,007 ab	0,057±0,003 b	0,067±0,005 a	0,062±0,003 ab	0,063±0,004 ab
Baço	0,084±0,014 a	0,073±0,003 a	0,074±0,006 a	0,077±0,010 a	0,077±0,004 a

Valores apresentados como média ± desvio padrão. Valores com letras diferentes na linha indicam diferença estatisticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ).



### Avaliação hematológica e bioquímica plasmática

O hemograma constitui outro meio para se avaliar a toxicidade de um tratamento (Perez et al., 2005). É comum para a maioria dos agentes quimioterápicos a indução de efeitos colaterais como mielotoxicidade associada a anemia e leucopenia. Nesse estudo observou-se que

os extratos da *A. chica* não interferiram no número de hemácias, na concentração de hemoglobina (Hb) ou no volume globular das hemácias (VG). Não houve diferenças entre os tratamentos e o grupo controle quanto ao volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Tabela 10).

**Tabela 10. Parâmetros hematológicos de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich tratados com extratos aquosos e etanólico da *Arrabidaea chica* por 10 dias**

	Controle	CA3	CO3	EAB	EE
Hemácias ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	8.3 $\pm$ 0.6 a	8.0 $\pm$ 0.7 a	8.9 $\pm$ 0.6 a	8.7 $\pm$ 0.6 a	8.6 $\pm$ 0.8 a
HB (g/dL)	12.7 $\pm$ 0.9 a	12.6 $\pm$ 1.0 a	13.7 $\pm$ 0.6 a	13.3 $\pm$ 0.7 a	14.2 $\pm$ 0.4 a
Hematócrito – VG (%)	43.5 $\pm$ 3.3 a	43.2 $\pm$ 2.3 a	46.0 $\pm$ 2.4 a	45.0 $\pm$ 2.2 a	46.5 $\pm$ 1.7 a
VCM (fL)	53.3 $\pm$ 0.7 a	54.0 $\pm$ 2.6 a	52.0 $\pm$ 3.0 a	52.1 $\pm$ 11.5 a	54.2 $\pm$ 4.4 a
HCM (%)	15.3 $\pm$ 0.3 a	15.7 $\pm$ 0.2 a	15.7 $\pm$ 0.6 a	15.4 $\pm$ 0.3 a	16.6 $\pm$ 1.3 a
CHCM (g/dL)	29.3 $\pm$ 0.9 a	29.2 $\pm$ 1.5 a	30.2 $\pm$ 1.3 a	29.6 $\pm$ 0.7 a	30.6 $\pm$ 0.5 a

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na linha não apresentam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

Em um estudo realizado com camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich foi observado anemia discreta após 1<sup>o</sup> dias de inoculação do tumor (Hemácias:  $7,23 \pm 1.74 \times 10^6/\text{mm}^3$ ; hemoglobina:  $10,7 \pm 2.55 \text{g/dL}$ ; hematócrito:  $30,86 \pm 7,78\%$ ) e leucopenia ( $2960 \pm 1220$ ) (Verçosa Junior et al., 2004). A anemia associada ao tumor de Ehrlich ocorre por redução das células vermelhas e da produção de hemoglobina possivelmente por deficiência de ferro, hemólise ou alterações medulares (Raj Kapoor et al., 2007).

Os resultados aqui apresentados indicam que provavelmente o tempo de desenvolvimento do tumor (12 dias) não foi suficiente para causar o esgotamento da medula óssea, ou pode ser inerente ao clone celular implantado. Mais importante porém, é que esse resultado permite inferir que os extratos testados

não produziram efeitos tóxicos na medula óssea dos animais experimentais.

Um estudo utilizando extrato hidroalcoólico da *A. chica* mostrou que doses de até 2g/kg de peso corporal administradas por via intraperitoneal em camundongos não causou letalidade ou toxicidade durante os 14 dias de observação (Catárgenes, 2009). No mesmo estudo, foi demonstrado que a administração de até 3.5g/kg por via oral para ratos não provoca sinais de toxicidade ou morte. A dose de 5g/kg provocou apenas diarreia nos animais nos primeiros dias de administração (Catárgenes, 2009).

Os diferentes tratamentos também não interferiram no número de leucócitos totais comparados ao grupo controle. Já a contagem diferencial indicou aumento no número de neutrófilos no grupo tratado com o extrato etanólico ( $3.57 \pm 0.89$ ) mas

sem alterações na contagem dos outros tipos celulares (Tabela 11). O tratamento com os extratos EAB, CA3 e CO3 não causaram alterações na contagem de neutrófilos, linfócitos, monócitos, bastonetes, eosinófilos ou basófilos.

Os neutrófilos migram para o local do tumor em resposta a fatores quimiotáticos derivados do tumor. Hipotetiza-se que esses fatores são expostos pela degradação proteolítica de proteínas de membrana das células tumorais (Pinto et al., 2009). Quando ativados, os

neutrófilos produzem mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio e podem também estimular a liberação de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) por macrófagos. Essa cascata de eventos é importante para a eliminação de células tumorais (Pinto et al., 2009a). Estudos mostraram que a ativação potente da infiltração de macrófagos e granulócitos pode levar à destruição do tumor e da rejeição do tumor (Albini et al., 2005).

**Tabela 11. Leucograma de camundongos Swiss portadores do tumor de Ehrlich tratados com extratos aquosos e etanólico da *A. chica*.**

	Controle	CA3	CO3	EAB	EE
Leucócitos totais	5.100±90 a	6.100±190 a	5.700±100 a	8.300±320 a	6100±40 a
Linfócitos	3.570±439 a	4.538±606 a	4.400±408 a	6.374±492 a	3904±299 a
Monócitos	469±91 a	390±218 a	171±81 a	647±499 a	244±264 a
Neutrófilos	847±283 a	1.074±392 a	1.015±375 a	1.112±517 a	1.830±299 b
Bastonetes	20±28 a	49±51 a	68±102 a	17±37 a	31±61 a
Eosinófilos	184±182 a	49±109 a	34±76 a	133±74 a	91±61 a
Basófilos	10±23 a	0±0 a	11±25 a	17±37 a	0±0 a

**Dados apresentados como média e desvio padrão. Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P \leq 0,05$ ).**

Por outro lado, a correlação entre neutropenia e eficácia na quimioterapia já foi relatada (Di Maio et al., 2005 citado por Albini et al., 2005). Os neutrófilos desempenham um papel importante na angiogênese tumoral liberando quimiocinas que estimulam a invasão de células endoteliais e formação de vasos sanguíneos. As células imunes constituem um componente proeminente da resposta do hospedeiro ao câncer, mas seu papel na patogenia tumoral não é totalmente compreendida.

