

**Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia**

IARA ANTONIA LUSTOSA NOGUEIRA

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICA
DE *SYNADENIUM UMBELLATUM* PAX *IN VITRO* E *IN VIVO***

**Goiânia
2008**

IARA ANTONIA LUSTOSA NOGUEIRA

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICA
DE *SYNADENIUM UMBELLATUM* PAX *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marize Campos Valadares Bozinis

**Goiânia
2008**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Nogueira, Iara Antonia Lustosa.
N778a Atividade antitumoral e antiangiogênica de
Synadenium umbellatum Pax *in vitro* e *in vivo* [manuscrito] Iara
Antonia Lustosa Nogueira. –2008.
141f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares
Bozinis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de
Goiás. Faculdade de Farmácia, 2008.

BIBLIOGRAFIA: F. 113-124.

Inclui listas de figuras, tabelas e de abreviaturas e
siglas. Apêndice.

1. *Synadenium umbellatum* 2. Agentes Antineoplásicos
3. Neovascularização 4. Citotoxicidade 5. Plantas Medicinais I.
Bozinis, Marize Campos Valadares. li. Universidade Federal de
Goiás. **Faculdade de Farmácia** IV. Título.

CDU: 615.277

Dedico a toda minha família, em especial ao meu marido (Yves) e às minhas filhas (Bruna e Gabriela), amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Marize Campos Valadares Bozinis, pela orientação, ensinamentos, ajuda em todas as etapas deste trabalho e pela disponibilidade de sempre me atender.

À minha amiga Aryane Bueno Berquó Leão, pela amizade, ajuda incalculável e imprescindível e prontidão em todos os momentos.

Ao médico veterinário Marcelo Vieira pela grandiosa ajuda e apoio em várias etapas deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica, em especial a Renata Canuto e Ligiane Pereira, por toda ajuda durante os experimentos.

A todos os colegas do NEPET e do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, em especial a biomédica Polyana Benfica, pela ajuda prestada nos experimentos.

Aos colegas do Mestrado pela amizade e companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia/UFG, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

À Diretoria do Hospital das Clínicas/UFG pela compreensão e liberação nos dias que precisei me ausentar do trabalho para resolver assuntos do Mestrado.

Às farmacêuticas da Seção de Farmácia do Hospital das Clínicas/UFG pelo apoio prestado.

Aos Laboratórios FARMATEC e CEPRACO por permitir a utilização de equipamentos necessários para a realização de alguns ensaios.

E em especial à minha família, pela compreensão, ajuda e apoio em todos os momentos da minha vida.

**“Escute o conselho, aceite a correção e você
chegará a ser sábio.”**

Provérbios 19, 20.

RESUMO

Synadenium umbellatum Pax é uma planta pertencente à família Euphorbiaceae, conhecida popularmente como “cola-nota”, “milagrosa” e “cancerola”. É usado empiricamente como “remédio natural” para o combate ao câncer. Neste trabalho avaliou-se a atividade antitumoral e antiangiogênica *in vitro* e *in vivo* do extrato bruto etanólico e das frações clorofórmica e hexânica de *S. umbellatum*. Testes *in vitro* de avaliação de citotoxicidade foram realizados, usando os métodos de redução do MTT e de exclusão do azul de Tripiano, utilizando células do tumor ascítico de Ehrlich e da linhagem K-562. Ensaio *in vivo* de atividade antitumoral e antiangiogênica foram realizados usando o modelo experimental do tumor ascítico de Ehrlich, em camundongos *Swiss*. O extrato bruto etanólico foi testado nas doses 5, 10 e 25 mg/kg/dia, enquanto a fração clorofórmica foi testada nas doses 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia e a fração hexânica nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia, por 10 dias. Os resultados obtidos mostraram atividade citotóxica de forma concentração-dependente, apresentando pelo método de MTT as concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) 0,4; 0,1 e 0,08 mg/ml para o extrato bruto etanólico, fração clorofórmica e fração hexânica, respectivamente. Já no teste de exclusão do azul de Tripiano, a inibição celular foi de 75, 68 e 80% e 95, 58 e 64% para as células do tumor ascítico de Erlich e linhagem K-562, respectivamente. O extrato bruto etanólico na dose de 25 mg/kg/dia aumentou a sobrevida dos animais paralelamente com a redução do número de células tumorais, além de apresentar atividade sobre a angiogênese do tumor e reduzir os níveis de fator de crescimento endotelial vascular. As frações clorofórmica e hexânica, nos ensaios *in vivo*, não apresentaram resultados significativos. Assim, pode-se concluir nas condições deste estudo, que o *S. umbellatum* apresenta atividade antitumoral e antiangiogênica.

Palavras-chaves: *Synadenium umbellatum*; antitumoral; antiangiogênica; citotoxicidade; sobrevida; Fator de Crescimento Endotelial Vascular.

ABSTRACT

Synadenium umbellatum Pax is a vegetable belonging to Euphorbiaceae, popularly known as “cola-nota”, “milagrosa”, and “cancerola”, is empirically used as a “natural remedy” for fighting cancer. In this study we assessed the antitumoral and antiangiogenic activity *in vitro* and *in vivo* of ethanolic crude extract and hexanic and chloroformic fractions of *S. umbellatum*. Citotoxicity assessment tests *in vitro* were carried out through MTT reduction and Trypan blue exclusion methods, by using Ehrlich ascitic tumor cells and K-562 lineage. Antitumoral and antiangiogenic activity *in vivo* essays were carried out through Ehrlich ascitic tumor experimental model in Swiss mice. Ethanolic crude extract was tested in 5, 10 and 25 mg/kg/day doses, whereas chloroformic fraction was tested in 1.2; 2.3 and 5.8 mg/kg/day doses, and hexanic fraction in 0.4; 0.8; and 1.9 mg/kg/day doses, for 10 days. The results showed concentration-dependent citotoxic activity, presenting through MTT method the inhibitory concentrations of 50% (CI⁵⁰) 0.4, 0.1, and 0.08 mg/ml for ethanolic crude extract, chloroformic and hexanic fractions, respectively. And in the Trypan blue exclusion test, cell inhibition was 75%, 68%, and 80%, and 95%, 58%, and 64% for Ehrlich ascitic tumor cells and K-562 lineage, respectively. Ethanolic crude extract in the 25mg/kg/day dose increased the animals survival rate, parallely with the reduction of the amount of tumoral cells, beyond present activity on the tumor angiogenesis, and reduce vascular endothelial growth factor levels. Chloroformic and hexanic fractions, in *in vivo* essays, did not present significant outcomes. Thus, can conclude in the condition this study, that *S. umbellatum* shows antitumoral and antiangiogenic activity.

Key words: *S. umbellatum*, antitumoral, antiangiogenic, citotoxicity, survival rate, Vascular Endothelial Growth Factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia da planta <i>S. umbellatum</i> Pax, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, tirada em novembro de 2005. Tamanho: 11 x 9 cm	48
Figura 2	Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto etanólico de <i>S. umbellatum</i> e suas frações.....	50
Figura 3	Viabilidade de células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e da linhagem celular K-562 após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO ₂ , com diferentes concentrações de extrato bruto etanólico de <i>S. umbellatum</i> (0,15 – 20 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três experimentos em triplicata. A linha horizontal corresponde a CI ₅₀ .	67
Figura 4	Viabilidade de células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e da linhagem celular K-562 após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO ₂ , com diferentes concentrações da fração clorofórmica de <i>S. umbellatum</i> (0,018 – 2,32 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três experimentos em triplicata. A linha horizontal corresponde a CI ₅₀ .	68
Figura 5	Viabilidade de células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e da linhagem celular K-562 após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO ₂ , com diferentes concentrações da fração hexânica de <i>S. umbellatum</i> (0,006 – 0,76 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três experimentos em triplicata. A linha horizontal corresponde a CI ₅₀ .	69
Figura 6	Inibição celular do TAE e da linhagem K-562, avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripiano, após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO ₂ , com extrato bruto etanólico (EBE - 0,4 mg/mL), fração clorofórmica (FC - 0,1 mg/mL) e fração hexânica (FH - 0,08 mg/mL) de <i>S. umbellatum</i> . O controle (CTL) representa 100% de células viáveis. Cada ponto representa a média ± desvio padrão da triplicata de experimentos.	71
Figura 7	Efeito do extrato bruto etanólico (EBE) de <i>S. umbellatum</i> e do metotrexato (MTX) na sobrevida de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Os grupos de animais foram tratados com EBE nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2 x 10 ⁶ células/mL de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte (Curva	

	Kaplan – Meier, Log-rang). $p < 0,001$ em relação ao grupo TAE.....	74
Figura 8	Efeito da fração clorofórmica (FC) de <i>S. umbellatum</i> e do metotrexato (MTX) na sobrevida de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Os grupos de animais foram tratados com FC nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2×10^6 células/mL de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte (Curva Kaplan – Meier, Log-rank). $p > 0,05$ em relação ao grupo TAE.....	75
Figura 9	Efeito da fração hexânica (FH) de <i>S. umbellatum</i> e do metotrexato (MTX) na sobrevida de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Os grupos de animais foram tratados com FH nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2×10^6 células/mL de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte (Curva Kaplan – Meier, Log-rang). $p > 0,05$ em relação ao grupo TAE.....	76
Figura 10	Avaliação da inibição tumoral em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados por via IP, durante 10 dias, com extrato bruto etanólico de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores acima representam a média e o desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.....	79
Figura 11	Avaliação da inibição tumoral em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), tratados por via IP, durante 10 dias, com a fração clorofórmica de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores acima representam a média e o desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.....	80
Figura 12	Avaliação da inibição tumoral em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), tratados por via IP, durante 10 dias, com a fração hexânica de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores acima representam a média e o desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.....	81
Figura 13	Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) dos animais portadores de tumor ascítico de Erlich (TAE), tratados com extrato bruto etanólico (EBE) de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia; tratados com metotrexato (MTX) 1,5	

mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e de animais sem tumor (CTL). Os valores acima representam a média $\pm$ desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao TAE; ** $p < 0,05$ em relação ao MTX. 84

Figura 14 Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) dos animais portadores de tumor ascítico de Erlich (TAE), tratados com a fração clorofórmica (FC) de *S. umbellatum* nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia; tratados com metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e de animais sem tumor (CTL). Os valores acima representam a média $\pm$ desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao TAE; ** $p < 0,05$ em relação ao MTX..... 85

Figura 15 Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) dos animais portadores de tumor ascítico de Erlich (TAE), tratados com a fração hexânica (FH) de *S. umbellatum* nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia; tratados com metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e de animais sem tumor (CTL). Os valores acima representam a média $\pm$ desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao TAE; ** $p < 0,05$ em relação ao MTX. 86

Figura 16 Fotografia do padrão vascular dos animais transplantados com tumor ascítico de Erlich (TAE) tratados com extrato bruto etanólico (EBE) de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia; de animais tratados com metotrexato (MTX) na dose 1,5 mg/kg/dia, via IP, por 10 dias, de animais somente portadores de tumor (TAE) e de animais sem tumor (CTL)..... 88

Figura 17 Fotografia do padrão vascular dos animais transplantados com tumor ascítico de Erlich (TAE) tratados com a fração clorofórmica (FC) de *S. umbellatum* nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia; de animais tratados com metotrexato (MTX) na dose de 1,5 mg/kg/dia, via IP, por 10 dias; de animais somente portadores de tumor (TAE) e de animais sem tumor (CTL)..... 89

Figura 18 Fotografia do padrão vascular dos animais transplantados com tumor ascítico de Erlich (TAE) tratados com a fração hexânica (FH) de *S. umbellatum* nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia; e de animais tratados com metotrexato (MTX) na dose de 1,5 mg/kg/dia, via IP, por 10 dias, de animais somente portadores de tumor (TAE) e de animais sem tumor (CTL)..... 90

Figura 19 Níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - pg/mL), determinado pelo método Elisa, no líquido ascítico de animais portadores de tumor ascítico de Erlich (TAE), tratados via IP, por 10 dias, com extrato bruto etanólico (EBE) de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia e de animais não tratados (TAE). Os valores acima representam a média $\pm$ desvio

padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. *
p<0,05 em relação ao grupo não tratado (TAE)..... 92