Em nosso estudo, observamos que a redução no tamanho do tumor no grupo EE foi acompanhada por um aumento no número de neutrófilos no sangue. Além disso, este grupo apresentou um número maior de neutrófilos na histologia do tumor. Já no tratamento com o extrato CA3, que também reduziu o crescimento

do tumor, não houve alteração no número de neutrófilos no sangue ou diferenças do grupo controle em relação à morfologia do tumor. Aparentemente, o mecanismo de ação que culminou com o menor desenvolvimento tumoral difere para os extratos EE e CA3. Corroborando com essa hipótese, os estudos *in vitro* demonstraram que o extrato etanólico-EE provoca apoptose de células tumorais Jurkat e HL60. Já o extrato CA3 não apresenta tal atividade.

#### **Avaliação do perfil protéico plasmático total e fracionado**

O monitoramento das proteínas de fase aguda (PFA) é um meio rápido e fácil de se avaliar a resposta do sistema imune inato frente às doenças. Em camundongos a eletroforese de proteínas é uma ferramenta usada para investigar

alterações no perfil protéico de animais portadores de tumores comparado aos animais sadios (Gruys et al., 2005).

Os resultados desse estudo indicaram pequenas alterações no perfil protéico dos

animais tratados com a fração aquosa CA3 e o extrato etanólico-EE da *A. chica*. Os demais tratamentos não produziram alterações no proteinograma comparado ao grupo controle (Tab. 12).

**Tabela 12. Perfil plasmático de proteínas de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich tratados com diferentes extratos da *A. chica*.**

	Controle	CA3	CO3	EAB	EE
Proteína total (g/dL)	6.2±0.7 a	5.0±0.3 b	5.7±0.2 ab	5.5±0.3 ab	5.7±0.3 ab
Albumina (%)	48.8±6.6 a	50.3±10.3 a	60.8±12.4 a	50.0±7.3 a	50.7±7.3 a
Albumina (g/dL)	3.0±0.6 a	2.5±0.5 a	3.5±0.8 a	2.8±0.4 a	2.9±0.4 a
α1-globulinas (%)	8.3±1.4 a	9.2±4.7 ab	9.7±3.5 ab	10.6±3.5 ab	14.1±2.6 b
α1-globulinas (g/dL)	0.5±0.1 ab	0.5±0.2 a	0.6±0.2 ab	0.6±0.2 ab	0.8±0.2 b
α2-globulinas (%)	28.2±7.7 a	22.4±12.7 ab	18.1±10.2 ab	20.1±3.4 ab	12.4±3.1 b
α2-globulinas (g/dL)	1.7±0.5 a	1.2±0.7 ab	1.0±0.6 ab	1.1±0.3 ab	0.7±0.2 b
β-globulinas (%)	10.9±1.5 ab	13.4±9.9 ab	8.0±3.2 a	16.1±6.5 ab	19.8±2.2 b
β-globulinas (g/dL)	0.7±0.1 a	0.7±0.4 a	0.5±0.2 a	0.9±0.3 ab	1.1±0.2 b
γ-globulinas (%)	3.8±2.1 a	4.7±3.5 a	3.4±2.7 a	3.3±1.7 a	3.0±1.4 a
γ-globulinas (g/dL)	0.2±0.1 a	0.2±0.2 a	0.2±0.2 a	0.2±0.1 a	0.2±0.1 a
Albumina/globulina	1.0±0.2 a	1.1±0.5 a	1.8±1.2 a	1.0±0.2 a	1.1±0.3 a

**Valores apresentados como média ± desvio padrão. Valores com letras diferentes na linha indicam diferença estatisticamente significativa (P ≤ 0,05).**

Em relação às proteínas totais, nota-se que o grupo tratado com o extrato CA3 apresentou valores significativamente menores em relação ao controle (5.0±0.3g/dL). Comparando esse grupo aos demais tratamentos não há diferença significativa. A análise do perfil fracionado desse grupo não indica diferença para nenhuma fração em relação ao controle, incluindo a fração da albumina, principal proteína plasmática.

A concentração das PFA pode se elevar ou diminuir em vários processos patológicos como inflamação, infecção ou neoplasia (Kaneco, 2003). O perfil protéico sérico de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich já foi estudado (Brenneman & Rigby, 1968). Houve diminuição significativa da proteína total e redução discreta das

frações de albumina e α1-globulinas. Além disso, aumento significativo das frações α2-globulinas e γ-globulinas. Não houve alteração na concentração de β-globulinas (Brenneman & Rigby, 1968).

Durante o desenvolvimento neoplásico ocorrem distúrbios na homeostase desencadeando a resposta de fase aguda, sobretudo quando há necrose tecidual ou reação inflamatória secundária, (Gruys et al., 2005). O dano tecidual causa liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF-α, que juntamente com óxido nítrico e glicocorticoides modulam a reação de fase aguda e a produção de PFA no fígado (Gruys et al., 2005).

As proteínas de fase aguda positivas apresentam pequena, média ou alta

resposta de acordo com as diferentes espécies. Uma PFA de alta resposta pode aumentar de 100 a 1000 vezes sua concentração após estimulação atingindo pico de 24 a 48 horas após o insulto e decaindo rapidamente na fase de resolução. Proteínas de média resposta aumentam de 5 a 10 vezes sua concentração atingindo pico 2 a 3 dias após estimulação e reduzindo mais lentamente que as proteínas de alta resposta (Kaneko, 2008).

A albumina pode apresentar-se diminuída na caquexia do câncer (Kaneko, 2008) sendo um bom parâmetro para avaliar a condição do indivíduo em tratamento. Nesse estudo, não houve diferença entre os tratamentos e o grupo controle quanto aos valores relativos (%) ou absolutos (g/dL) de albumina.

Existe uma variação substancial em relação à produção das PFA após estímulo nas diferentes espécies domésticas (Eckersall, 2000). No camundongo a principal proteína de alta resposta é o amilóide sérico A (SAA) e de média são haptoglobina (Hp) e  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida (AGP).

O tratamento com o extrato etanólico-EE causou aumento nos valores relativo de  $\alpha$ 1-globulinas e relativo e absoluto de  $\beta$ -globulinas (Tab. 4). A  $\alpha$ 1-antitripsina representa 90% das proteínas da banda  $\alpha$ 1-globulina. Nos 10% restantes, estão a  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida (AGP) e a alfafetoproteína, entre outras (Eckersall, 2000). A  $\alpha$ 1-antitripsina é o componente mais importante do grupo dos inibidores de proteases com função de neutralizar as enzimas proteolíticas bacterianas ou leucocitárias durante o processo inflamatório agudo. Sua atividade de antiprotease minimiza os danos aos tecidos normais (Kaneko, 2003). É uma proteína de fase aguda moderada e aumenta somente duas a três vezes seu valor normal durante a resposta (Eckersall, 2000). Postula-se que o número significativamente mais elevado

de neutrófilos nesse grupo associado à maior produção de proteases no sítio tumoral estejam estimulando a liberação de  $\alpha$ 1-antitripsina pelo fígado.

A AGP tem sido usada como marcador tumoral e alguns estudos indicam que ela se eleva em cães com carcinomas, sarcomas e linfomas. Sua indução e expressão é controlada por citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  e glucocorticóides sintetizados principalmente no fígado (Yuki et al., 2011). Suas funções biológicas específicas incluem atividade anti-neutrofílica e anti-complemento, controle da proliferação de linfócitos e controle da agregação plaquetária (Yuki et al., 2011). Seria a neutrofilia induzida pelo extrato etanólico-EE um estímulo para a produção de AGP?

As proteínas de fase aguda lipoproteína  $\beta$  e C3 do complemento foram localizados na região  $\beta$ 1 e a transferrina e IgM foram localizadas na região de  $\beta$ 2-globulinas. O aumento dos valores de  $\beta$ -globulinas no grupo tratado com o extrato etanólico da *A. chica* pode ter ocorrido devido ao aumento de IgM sugerindo que os flavonóides e/ou outras substâncias no extrato etanólico da planta poderiam exercer um efeito imunomodulador.

O tratamento com o extrato etanólico-EE, causou decréscimo valores de  $\alpha$ 2-globulinas. A haptoglobina, encontrada nessa fração, tem atividades de limpeza e se liga a metabólitos oriundos de degradação protéica celular permitindo que eles sejam reinseridos nos processos metabólicos do hospedeiro. Ela se liga à hemoglobina livre no sangue prevenindo danos oxidativos ao tecido e indiretamente exerce atividade antibacteriana reduzindo a disponibilidade do heme e do ferro (Kaneko, 2008).

Já foi observado que o menor desenvolvimento tumoral está associado a menores áreas de necrose (Pinto et al.,

2009a) e naturalmente à menor concentração de produtos da degradação protéica celular. Portanto, outra questão é levantada: o extrato etanólico poderia ter causado uma diminuição na área de necrose tumoral?

Não foram observadas diferenças entre grupos para os valores de gama globulinas e a relação albumina/globulina.

### **Fenotipagem de células mononucleares no tecido tumoral**

A identificação dos tipos celulares envolvidos na inibição do crescimento tumoral durante um tratamento permite inferir se a inibição está associada a determinado tipo celular e se existe efeito direto do tratamento sobre essas células (Santos et al., 2004). Para investigar se os efeitos terapêuticos atribuídos a *A. chica* estão relacionados à atividade antitumoral e ao seu potencial imunomodulador, avaliou-se os efeitos dos extratos sobre a resposta imune celular presente no infiltrado associado ao tumor, bem como no sangue periférico dos camundongos.

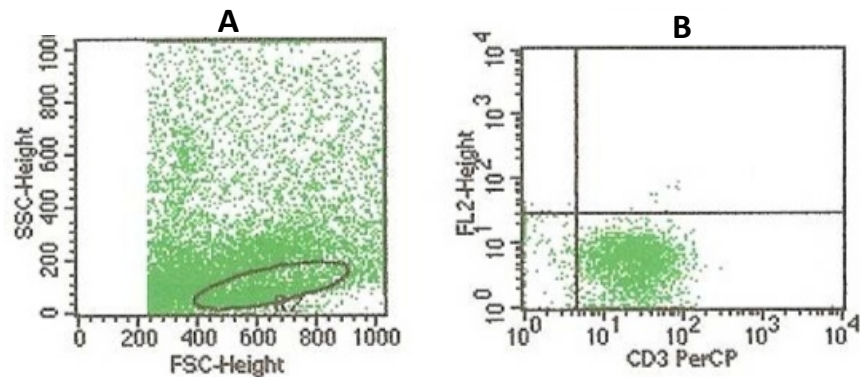
Um animal do grupo controle foi excluído do experimento por não ter desenvolvido o tumor de Ehrlich. A literatura relata a ocorrência de resistência natural ao desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em aproximadamente um a cada

15 camundongos (Brenneman & Rigby, 1968). Além disso, ressalta-se que a linhagem de camundongo utilizada no estudo compreendem camundongos Swiss não isogênicos. Portanto, é comum a variação individual na resposta de camundongo para camundongo. No grupo tratado com o extrato etanólico-EE foram analisados quatro animais devido à perda de um camundongo por falsa via durante o processo de gavagem no período experimental.

Todos os outros animais (n=23) apresentaram desenvolvimento tumoral confirmado pela morfologia do tumor em HE. De todos esses animais que desenvolveram o tumor, 10 foram excluídos da avaliação da imunofenotipagem de células mononucleares no tecido tumoral. A exclusão ocorreu após verificação da ausência de população de células inflamatórias pela citometria de fluxo (Fig 34).

Interessante, é que todos os animais excluídos pertenciam à algum dos grupos tratados com extratos da *A. chica*, sendo três animais tratados com a fração aquosa CA3; dois animais tratados com a fração orgânica CO3; três animais pertencentes ao grupo tratado com o extrato EAB e dois animais tratados com o extrato etanólico-EE.

Camundongo do grupo controle



Camundongo do grupo CA3

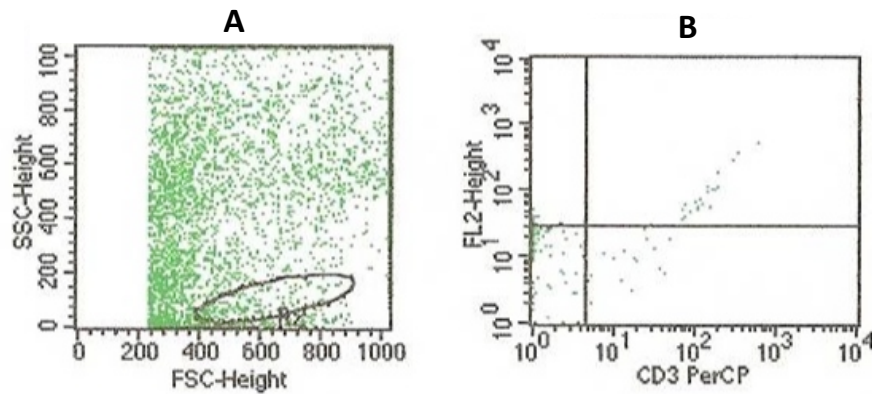


Figura 34. Análise das células inflamatórias mononucleares infiltradas no tumor de Ehrlich. Os histogramas (A) representam o perfil celular da população de linfócitos selecionada no gate R2, em gráfico de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Os histogramas (B) representam o perfil de análise da população de linfócitos T CD3<sup>+</sup>. É bastante evidente a ausência de células associadas ao tumor no animal do grupo CA3, comparado ao animal do grupo controle.

A análise das células inflamatórias infiltradas no tumor foi realizada no restante dos animais (n=13) sendo quatro do grupo controle; dois animais do grupo CA3; três animais do grupo CO3; dois animais do grupo EAB e dois animais do grupo EE.

Observou-se redução da porcentagem de linfócitos T CD3<sup>+</sup> no grupo tratado com o

extrato CA3. Essa redução está associada à redução dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> sem alteração na porcentagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>. Além disso, o extrato CA3 causou redução das células NK infiltradas no tumor. Os demais grupos apresentaram valores de LT CD3<sup>+</sup> semelhantes ao controle (Fig. 35).