Figura 20 Níveis de prostaglandina E₂ (PG E₂ - pg/mL) determinado pelo método Elisa, no líquido ascítico de animais portadores de tumor ascítico de Erlich (TAE), tratados via IP, por 10 dias, com extrato bruto etanólico (EBE) de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia e de animais não tratados (TAE). Os valores acima representam a média ± desvio padrão de cada respectivo grupo.... 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Viabilidade de células do TAE e da linhagem K-562 (% em relação ao controle), após 24 e 48 horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO ₂ , com diferentes concentrações de EBE de <i>S. umbellatum</i> (0,15 – 20 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada valor representa a média ± desvio padrão de três experimentos, em triplicata.....	126
Tabela 2	Viabilidade de células do TAE e da linhagem K-562 (% em relação ao controle) após 24 e 48 horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO ₂ , com diferentes concentrações de FC de <i>S. umbellatum</i> (0,018 – 2,32 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada valor representa a média ± desvio padrão de três experimentos, em triplicata.....	127
Tabela 3	Viabilidade de células do TAE e da linhagem K-562 (% em relação ao controle), após 24 e 48 horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO ₂ , com diferentes concentrações de FH de <i>S. umbellatum</i> (0,006 – 0,76 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada valor representa a média ± desvio padrão de três experimentos, em triplicata.....	128
Tabela 4	Inibição celular do TAE e da linhagem leucêmica K-562 (% em relação ao controle), avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripiano, após 24 e 48 horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO ₂ , com EBE (0,4 mg/mL), FC (0,1 mg/mL) e FH (0,08 mg/mL) de <i>S. umbellatum</i> em concentrações correspondentes as respectivas CI ₅₀ encontrada no método de redução de MTT. Cada valor representa a média ± desvio padrão de três experimentos, em triplicata.....	129
Tabela 5	Efeito do EBE de <i>S. umbellatum</i> e do metotrexato (MTX) na sobrevivência de animais portadores de TAE. Os grupos de animais foram tratados com EBE nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2 x 10 ⁶ de células de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte.	130

Tabela 6	Efeito da FC de <i>S. umbellatum</i> e do metotrexato (MTX) na sobrevida de animais portadores TAE. Os grupos de animais foram tratados com FC nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2×10^6 de células de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte.....	132
Tabela 7	Efeito da FH de <i>S. umbellatum</i> e do metotrexato (MTX) na sobrevida de animais portadores de TAE. Os grupos de animais foram tratados com FH nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2×10^6 de células de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte	133
Tabela 8	Avaliação da inibição tumoral em animais, inoculados com TAE e tratados por via IP, durante 10 dias, com EBE de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores representam o número de células tumorais multiplicado por 10^6 /mL e o percentual em relação a média do grupo controle (TAE). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE	134
Tabela 9	Avaliação da inibição tumoral em animais, inoculados com TAE e tratados por via IP, durante 10 dias, com a FC de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores representam o número de células tumorais multiplicado por 10^6 /mL e o percentual em relação a média do grupo controle (TAE). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE	135
Tabela 10	Avaliação da inibição tumoral em camundongos Swiss, inoculados com TAE e tratados por via IP, durante 10 dias, com a FH de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores representam o número de células tumorais multiplicado por 10^6 /mL e o percentual em relação a média do grupo controle (TAE). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE	136
Tabela 11	Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) dos animais portadores de TAE e tratados, via IP, por 10 dias, com EBE de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia, metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e animais sem tumor (CTL). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE	137

Tabela 12	Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) de animais portadores de TAE e tratados, via IP, por 10 dias com FC de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e animais sem tumor (CTL). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE	138
Tabela 13	Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) de animais portadores de TAE e tratados, via IP, por 10 dias com FH de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e animais sem tumor (CTL). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE	139
Tabela 14	Níveis de VEGF (pg/mL), determinado pelo método de Elisa, no líquido ascítico de animais portadores de TAE e tratados, via IP, por 10 dias, com EBE de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia e de animais não tratados (TAE). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo não tratado (TAE)	140
Tabela 15	Níveis de PG E ₂ (pg/mL), determinado pelo método de Elisa, no líquido ascítico de animais portadores de TAE e tratados, via IP, por 10 dias, com EBE de <i>S. umbellatum</i> nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg e de animais não tratados (TAE). ANOVA, teste de Tukey.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
Anti-VEGF	Anti - Fator de crescimento vascular endotelial
CEM	Células Mieloblásticas Esqueléticas
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
COX	Cicloxygenase
COX-2	Cicloxygenase-2
CTL	Controle
CTX	Ciclofosfamida
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Do	Dia zero
EBE	Extrato bruto etanólico
EDTA	Etilenodiaminotetracético
Elisa	Ensaio imunoenzimático
FC	Fração clorofórmica
FF	Faculdade de Farmácia
FGF	Fator estimulador de fibroblastos
FM	Fração metanol-água
FR	Fração hexânica
HER 2	Fator de crescimento epidermal
IFN- γ	Interferon gama
IL-2	Interleucina-2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Intraperitoneal
IQUEGO	Indústria Química do Estado de Goiás
K-562	Célula leucêmica mielóide crônica
LTFC	Laboratório de Toxicologia e Farmacologia Celular
m/v	Massa/volume
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de [3-(4,5 - dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
MTX	Metrotexato

AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
ONU	Organização das Nações Unidas
P.A.	Padrão analítico
PG E ₂	Prostaglandina E ₂
PLGF	Fator de crescimento placentário
RPMI	Meio de cultura RPMI
SBF	Soro bovino fetal
SF 0,9%	Solução fisiológica a 0,9%
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
Th 1	Linfócitos T help 1
Th 2	Linfócitos T help 2
TGF – α	Fator de crescimento transformador alfa
TGF – β	Fator de crescimento transformador beta
UFG	Universidade Federal de Goiás
VEGF - A	Fator de crescimento vascular endotelial tipo A
VEGF - B	Fator de crescimento vascular endotelial tipo B
VEGF - C	Fator de crescimento vascular endotelial tipo C
VEGF - D	Fator de crescimento vascular endotelial tipo D
VEGF - E	Fator de crescimento vascular endotelial tipo E
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR - 1	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial tipo 1
VEGFR - 2	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial tipo 2
VEGFR - 3	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial tipo 3

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 <i>Synadenium umbellatum</i> Pax.....	26
1.2 Câncer.....	30
1.3 Angiogênese, Fator de Crescimento Endotelial Vascular e Prostaglandina E2 ..	36
1.4 Tumor Ascítico de Ehrlich.....	41
2 OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo Geral	46
2.2 Objetivos Específicos	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Material Botânico.....	48
3.1.1 Coleta e identificação de <i>S. umbellatum</i>	48
3.1.2 Preparação do extrato e fracionamento	49
3.1.3 Preparo da solução do extrato de <i>S. umbellatum</i> e frações usadas nos ensaios	51
3.2 Reagentes e Medicamentos.....	51
3.3 Animais.....	52
3.3.1 Aclimação dos Animais	52
3.3.2 Modelo Experimental – Tumor Ascítico de Ehrlich	53
3.3.3 Tratamento dos animais	54
3.4 Células Tumoraes	55
3.5 Ensaios <i>in vitro</i>	56
3.5.1 Avaliação de citotoxicidade de <i>S. umbellatum</i> pelo método de redução do tetrazolium (MTT)	56
3.5.2 Avaliação de citotoxicidade de <i>S. umbellatum</i> pelo método de exclusão do azul de Tripiano	57

3.6 Ensaios <i>in vivo</i>	
3.6.1 Avaliação da sobrevida dos animais tratados com EBE, FC e FH de <i>S. umbellatum</i>	58
3.6.2 Avaliação da inibição do crescimento tumoral após tratamento com o EBE, FC e FH de <i>S. umbellatum</i>	58
3.6.3 Avaliação da hemoglobina sérica e o hematócrito dos animais portadores de TAE após tratamento com EBE, FC e FH de <i>S. umbellatum</i>	59
3.6.4 Avaliação da angiogênese nos animais portadores de TAE após tratamento com EBE, FC e FH de <i>S. umbellatum</i>	60
3.6.5 Dosagem do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)	60
3.6.6 Dosagem de Prostaglandina E ₂	61
3.7 Análise Estatística	62
4 RESULTADOS	63
4.1 Material botânico	64
4.2 Ensaios <i>in vitro</i>	64
4.2.1 Avaliação de citotoxicidade de <i>S. umbellatum</i> pelo método de redução do tetrazolium (MTT)	64
4.2.2 Avaliação de citotoxicidade de <i>S. umbellatum</i> pelo método de exclusão do azul de Tripiano	70
4.3 Ensaios <i>in vivo</i>	72
4.3.1 Avaliação da sobrevida dos animais tratados com o EBE, a FC e a FH de <i>S. umbellatum</i>	72
4.3.2 Avaliação da inibição do crescimento tumoral após tratamento com o EBE, a FC e a FH de <i>S. umbellatum</i>	77
4.3.3 Avaliação da hemoglobina sérica e do hematócrito dos animais portadores de TAE após tratamento com EBE, FC e FH de <i>S. umbellatum</i>	82
4.3.4 Dosagem do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)	91
4.3.5 Dosagem de Prostaglandina E ₂	93
5 DISCUSSÃO	95
6 CONCLUSÃO.....	108
7 PERSPECTIVA	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
APÊNDICE	122

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde os primórdios como fonte de alimento, vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa, ataque, na produção de meios de transporte, e como meio restaurador da saúde. Nos dias atuais, eles representam uma das alternativas entre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e em grande parte possível de ser controlada pelo ser humano (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

A utilização de plantas com fins medicinais, tanto para o tratamento de doenças, como para sua prevenção, é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos, principalmente, por plantas e extratos vegetais, estes constituíam a maioria dos medicamentos que naquela época pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é bem difundido, principalmente na zona rural, como fonte primária para o tratamento da maioria das doenças (NAPOLITANO et al., 2005).

No início do século passado, esses recursos começaram a ser estudados cientificamente e se estabeleceu paulatinamente a tendência de utilização das substâncias ativas isoladas – os princípios ativos, tais como, o uso de quinina em lugar do extrato de quina, da digoxina e digitoxina em substituição ao extrato de digitalis, gerando vantagens relativas à sua utilização, como reprodução dos efeitos, composição constante, maior eficácia e segurança. Porém, a toxicidade destas

substâncias passou a ser uma preocupação adicional. Alguns protótipos (morfina, efedrina, atropina, digoxina, etc.), foram desenvolvidos, representando uma grande possibilidade de intervenção terapêutica (BARREIRO; FRAGA, 2004). Estes compostos tornaram a terapêutica mais rica e continuam ainda sendo muito útil no tratamento das doenças (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

A idéia principal na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir os medicamentos alopáticos, mas aumentar as opções terapêuticas, oferecendo medicamentos equivalentes, talvez de menor custo, com espectro de ação melhorado e aumentando e/ou complementando o arsenal terapêutico já existente, e, possibilitando assim, o tratamento e a cura de diversas doenças (LAPA et al., 2003). Por sua vez, no século XX, aconteceram avanços extraordinários na descoberta de drogas dotadas de propriedades antineoplásicas, como o uso da mostarda nitrogenada, os alcalóides da vinca, podofilotoxinas, paclitaxel, etc. (YOUNES; VARELLA; SUFFREDINI, 2000). A partir dos anos 50, a identificação e o desenvolvimento de novos compostos para quimioterapia anticâncer foram dirigidos, principalmente por programas de triagem de plantas, o que fez com que novos agentes fossem identificados, como o paclitaxel (*Taxus brevifolia* Nutt.) e o alcalóide camptothecina (*Camptotheca acuminata* Decne) (VOSS; EYOL; BERGER, 2006).

Nesta perspectiva, as descobertas de maior impacto deram origem a um número significativo de substâncias ativas, que foram testadas e estão sendo usadas na clínica, como por exemplo, a vincristina, a vimblastina, vinorelbina - derivados de *Catharanthus rosea* (L.) G. Don, etoposídeo, teniposídeo - isolados de *Podophylun peltatum* L.; irinotecano, topotecano - derivados de *Camptotheca acuminata*; paclitaxel e docetaxel – originados de *Taxus brevifolia* (MANS; ROCHA;

SCHWARTSMANN, 2000; SCHWARTSMANN et al., 2002 ; SRIVASTAVA et al., 2005; VOSS; EYOL; BERGER, 2006).