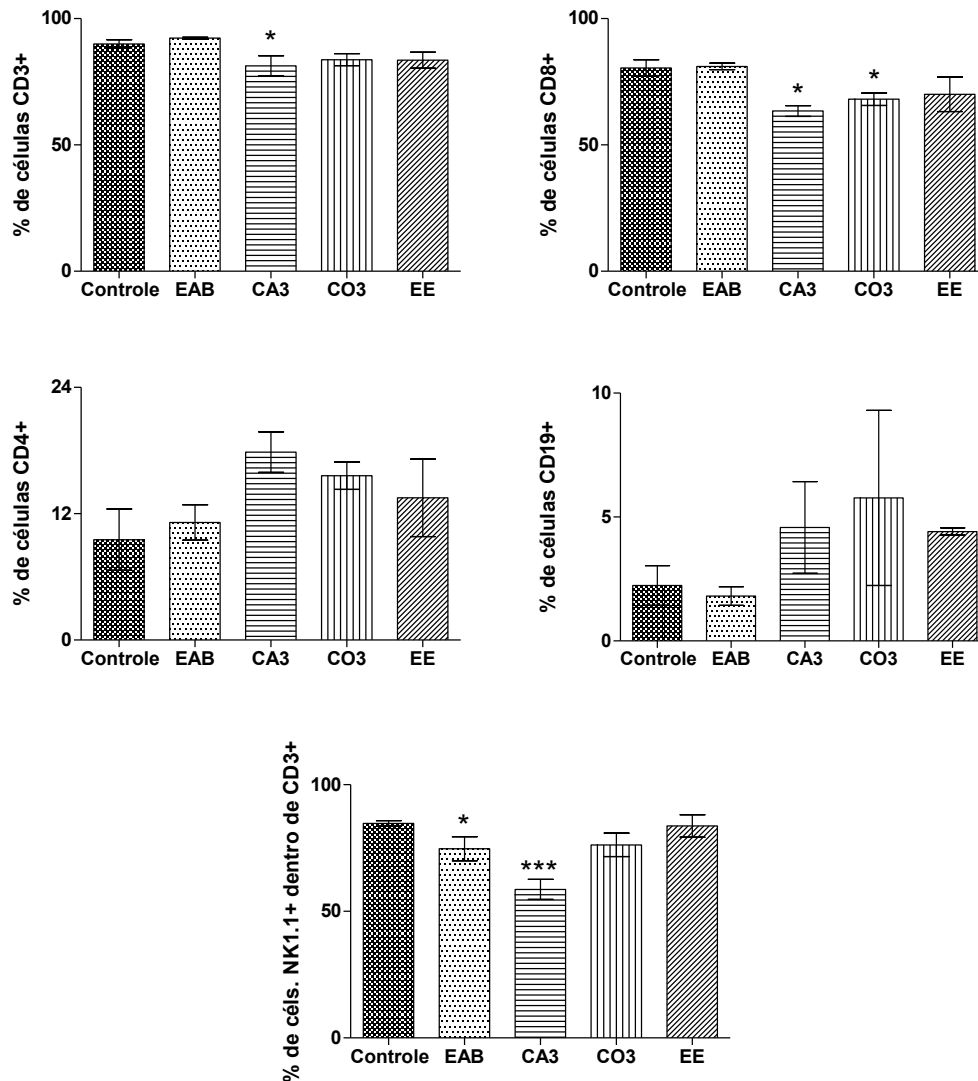


Figura 35. Análise *ex vivo* do percentual de subpopulações de linfócitos de tecido tumoral de camundongos Swiss submetidos a diferentes tratamentos com extratos de *A. chica*.

Os dados desse experimente sugerem que a ação antitumoral de CA3 não está relacionada à imunidade celular mediada por linfócitos TCD8<sup>+</sup> citolíticos ou células NK. Os experimentos *in vitro* indicam que esse extrato não tem efeito citotóxico sobre células leucêmicas ou de tumor mamário MCF-7, bem como não induz apoptose das células leucêmicas. Qual seria o possível mecanismo de ação do CA3 na inibição do tumor? Aparentemente, essa ação está associada ao efeito antiinflamatório apresentado pelo extrato demonstrado nos estudos de implante de esponja murino e pela modulação do sistema imune. Conforme observado, além do efeito da fração aquosa CA3 sobre linfócitos T e células

NK, ressalta-se que 3 animais recebendo esse tratamento não apresentaram células inflamatórias infiltradas no tumor.

A maioria das células tumorais não expressa MHC-II necessária para estimular as células T auxiliares que promovem a diferenciação das células TCD8<sup>+</sup> (Abbas e Lichtman, 2005). Células tumorais de Ehrlich não expressam MHC (Bergami-Santos et al., 2004). Uma vez que os linfócitos TCD8<sup>+</sup> são gerados, eles são capazes de reconhecer e destruir as células tumorais (Abbas e Lichtman, 2005).

A importância das células TCD4<sup>+</sup> auxiliares na imunidade tumoral é pouco esclarecida. Elas produzem citocinas

como TNF e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que podem aumentar a expressão de MHC-I pelas células tumorais e a sensibilidade à lise por linfócitos T citolíticos. IFN- $\gamma$  também pode ativar a destruição das células tumorais por macrófagos (Abbas e Lichtman, 2005).

Em algumas situações, a inflamação no microambiente tumoral contribui para a proliferação e sobrevivência das células tumorais, angiogênese, metástase (Estrela-Lima et al., 2010), subversão do sistema imune, menor resposta aos hormônios e agentes quimioterápicos (Mantovani et al., 2008). Evidências recentes também sugerem que a inflamação ligada ao câncer além de promover o desenvolvimento do tumor, promove instabilidade genética (Allavena et al., 2010; Estrela-Lima et al., 2010).

A subpopulação de linfócitos ou de macrófagos foi estudada no tratamento do tumor ascítico de Ehrlich com veneno da *Bothrops jararaca*. A redução do tumor ascítico pelo veneno da *B. jararaca* foi observada somente no 11<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias após inoculação do tumor. Aos 14 dias o tratamento não afetou a subpopulação de linfócitos ou de macrófagos sugerindo que a redução tumoral está associada ao efeito direto do veneno sobre as células tumorais ou pelo efeito proteolítico do veneno sobre mediadores que modulam o crescimento (Santos et al., 2004). Oito dias após a inoculação do tumor, tempo em que este apresenta-se em crescimento exponencial, foi observado diminuição do número de macrófagos, linfócitos TCD4<sup>+</sup>, linfócitos TCD8<sup>+</sup> e linfócitos B sem

alteração no número de células NK (Santos et al., 2004).

Em carcinomas mamários de cadela, foi observado número mais elevado de linfócitos T nos tumores sem metástases, associado à maior concentração de LTCD8<sup>+</sup> e menor relação TCD4<sup>+</sup>/TCD8<sup>+</sup>. Além disso, maior infiltração de linfócitos B nos tumores (Lima et al., 2010).