Tais descobertas confirmam a importância da pesquisa científica, através de estudos químicos, farmacológicos, toxicológicos de plantas, viabilizando novos achados com aplicação terapêutica nas diversas áreas da medicina. Um grande número de agentes anticâncer, provenientes de plantas e outras fontes naturais foram descobertos, mas o desenvolvimento de fármacos seguros, econômicos e com ação sítio específica, é ainda, um grande desafio (SRIVASTAVA et al., 2005).

Os produtos naturais provavelmente representam à fonte mais abundante e que oferecem maior possibilidade de encontrar substâncias com estrutura, potência, eficiência, mecanismo de ação diferente, daquelas, até hoje, estudadas e descritas (SCHWARTSMANN et al., 2002).

A importância da pesquisa de produtos naturais é confirmada com os números, que mostram que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual, foram desenvolvidos de fontes naturais, sendo 25% destes, de plantas. Somente no período de 1983-1994, das 520 novas drogas aprovadas pelo Food and Drug Administration, 220 (39%) foram desenvolvidas a partir de produtos naturais. Além disso, 1/3 dos medicamentos mais prescritos e mais vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003). No caso dos fármacos antineoplásicos e antibióticos, mais que 60% desses fármacos são provenientes de fontes naturais (SCHWARTSMANN et al., 2002).

A incorporação desses novos agentes antitumorais à terapêutica foi apontada por muitos pesquisadores como o argumento da potencialidade que as plantas, os animais e os microorganismos apresentam (LAPA et al., 2003).

No entanto, apesar da grande expansão da seleção medicamentosa anticâncer, vários tumores, principalmente os sólidos, ainda não dispõem de tratamento quimioterápico adequado, e muitos já apresentam resistência ao arsenal terapêutico existente (YOUNES; VARELLA; SUFFREDINI, 2000).

Devido aos produtos naturais, foi possível também, entender os fenômenos complexos relacionados à biologia celular e molecular e a eletrofisiologia, permitindo a identificação e a clonagem de certas enzimas, receptores, canais iônicos e outras estruturas biológicas, possibilitando a indústria farmacêutica, meios de desenhar novas drogas, mais seletivas e mais eficazes contra as doenças de maior complexidade (CALIXTO, 2000).

De acordo com a Organização das Nações Unidas, na década de 90, 65-80% da população de países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Acredita-se que este fato, deva-se aos muitos obstáculos que as populações carentes têm que enfrentar para ter acesso à medicina convencional alopática, que vão desde o difícil acesso, aos atendimentos nas unidades hospitalares, bem como a realização de exames e a falta de medicamentos gratuitos, associados à facilidade de obtenção e a tradição do uso de plantas medicinais.

É do conhecimento de todos que a maioria da população de baixa renda recorre às plantas medicinais como o único alívio para seus males. É nesse contexto social que as plantas medicinais e fitoterápicas adquirem importância como agentes terapêuticos e, por isso, devem ser estudados seguindo os mais modernos métodos de análises, de forma a oferecer à população informações precisas a cerca da

indicação correta, do uso racional e dos possíveis efeitos tóxicos, fornecendo assim, opções mais acessíveis e mais seguras ao combate de suas doenças.

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas atividades farmacológicas, por usuários ou comerciantes, e estas, são encontradas livremente nas lojas de produtos naturais, feiras, farmácias; a grande maioria sem o menor controle de qualidade e sequer sanitário (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Este quadro é preocupante, visto que as plantas, produtos naturais, podem ser tóxicas, apresentar efeitos adversos, tanto quanto os medicamentos alopáticos.

A toxidade das plantas medicinais é um problema sério de saúde pública, já demonstrado por vários casos de intoxicação divulgados na imprensa, e também, de forma científica (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Devido ao perigo que as plantas possam apresentar, por serem muitas vezes, o protótipo de substâncias potencialmente terapêuticas, acredita-se que os pesquisadores, a imprensa e as instituições de ensino devam pesquisar e divulgar os riscos que a população está exposta quando fazem uso das plantas medicinais ou fitoterápicos, sem o conhecimento prévio da sua utilização.

1.1 *Synadenium umbellatum* Pax

A espécie botânica *Synadenium umbellatum* Pax, pertence à ordem Geraniales e à família Euphorbiaceae. Esta família compreende cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies. Os maiores centros de dispersão encontram-se nos trópicos, continente americano e africano (ORTÊNCIO, 1997). São plantas de hábito variado, existindo ervas, subarbustos, árvores, e também,

trepadeiras, com folhas alternadas inteiras ou partidas, em geral com estípulas, latescentes ou não, o látex obtido das folhas ou do caule, pode ser incolor ou leitoso com grãos de amido em forma de fêmur muito característico e apresenta um pH ácido (JOLY, 1977). As Euforbiáceas produzem albuminóides tóxicos, sendo a ricina o mais conhecido (QUER, 1962).

Dentro da família Euphorbiaceae existem muitas plantas com elevada toxicidade, dentre as espécies botânicas mais relatadas como responsáveis por ocorrências de intoxicações. Cinco delas pertencem a esta família, sendo elas a *Euphorbia milii* Des Moul (coroa de cristo, cristo gigante); *Euphorbia tirucalli* L. (graveto do cão, figueira do diabo, dedo do diabo); *Jatropha curcas* L. (Pinhão de purga, pinhão paraguaio, pinhão bravo, purgão de cavalo); *Ricinus communis* L. (carrapateira, rícino, mamoeira, palma de cristo, carrapato); *Manihot utilissima* Pohl (mandioca amarga, mandioca branca) (BRASIL, 2006).

O gênero *Euphorbia*, que dá nome à família, é atípico, marcado por uma inflorescência de flores reduzidas, rodeadas por brácteas e glândulas. A coroa-de-cristo é um representante deste gênero muito cultivado como planta ornamental (BRASIL; 2006).

O uso na medicina popular de plantas da família Euphorbiaceae no tratamento de câncer tem se difundido mundialmente. Os compostos com atividade farmacológica geralmente são isolados de folhas e do látex da maioria das espécies (VALADARES et al., 2006a).

A *Euphorbia nivulia* Buch-Ham mostrou atividade citotóxica sobre Colo 205 (células de adenocarcinoma), mt2 e células da linhagem Mieloblásticas Esqueléticas (CEM); a *Euphorbia tirucalli* apresentou efeito antitumoral em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e tratados com o extrato da planta

(VALADARES et al., 2006b). Por outro lado, trabalhos na literatura atribuem ao látex da *E. tirucalli* L. efeito carcinogênico e/ou modulador de carcinogênese (MACNEIL et al., 2003; VALADARES et al., 2006b).

Também pertencente a esta família, o *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. que apresentou ação sinérgica com ciclofosfamida (CTX), reduzindo tumor sólido em animais, além dos efeitos tóxicos da CTX, agindo, desta forma como um quimioprotetor. Esta planta, também apresentou atividade antiviral e radioprotetora (KUMAR; KUTTAN, 2005).

O *S. umbellatum* é conhecido popularmente como “cola-nota”, “avelós”, “milagrosa”, “cancerola”, sendo o látex empiricamente e amplamente utilizado na forma de solução aquosa para o tratamento de câncer como segue:

Colocar 18 gotas do látex em 1L de água e conservar na geladeira. Tomar pela manhã, à tarde e à noite um cálice de licor ou uma xicarazinha de café. Ou substituir a água pela solução bebendo várias vezes ao dia. Usar sempre para cura e prevenção (ORTÊNCIO, 1997).

No Brasil, de acordo com Ortêncio (1997), a *S. umbellatum* tem sido utilizada, pela população, para o tratamento de várias enfermidades, tais como, alergia, câncer, diabetes, gripe, hemorragias internas, úlcera nervosa, cólicas menstruais, dores no corpo, etc. Na literatura, existem relatos que outras espécies de *Synadenium sp*, têm sido extremamente usada na medicina popular para o tratamento de um grande número de patologias, incluindo desordens inflamatórias, sem nenhuma evidência científica (ROGERIO et al., 2007).

Da espécie *Synadenium grantii* Hook f., foi isolado e purificado uma lecitina do látex, com atividade de hemaglutinação (PREMARATNA; SHDAKSHARASWAMY; NANJAPPA, 1984a); algumas propriedades biológicas na lecitina também foram detectadas, dentre elas, a supressão do crescimento tumoral do fibrosarcoma e inibição da síntese de proteína em células de sarcoma ascites

Yoshida (PREMARATNA; SHDAKSHARASWAMY; NANJAPPA, 1984b); deste vegetal, também foi isolado o composto éster de 4-deoxiforbol, que é um produto irritante à pele (KINGHORN, 1980) e compostos triterpenóides, como eufol, tirucalol e euforbol (UZABAKILIHO; LARGEAU; CASADEVALL, 1987). Ésteres diterpeno tipo tigliano, também estão presentes no látex de *Synadenium grantii* e representa um aspecto quimiotaxonômico das Euphorbiaceas (BAGAVATHI; SORG e HECKER; 1988). Esta espécie é rica em enzimas proteolíticas, Menon et al. (2002) isolaram e caracterizaram duas serino-proteases do látex de *S. grantii*, e também, uma glicoproteína com atividade fibrinolítica humana, a qual pode ser de importância no processo da homeostasia (RAJESH et al., 2006).

A *Synadenium cupulare* (Boiss.) L.C. Wheeler, em estudo *in vitro*, apresentou inibição da síntese de prostaglandina (JAGER; HUTCHINGS; STADEN, 1996), justificando o seu uso como antiinflamatória.

Do látex da *Synadenium carinatum* Boiss. também foi isolado e caracterizado lecitina ligada a D-galactose (SOUZA et al., 2005), e estudos sugerem que esta lecitina é a responsável, em parte, pelos seus efeitos antiinflamatórios e podendo ser útil no tratamento de doenças inflamatórias alérgicas. Além disso, esta planta também demonstrou atividade imunomoduladora (ROGERIO et al., 2007).

Na literatura não se encontrou relatos sobre estudos farmacognósticos, farmacológicos e toxicológicos da *S. umbellatum*. Estudo realizado por Oliveira (2007) demonstrou que o extrato etanólico de *S. umbellatum* possui atividade antinociceptiva e antiinflamatória, além de uma possível ação depressora do sistema nervoso central.

Estudos preliminares, realizados no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás

(LFTC – FF/UFG), em um projeto de iniciação científica com o *S. umbellatum* demonstraram um potencial efeito antitumoral de forma dose-dependente, em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados com extrato bruto das folhas desta planta. Estes resultados sugeriram a necessidade de ensaios aprofundados e apresentou subsídio para a escolha das doses e concentrações, da via e do tempo de administração do extrato e frações, usados nos ensaios.

1.2 Câncer

O câncer é uma patologia caracterizada pela multiplicação e propagação descontroladas no corpo de formas anormais das próprias células corporais (RANG et al., 2003). Estas células proliferam excessivamente e formam tumores locais que podem comprimir ou invadir estruturas adjacentes normais (SALMON; SARTORELLI, 1998).

O termo câncer é usado genericamente para mais de cem diferentes doenças, incluindo tumores malignos de diferentes sítios, tais como próstata, estômago, cólon, reto, pulmão, leucemias, sarcoma ósseo, doença de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

O câncer constitui uma das doenças crônico-degenerativas de maior incidência na população ocidental. É a segunda maior causa de morte, após as doenças cardiovasculares (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; REBELLO, 2005; SRIVASTAVA et al., 2005).

O câncer causa 12% de todas as mortes mundiais. E em aproximadamente 20 anos o número de doenças por câncer deverá aumentar de 6 milhões para 10 milhões. Atualmente, 20 milhões de pessoas vivem com o câncer e

até 2020, provavelmente, haverá mais que 30 milhões (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005; SCHWARTSMANN et al., 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A estimativa de incidência de câncer para 2008, no Brasil, revela que aproximadamente 470 mil casos novos da doença deverão ocorrer no país em 2008 e 2009, para o estado de Goiás, a estimativa é de aproximadamente 11.700 casos novos de neoplasias. Os tipos mais incidentes, exceção de pele não melanoma, serão de próstata e pulmão no sexo masculino; mama e colo de útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil de magnitude observada no mundo e na estimativa anterior (BRASIL, 2007).