Postula-se que os macrófagos são ativados pelo reconhecimento de antígenos na superfície das células tumorais. A destruição dessas células ocorre pela liberação de enzimas lisossomais, de intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico. Além disso, macrófagos ativados também produzem a citocina TNF que exerce efeito inibitório no crescimento tumoral relacionado à indução de trombose nos vasos sanguíneos tumorais (Abbas e Lichtman, 2005).

Nesse estudo a marcação dos macrófagos com o anticorpo não foi satisfatória e portanto a porcentagem dessas células presentes no tumor não pôde ser avaliada.

#### **Fenotipagem de células mononucleares no sangue:**

Os dados da fenotipagem das células mononucleares no sangue demonstraram um perfil diferenciado de ação dos extratos da *A. chica* sobre as subpopulações de linfócitos. O tratamento com o extrato EAB promoveu diminuição do percentual de linfócitos TCD3<sup>+</sup> em comparação ao grupo controle (Fig.36).



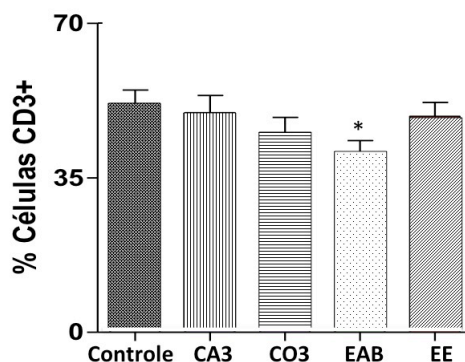


Figura 36. Análise *ex vivo* do percentual de subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup> no sangue de camundongos Swiss submetidos a diferentes tratamentos com extratos de *A. chica*.

A análise das subpopulações dos linfócitos T definiu melhor o impacto do tratamento com os diferentes extratos. O tratamento com os extratos aquosos CA3, CO3, EAB e etanólico-EE reduziu o percentual da subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em comparação ao grupo controle (Fig.37). Por outro lado, os tratamentos não produziram nenhuma alteração na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Fig. 36). O mesmo foi observado para a população de células natural killer (Fig. 38).

O extrato CO3 foi capaz de aumentar o percentual de linfócitos B CD19<sup>+</sup> (Fig. 37) além de reduzir o percentual de células CD4<sup>+</sup>.

Estudos adicionais devem ser realizados no intuito de investigar detalhadamente os possíveis mecanismos que contribuiriam para o processo de imunomodulação detectado nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B, após o tratamento com os diferentes extratos.

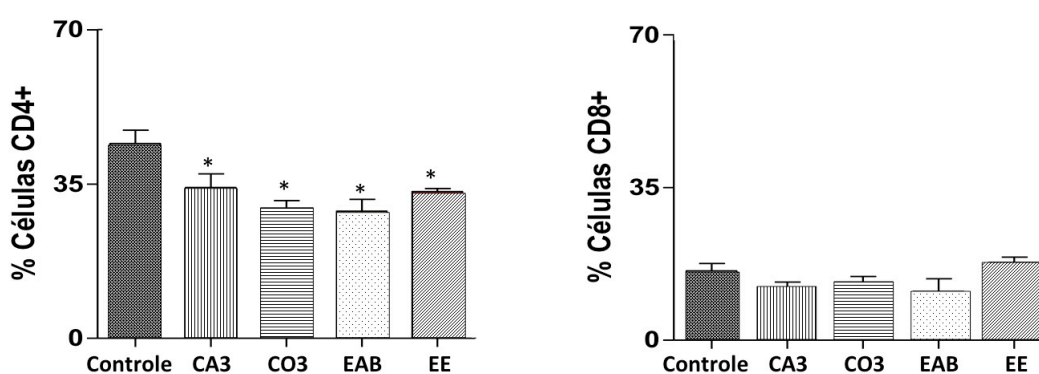


Figura 37. Análise *ex vivo* do percentual de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no sangue de camundongos Swiss submetidos a diferentes tratamentos com extratos de *A. chica*.

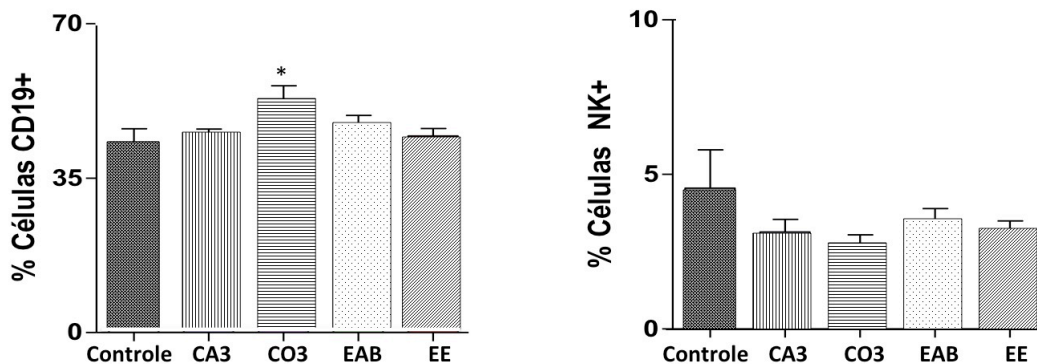


Figura 38. Análise *ex vivo* do percentual de subpopulações de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) e células NK<sup>+</sup> no sangue de camundongos Swiss submetidos a diferentes tratamentos com extratos de *A. chica*. Os resultados foram expressos como média± desvio padrão do percentual da subpopulação avaliada.

## CONCLUSÃO

Os resultados indicam que os extratos etanólico-EE e a fração aquosa CA3 da *Arrabidaea chica* apresentam atividade antitumoral por modos de ação diferenciados.

O efeito da fração aquosa CA3 parece estar relacionado à sua atividade antiinflamatória, antiangiogênica e imunomoduladora. O extrato etanólico-EE apresenta atividades pró-apoptótica, antiinflamatória e antiangiogênica.

Diferentes subpopulações de linfócitos estão envolvidas na inibição do crescimento tumoral pelos tratamentos com a fração aquosa CA3 e extrato etanólico-EE.

O extrato CA3 provoca redução de células NK, e de linfócitos TCD3<sup>+</sup> no tecido associado à diminuição de células TCD8<sup>+</sup> sem alteração nos linfócitos TCD4<sup>+</sup>. No sangue causa diminuição percentual de linfócitos TCD4<sup>+</sup> sem alterar os outros tipos celulares.

O extrato etanólico-EE diminui o percentual de linfócitos TCD4<sup>+</sup> no sangue, mas não modifica a população de células mononucleares no microambiente tumoral.

Conclui-se que a *A. chica* apresenta efeito antitumoral após sua administração oral confirmando a sua utilização pela medicina tradicional.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo foi realizado a fim de mimetizar o uso popular da planta *Arrabidaea chica* e avaliar especialmente seu efeito antitumoral. Resultados interessantes foram obtidos sendo observado que o extrato etanólico, administrado por via oral, apresenta efeito antitumoral no modelo de Ehrlich. Considerando que todo quimioterápico é usado pela via parenteral, futuramente, pretende-se avaliar a eficácia terapêutica do extrato etanólico pelas vias intraperitoneal e venosa.