O câncer é uma doença que acomete principalmente os grupos etários mais avançados, e com o progresso da ciência médica e melhora na saúde pública, além do aumento da expectativa de vida da população. Isto implica em uma consequência direta na incidência do câncer em todo o mundo (RANG et al., 2003; SCHWARTSMANN et al., 2002).

A incidência, a distribuição e o comportamento dos diversos tipos de câncer estão relacionados a vários fatores, como sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição aos carcinógenos ambientais (REBELLO, 2005).

Várias evidências demonstram a influência de fatores externos ambientais como causas principais no desenvolvimento do câncer, como exemplo, muitos cânceres de pulmão ocorrem devido ao uso do tabaco. Altas doses de radiação e substâncias químicas como benzeno, óxido de etileno podem causar leucemias (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). O consumo de álcool predispõe ao câncer do trato digestivo, do trato respiratório e a cirrose alcoólica podendo levar ao câncer hepático (REBELLO, 2005).

Os fatores geográficos e ambientais apresentam, notáveis diferenças nas incidências e nas taxas de mortalidade de formas específicas de câncer ao redor do mundo são encontrados (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; REBELLO, 2005).

As causas não estão bem definidas, parecem ser tão diversas quanto o próprio câncer. A carcinogênese, provavelmente, representa um processo multifatorial. Em teoria, o câncer ocorre em pacientes com predisposição genética herdada ou induzida que foi exposto a co-fatores secundários (CARIGNAN, 1995).

Assim sendo, como não existe uma única causa para o câncer, também não existe um mecanismo de ação único dos cancerígenos. Como documentado em estudos *in vitro* e *in vivo*, o câncer é o resultado final de um processo complexo que se desenvolve em múltiplos estágios. Em cada uma dessas fases, ocorrem alterações genéticas e epigenéticas em células suscetíveis, as quais acabam adquirindo crescimento seletivo e explosão clonal (BRASILEIRO FILHO, 2000).

As alterações epigenéticas têm sido indicadas como sendo fenômenos emergentes freqüentemente observados no câncer (HUANG, 2004).

Desta forma, os números sobre o câncer mostram a importância da doença, caracterizando como um problema de saúde pública emergencial em todo o mundo, ficando clara a necessidade de ações preventivas e de implementações de novas formas de tratamento (BRASIL, 2007; GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005).

Por outro lado, hoje, uma maior proporção de cânceres está sendo curada ou detida na sua evolução em comparação com o que ocorria antes, em parte, graças ao novo arsenal terapêutico existente (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Apesar de existir tratamentos bem promissores, com índices de cura em certos casos, favorável, e um declínio no número de mortes, ainda assim, é uma

doença preocupante, pois um grande número de tipos de câncer (principalmente os tumores sólidos) responde pouco aos agentes quimioterápicos existentes e o tratamento curativo utilizando qualquer uma das modalidades terapêuticas ou mesmo a combinação delas, é extremamente difícil (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

Nos últimos anos, houve um grandioso avanço do conhecimento sobre a etiologia e patogênese das neoplasias, e a constatação de que fatores genéticos e componentes ambientais como vírus, agentes físicos, substâncias químicas, tem um papel importante no aparecimento de vários tumores humanos e de animais (BRASILEIRO FILHO, 2000).

O avanço da genética e da biologia molecular, cujos conhecimentos acerca da expressão e ações de muitos genes, possibilitaram uma melhor compreensão sobre a origem e o desenvolvimento das neoplasias (BRASILEIRO FILHO, 2000).

Numerosos genes são importantes no estudo dos tumores, sendo que duas classes deles representam um maior interesse, por serem os alvos das principais alterações genéticas. São eles: os oncogenes – que favorecem o crescimento celular descontrolado, os genes supressores de tumor, os genes de reparo do DNA e os genes que controlam a apoptose que tendem a manter as células dentro dos limites fisiológicos de crescimento e diferenciação. As neoplasias acontecem quando ocorrem alterações qualitativas ou quantitativas desses genes (BRASILEIRO FILHO, 2000; LEWIN, 2001).

As células cancerosas exibem quatro características que as distinguem das células normais, que são: a proliferação descontrolada, a perda da função, em decorrência da falta de capacidade de sofrer diferenciação; poder de invasão e capacidade de sofrer metástases (LEWIN, 2001).

A proliferação descontrolada ocorre por causa de alterações nos fatores de crescimento e/ou receptores; nas vias de sinalizações intracelulares, principalmente as que controlam o ciclo celular e a apoptose; na expressão da telomerase e na angiogênese relacionada com o tumor (RANG et al., 2003).

O processo de carcinogênese, em geral, ocorre lentamente, podendo levar vários anos para uma célula cancerosa originar um tumor detectável (ALMEIDA et al., 2005).

A patogênese da neoplasia consiste em pelo menos três fases definidas, começando com a iniciação, seguida de um estágio intermediário de promoção, do qual evolui para a fase de progressão (KLAASEN; WATKINS III, 2001):

- Estágio de iniciação – as células sofrem o efeito de um agente carcinogênico que provoca modificações em alguns de seus genes. Nesta fase, as células encontram-se geneticamente alteradas, mas não é possível detectar um tumor clinicamente.
- Estágio de promoção – as células geneticamente alteradas sofrem a ação dos agentes oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna de forma lenta e gradual.
- Estágio de progressão – caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer já está instalado, evoluindo para sinais clínicos da doença.

Existem três abordagens principais para o tratamento do câncer estabelecido - a excisão cirúrgica, a radioterapia e quimioterapia – e o papel de cada uma delas dependerá do tipo de tumor e do estágio de desenvolvimento (RANG et al, 2003).

Hoje, os fármacos são usados mais precocemente no tratamento dos pacientes, na maioria das vezes, em combinação com a radioterapia ou cirurgia (CALABRESI; CHABNER, 2003).