De acordo com o uso popular, o chá da *Arrabidaea chica* seria eficaz como medicamento contra a leucemia. Tendo em vista os resultados dos experimentos *in vitro*, que demonstram o efeito citotóxico em células leucêmicas, seria interessante a avaliação de sua eficácia *in vivo* utilizando um modelo de leucemia.

Além disso, pretende-se também avaliar o potencial terapêutico do uso dos extratos da *A. chica* não como medicamento de escolha para o tratamento do câncer, mas em associação à outras drogas.

Por fim, os resultados obtidos nesse estudo estimulam o desenvolvimento de futuros trabalhos direcionados à purificação e isolamento das substâncias ativas dos extratos da *A. chica* e a realização de novos estudos a fim de elucidar os mecanismos de ação envolvidos nas atividades antitumoral, antiinflamatória, antiangiogênica e imunomoduladora identificadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A. K.; Lichtman. *Imunologia Celular e Molecular*, 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
2. Ahmad, S.A.; Nazim, S.; Siraj, S.; Siddik, P.M.; Whid, C.A. *Euphorbia neriifolia* Linn: a phytopharmacological review. *International Research Journal of Pharmacy*, v.2, n.5, p.41-48 2011.
3. Albini, A.; Tosetti, F.; Benelli, R.; Noonan, D.M. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res*, v.65, n.23, 2005.
4. Amaral, R.R.; Manezes, F.S.; Rocha, L.M.; Soares, T.E.; Ranna, F. Estudo Fitoquímico e Atividade Antioxidante em extratos de folhas de *Arrabidaea chica*, Resumos da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2002.
5. Andre, N.D.; Barbosa, D.S.; Munhoz, E.; Estevão, D.; Cecchini, R.; Wantabe, M.A.E. Measurement of Cytotoxic Activity in Experimental Cancer. *Journal of clinical Laboratory Analysis*, v.18 ,p.27-30, 2004.
6. Bailey, P. J. Sponge implants as models. *Methods Enzymol*, v.162, p.327-34. 1988.
7. Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.*, v. 4, n. 7, p.540-550, 2004.
8. Barbosa, W.L.R.; Pinto, L.N.; Quignard, E.; Vieira, J.M.S.; Silva Jr., J.O.C.; Albuquerque, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18, n.4, p.544-548, 2008.
9. Barcelos, L.S.; Talvani, A.; A. S. Teixeira, A.S.; L. Q. Vieira, L.Q.; Cassali, G. D.; Andrade, S. P.; Teixeira, M. M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology*, v.78, 2005.
10. Barnes, P.J.; Karin, M. Nuclear factor- $\kappa$ B, a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine*, v.336, n.15, p.1066-1071, 1997.
11. Beltz, L.A.; Bayer, D.K.; Moss, A.L.; Simet, I.M. Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols. *Anticancer Agents Med Chem*.v.6, n.5, p.389-406, 2006.
12. Bergami-Santos, P.C.; Mariano, M.; Barbuto, J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sci* , v.75, p.245-255, 2004
13. Brenneman, M.; Rigby, P. Protein electrophoretic patterns of serum and peritoneal fluid in normal, tumor-bearing and immune mice. *Cancer Research*, v.28, p.1138-1142, 1968.
14. Catargenes MSS. Investigação dos efeitos tóxicos e hipertensivo de *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae). 29f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. 2009.
15. Chapman, E.; Perkin, A.G.; Robinson, R. The colouring matters of carajurona. *J. Chem. Soc.*, p.3015-3041, 1927.
16. Côrrea MP 1931. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas. V2. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura.

17. Cross, A. S., S. Sakarya, et al. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J. Biol. Chem.*, v.278, n.6, Feb 7, p.4112-20. 2003.
18. Dagli, M.L.Z.; Soma, M.; Guerra, J.L.; Saldiva, P.H.N. Lymphatic dissemination in neoplasia: determination of nuclear volume and DNA content of primitive and regional lymphnode Ehrlich tumor cells. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.29, n.2, p.267-271, 1992a.
19. Dagli, M.L.Z.; Guerra, J.L.; Saldiva, P.H.N. An experimental study on lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.29, n.1, p.97-103, 1992b.
20. De-Souza, A.S.; Pagadigorria, C.L.S. Ishii-Iwamoto, E.L.; Bracht, A.; Cortez, D.A.G.C.; Yamamoto, N.S. Effects of the *Arrabidaea chica* extract on energy metabolism in the rat liver. *Pharmaceutical Biology*, v. 47, n. 2, p. 154-161, 2009. doi: 10.1080/13880200802436281
21. Ding, M.; Feng, R.; Wang, S.W.; Bowman, L.; Lu, Y.; Qian, Y.; Castranova, V.; Jiang, B.H.; Shi, X. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J. Biol. Chem.*, v. 281, n.25, p.17359-17368, 2006.
22. Eckersall, P.D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue Méd. Vét.*, v. 151, n.7, p. 577-584, 2000.
23. Ferro, D. *Fitoterapia conceitos clínicos*. São Paulo: Ateneu; 2006.
24. Filho, B. G. *Bogliolo Patologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
25. Filho, C.V.; Yunes, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v.21,n.1,p.99-105, 1998.
26. Fotsis, T.; Pepper, M.S.; Aktas, E.; Breit, S.; Rasku, S.; Aldercreutz, H.; Wahala, K.; Montesano, R.; Schweigerer, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitor of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *Cancer research*, v.57, p.2916-1921, 1997.
27. Fujiwara, A.; Mori, T.; Lida, A. et al. Antitumor-promoting naphthoquinones from *Capalga ovata*. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 629-632, 1998.
28. Gruys, E.; Toussaint, M.J.M.; Niewold, T.A.; Koopmans, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ SCI.*, v.6B, n.11, p. 1045-1056, 2005. doi:10.1631/jzus.2005.B1045
29. Guerra, J.L. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de Tumor de Ehrlich. 1983. 79p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
30. Guerra, M.P.; Nodari, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (org.) *Farmacognosia: da planta*

- ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, Capítulo 1, p.13-26, 2007.
31. Hartveit, F.; Halleraker, B. Histological demonstration of a biphasic acute inflammatory response to subcutaneous transplants of Ehrlich's carcinoma. *Acta Path Microbiol Scand*, v.79A, n1, p.43–52, 1971.
32. Indap, M.A.; Radhika, S.; Motiwale, L.; Rao, K. Quercetin: Antitumor activity and pharmacological manipulations for increased therapeutic gains. *Indian J Pharm Sci.*, v.68, n.4, p. 465-469, 2006. DOI: 10.4103/0250-474X.27819
33. Jacome, R. L.; Paiva, R. et al. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (bolsa-de-pastor). *Quím. Nova*, São Paulo, v. 22, n. 2, 1999. doi: 10.1590/S0100-40421999000200004.
34. Jaganjac, M.; Poljak-Blazi, M.; Kirac, I.; Borovic, S.; Joerg Schaur, R.; Zarkovic, N. Granulocytes as effective anticancer agent in experimental solid tumor models. *Immunobiology*, v.215,n.12,p.1015-20, 2010.
35. Ji, H.F.; Li, X.J.; Zhang, H.Y. Natural products and drug discovery. *EMBO reports*, v.10, n.3, p.194-199, 2009.
36. Jorge, M.P.; Madjarof, C.; Ruiz, A.L.T.G.; Fernandes, A. T.; Rodrigues, R.A.F.; Sousa, I.M.O.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *J. Ethnopharmacol* v.118, p.361-366, 2008.
37. Kaneko JJ, Harvey DW, Bruss WL 2008. *Clinical biochemistry of domestic Animals*, 6.ed. San Diego: Academic Press, 916p.
38. Kalil Filho, A. N.; Costa Kalil, G.P.; Luz, A.I.R. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da amazônia brasileira para uso humano. 2000. 4p. (MAPA-Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, n. 50).
39. Kim, J.B.; Koo, H.N.; Joeng, H.J.; Lyu, Y.S.; Park, S.G.; Won, J.H.; Kim, Y.K.; Hong, S.H.; Kim, H.M. Induction of apoptosis by Korean medicine Gagam-whanglyunhaedoktang through activation of caspase-3 in human leukemia cell line, HL-60 cells. *J Pharmacol Sci* v.97, p.138–145, 2005.
40. Kinghorn, D.; Chin, Y.W.; Swanson, S.M. Discovery of Natural Product Anticancer Agents from Biodiverse Organisms. *Curr Opin Drug Discov Devel.*, v.12,n.2, p.189–196, 2009.
41. Kohn, L.K.; Pizão, P.E.; Foglio, M.A.; Antônio, M.A.; Amaral, M.C.E.; Bittric, V.; Carvalho, J.E. Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart. *Rev. Bras.Pl. Med.*, Botucatu, v.8, p.110-115, 2006.
42. Kumar, C.A.; Jayarama, S.; Basappa. et al. Pro-apoptotic activity of imidazole derivates mediated by up-regulation of Bax and activation of CAD in Ehrlich Ascites Tumor cells. *Invest New Drugs*, v.25, p. 343-350, 2007.
43. Leite, J.P.V.; Oliveira, A.B.; Lombardi, J.A.; Filho, J.D.S.; Chiari, E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Bio Pharm Bull* v.29, p.2307-2309, 2006.
44. Li, J.W.H.; Vederas, J.C. Drug Discovery and natural products: end of

- an era or an endless frontier? *Science*, v.325, n.10, p.161-166, 2007.
45. Lima, A.E.; Araujo, M.S.S.; Costa Neto, J.M.; Carvalho, A.T.; Barrouin-Melo, S.M.; Cardoso, S.V.; Martins-Filho, O.A.; Serakides, R.; Cassali, G.D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*, v.10, n.256, p.1-14, 2010.
46. Liu, X.P.; Zhou, S.T.; Li, X.Y.; Chen, X.C.; Zhao, X.; Qian, Z.Y.; Zhou, L.N.; Li, Z.; Wang, Y.M.; Qian Zhong<sup>1</sup>, Yi, T.; Li, Z.Y.; He, X.; Wei, Y.Q. Anti-tumor activity of N-trimethylchitosan-encapsulated camptothecin in a mouse melanoma model. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.*, v.29, n.76, p.1-9, 2010.
47. Luna L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw Hill; 1968.
48. Luo, H.; Rankin, H.O.; Liu, L.; Daddysman, M.K.; Jiang, B.H.; Chen, Y.C. Kaempferol Inhibits Angiogenesis and VEGF Expression Through Both HIF Dependent and Independent Pathways in Human Ovarian Cancer Cells, *Nutr Cancer.*, v.61, n. 4, p. 554–563, 2009. doi:10.1080/01635580802666281
49. Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Veiga Jr. V.F.; Grynberg, N.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova*, v.25, p. 429-438, 2002.
50. Magalhães, I. R. S.; Soares, A.O.; Araujo, L.M.; Castro da Costa, P.R.; Roland, I.A.; Borrás, M.R.L. Determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in the Leaves and Tea of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verl. *Biol Trace Elem Res*, v.132, p.239–246, 2009. DOI 10.1007/s12011-009-8381-2
51. Mann, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, presente and future. *Nature Reviews Cancer*, v.2, p.143-148, 2002. doi:10.1038/nrc723
52. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature*, v. 454, n.7203, p.436-444, 2008. doi:10.1038/nature07205
53. Matos, A. F. J. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará – Ceará: Imprensa Universitária, 1988. 150p.
54. Matsuzaki, P.; Haraguchi, M.; Akisue, G.; Oloris, S.C.S.; Nagamine, M.K.; Silva, T.C.; Sakai, M.; Fonseca, E.S.M.; Palermo-Neto, J.; Górniak, S.L.; Dagli, M.L.Z. Antineoplastic effects of butanolic residue of *Pfaffia paniculata*. *Cancer letters*, v.238, p. 85-89, 2006.
55. Molinski, T. F.; Dalisay, D.S.; Lievens, S.L.; Saludes, J.P. Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery.*, v.8, p.69-85, 2009. doi:10.1038/nrd2487
56. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paul, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J. Boyd. M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.83, p.757-776, 1991.
57. Moura, S.A.L; Ferreira, M.A.N.D; Andrade, S.P.; Reis, M.L.C.; Noviello, M.L.; Cara, D.C. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model.

- Evid Based Complement Alternat Med.* 2011. doi: 10.1093/ecam/nep197.
58. Mullane, K. M., R. Kraemer, *et al.* Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J. Pharmacol. Methods.*, v.14, n.3, p.157-67, 1985.
59. Naoum, P.C. *Eletroforese Técnicas e Diagnósticos*, 1 Ed., São Paulo, SP: Livraria Santos Editora, 1990. 202p.
60. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.*, v.70, n.3, p.461-477, 2007.
61. Noonan, D.M.; Benelli, R.; Albini, A. Angiogenesis and cancer prevention: a vision. *Recent Results Cancer Res.* v.174, p.219-224, 2007.
62. Oliveira, D.P.C.; Borráz, M.R.L.; Ferreira, L.C.L.; López-Lozano, J.L. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. *Rev Bras Farmacogn* v.19, p.643-649, 2009.
63. Perez, R.R.; Lobo e Silva, M.A.M.; Varzim, F.L.S.B.; Oliveira, S.B.; Hucke, E.E.T.S. A ação do decanoato de nandrolona (Deca-durabolin) sobre parâmetros hematológicos e proteína total plasmática de ratos (*Rattus rattus*) com depressão medular induzida após administração de sulfato de vincristina (Oncovin). *Ciência Rural* v.35, p.589-595, 2005.
64. Pinto, F.C.H.; Menezes, G.B.; Moura, S.A.L.; Cassali, G.D.; Teixeira, M.M.; Cara, D.C. Induction of apoptosis in tumor cells as a mechanism of tumor growth reduction in allergic mice. *Pathol Res Pract* v.205, n.8, p. 559-567, 2009a.
65. Pinto, A.V.F.S.; Martins, P.R.; Romagnoli, G.G.; Campanelli, A.P.; Terezan, A.P.; Filho, E.R.; Eira, A.F.; Kaneko, R. Polysaccharide fraction of *Agaricus brasiliensis* avoids tumor induced IL-10 production and changes the microenvironment of subcutaneous Ehrlich adenocarcinoma. *Cellular immunology*, v.256, p.27-38, 2009b.
66. Plunkett, M. L.; J. A. Hailey. An *in vivo* quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. *Lab. Invest.*, v.62, n.4, p.510-517, 1990.
67. Queiroz, M.L.S.; Valadares, M.V.; Torello, C.O.; Ramos, A.L.; Oliveira, A.B.; Rocha, F.D.; Arruda, V.A.; Accorci, W.R. Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanedae* bark extract and B-lapachone on the hematopoietic response of tumor-bearing mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.117, p.228-235, 2008.
68. Raj Kapoor, B.; Sankari, M.; Sumithra, M.; Anbu, J.; Harikrishnan, N.; Gobinath, M.; Suba, V.; Balaji, R. Antitumor and cytotoxic effects of *Phyllanthus polyphyllus* on Ehrlich ascites carcinoma and human cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* V.71, n.9, p. 2177-2183, 2007.
69. Reis, O.T.G.; Raini, J.C.; Coradi, S.T.; Constantino, D.H.J. Effect of L-arginine and L-NAME treatments on polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells influx during tumor growth. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.24, n.2, p.107-111, 2009.
70. Ren, H.J.; Hao, H.J.; Shi, Y.J.; Meng, X.M.; Han, Y.Q. Apoptosis-inducing effect of quercetin and kaempferol on human HL-60 cells and its mechanism. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* V.18, n. 3, p. 629-633, 2010 (abstract).



71. Ribeiro, A.F.C.; Melo, M.M.; Cassali, G.D.; Ferraz, V.P.; Cardoso, G.M.M.; Telles, T.C.; Souza-Fagundes, E.M. Antileukemic potential of crude extracts of *Arrabidaea chica*. XII International Congress of Toxicology. 19-23 July 2010 Barcelona, Spain. (ABSTRACT ADENDA). p.46. [http://www.elsevier.com/framework\\_products/promis\\_misc/ADDENDA%20IUTOX%202010%20bis%20a%20ELSEVIER.pdf](http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/ADDENDA%20IUTOX%202010%20bis%20a%20ELSEVIER.pdf) acesso em 14/03/2011.
72. Ribeiro, A.F.C. et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.2, 2012.
73. Sampaio, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221p.
74. Seifert, G.; Jesse, P.; Laengler, A.; Reindl, T.; Luth, M.; Lobitz, S.; Henze, G. Prokop, A.; Lode, H. N. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. *Cancer Letters* 264: 218–228, 2008.
75. Santos, M.M.V.; Silva, R.J.; Silva, M.G.; Fecchio, D. Subpopulations of mononuclear leukocytes associated with inhibition of Ehrlich ascites tumor growth by treatment with *Bothrops jararaca* venom. *Mediators of Inflammation*, v.13, n.1, p.29-32, 2004.
76. Schindler, R.; Mentlein, R. Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells. *J. Nutr.*, v.136, n.6, p.1477-1482, 2006.
77. Segura, J. A.; Barbero, L.G.; Marquez, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. *Immunol. Lett.*, v.74, p.111-115, 2000.
78. Sellers, W. R.; Fisher, D. E. Apoptosis and cancer drug targeting. *The Journal of Clinical Investigation*, v.104, n. 12, p. 1655-61, 1999.
79. Silva, A.E.; Serakides, R.; Ferreira, E.; Moraes, J.R.C.; Ocarino, N.M.; Cassali, G.D. Efeito do hipotireoidismo no tumor de ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* v.48, n.6, p.867-874, 2004.
80. Silva, A.E.; Santos, F.G.A.; Cassali, G.D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.4, p.658-661, 2006.
81. Silva, E.M.; Souza, J.N.S.; Rogez, H.; Rees, J.F.; Larondelle, Y. Antioxidant activities and polyphenol contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem* v.101, p. 1012-1018, 2007.
82. Soobrattee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O.I.; Bahorun, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Res* v.579, p. 200–213, 2005.
83. Sorensen, O.; Borregaard, N. Methods for quantitation of human neutrophil proteins, a survey. *J. Immunol. Methods.*, v.17, n.232, p.179-190, 1990.
84. Suffredini, I.B.; Varella, A.D.; Younes, R.N. Cytotoxic Molecules from Natural Sources: Tapping the Brazilian Biodiversity. *Anti-Cancer*

- Agents in Medicinal Chemistry*, v.6, p.367-375, 2006.
85. Takemura, O.S.; Inuma, M.; Tosa, H. et al. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. *Phytochemistry*, v.38, n.5, p. 1299-1300, 1995.
86. Thatte, U.; Bagadey, S.; Dahanukar, S. Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cell. Mol. Biol.*, v. 46, p.199-214, 2000.
87. THRALL, M. A.; Baker, D. C.; Campbell, T. W.; Denicola, D.; Frettman, M. J. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 518p.
88. van den Berg, M.E. 1993. Plantas medicinais na Amazônia 2nd Ed., Belém: CNPq/ Programa Trópico Úmido.
89. Verçosa-Junior, D.; Melo, M.M.; Dantas-Barros, A.M.; Gomes, A.M.I.; Silva Junior, P.G.I.; Lago, E.P. Quadro hematológico e peso do baço de camundongos com tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com *Agaricus blazei*. *Rev Bras Farmacogn* v.14, p.32-34, 2004.
90. Westphal FL, Lima LC, Guimarães RA, Silva de Souza RF, Couto, SB, Nakajima SR. Estudo experimental dos efeitos do óleo de resina de copaíba, extrato aquoso de cajú e polivinilpirrolidona iodado (pvpi) na pleura e parênquima pulmonar de ratos. *Rev Col Bras Cir.*, v.34, n.3, p.170-176, 2007.
91. Xia, M; Wang, D; Wang, M; Tashiro, S.I.; Onodera, S; Minami. M.; Ikejima, T. Dracorhodin Perchlorate Induces Apoptosis via Activation of Caspases and Generation of Reactive Oxygen Species. *J Pharmacol Sci.*, v. 95, p.273-283, 2004.
92. Yuki, M.; Machida, N.; Sawano, T.; Itoh, H. Investigation of serum concentrations and immunohistochemical localization of 1-acid glycoprotein in tumor dogs. *Vet. Res. Commun.* V.35, p.1-11, 2011. DOI: 10.1007/s11259-010-9445-7. 1.
93. Zorn, B.; Garcia-Pineros, A.J.; Castro, V.; Murillo, R.; Mora, G.; Merfort, I. 3 Desoxyanthonyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry*, v.56, p. 831-835, 2001.