Nos casos mais favoráveis, com a quimioterapia atual a expectativa e qualidade de vida aumentaram, tendo em diversos casos aproximadamente 66% dos pacientes livres do câncer por mais de 10 anos (ALMEIDA et al., 2005).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células cancerosas, protegendo as normais (SALMON; SARTORELLI, 1998). A maioria dos agentes antineoplásicos age de forma inespecífica, lesam tanto as células doentes quanto as sadias, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica, em parte, os efeitos colaterais da quimioterapia, como: náusea, vômitos, queda de cabelo e infecções (ALMEIDA et al., 2005).

Muitos esforços estão sendo dirigidos no sentido de desenvolver fármacos antineoplásicos utilizando métodos empíricos e planejamento racional de novos compostos; os recentes progressos incluem a síntese de peptídeos e proteínas com técnicas de DNA recombinante e anticorpos monoclonais (CALABRESI; CHABNER, 2003; RANG et al. 2003).

Desta maneira, o tratamento com combinações de fármacos aumenta a citotoxicidade e diminui a possibilidade de desenvolvimento de resistência a agentes individuais, tornando-os mais eficazes. Os fármacos devem ser utilizados em doses o mais próximo de suas doses máximas individuais e administrados com maior frequência para desestimular o novo crescimento tumoral e maximizar a intensidade da dose (CALABRESI; CHABNER, 2003).

1.3 Angiogênese, Fator de Crescimento Endotelial Vascular e Prostaglandina

E₂

A angiogênese consiste na produção de novos vasos a partir de artérias e veias pré-existentes sendo considerada de dois tipos, normal ou fisiológica e patológica. A distinção entre elas é baseada nos diferentes tipos de vasos que cada uma delas induz (BLEBEA et al., 2002; DVORAK, 2005; HAGEDORN; BIKFALVI, 2000; PINEDO; SLAMON, 2000; RIBATTI; VACCA; PRESTA, 2002; SHEELA; RAMAKRISHANA; SALIMATH, 2006; WAGNER et al., 2007).

A angiogênese fisiológica é essencial em muitas condições como no desenvolvimento embrionário, na ovulação e na reparação de feridas enquanto que a patológica acontece em condições como: artrite, retinopatia diabética e tumores (DVORAK, 2005; HAGEDORN; BIKFALVI, 2000; RIBATTI; VACCA; PRESTA, 2002; RIBATTI, 2004; WAGNER et al., 2007).

Na angiogênese patológica os vasos formados são anormais tanto em estrutura, quanto em função. Eles apresentam formato irregular, diâmetro dilatado e desigual, sinuosos, fenestrados e propensos à hemorragia, alinhados irregularmente com as células endoteliais e nem sempre se conectam aos outros vasos (DVORAK, 2005; WAGNER et al., 2007).

A angiogênese é essencial à progressão de tumores sólidos, e também, nas neoplasias hematológicas (LUO et al. 1998; PRADEEP; SUNILA; KUTTAN, 2005).

Vários fatores foram identificados, capazes de promover ou inibir a angiogênese. Entre os principais reguladores pró-angiogênicos estão os fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (PINEDO e

SLAMON, 2000), o fator estimulador de fibroblastos (FGF) e os fatores transformadores alfa e beta (TGF- α e TGF- β). Já nos fatores anti-angiogênicos estão as angiostatinas, as endotastinas, os interferons α , β , γ , fator plaquetário 4 e angiopoietina 2, dentre outros (DVORAK, 2005; HAYES; LI; LIPPMAN, 1999; HAGEDORN; BIKFALVI, 2000; RIBATTI, 2004; WAGNER et al., 2007).

Como a angiogênese é regulada por um número de moléculas pró e anti-angiogênica, o tumor induz a proliferação vascular devido à alteração do balanço desses reguladores positivos e negativos, ou seja, ocorre um desequilíbrio na secreção de fatores pró-angiogênicos. Esta polarização da angiogênese em favor do desenvolvimento tumoral, que dota o tumor com a habilidade para recrutar vasos sanguíneos dos tecidos vizinhos, sendo necessária ao crescimento do tumor, mas pode ser restritiva (BYRNE; HAYES-BOUCHIER; HARMEY, 2005; HAYES; LI; LIPPMAN, 1999; KESHET; BEM-SASSON, 1999; RIBATTI, 2004).

A angiogênese é um processo complexo e dinâmico que envolve quatro etapas principais: lise da membrana basal que circunda o vaso; migração de células endoteliais circulantes para o sítio de formação do vaso, onde proliferam e formam uma espécie de broto; nova proliferação e diferenciação das células endoteliais com conseqüente crescimento e formação da luz do novo vaso e secreção de fatores de crescimento pelas células endoteliais que atraem células de suporte e formam a membrana basal (GERWINS et al., 2000).

Portanto, estudos têm mostrado o papel da angiogênese no crescimento do tumor, na progressão (MAITY; CHAKRABORTY; BHATTACHARYA, 1999) e na formação de metástase, além de demonstrar que a inibição da angiogênese pode ser uma modalidade terapêutica promissora para doenças como o câncer, artrites, psoríase, dentre outras (HAGEDORN; BIKFALVI, 2000; HAYES; LI; LIPPMAN, 1999;

PINEDO; SLAMON, 2000; PRADEEP; SUNILA; KUTTAN, 2005; WAGNER et al., 2007).

Atualmente, vários inibidores da angiogênese estão em desenvolvimento clínico para o tratamento do câncer. Os agentes incluem anticorpos, tais como: anticorpo anti-VEGF neutralizante e anticorpos contra receptores VEGF. Existem também inibidores angiogênicos indiretos, como o anticorpo neutralizante de HER-2, que inibe indiretamente a angiogênese porque seu alvo estimula a expressão do VEGF (PRADEEP; SUNILA; KUTTAN, 2005; RIBATTI, 2004).

Uma variedade de estudos também tem sugerido o papel inibitório dos produtos naturais e de compostos da dieta, na angiogênese de tumores específicos (HAGEDORN; BIKFALVI, 2000; PRADEEP; SUNILA; KUTTAN, 2005).

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica de 34 – 42 kDa, produzida por vários tipos celulares em resposta a inúmeros estímulos (BYRNE; HAYES-BOUCHIER; HARMEY, 2005).

A família VEGF consiste de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e do fator de crescimento de placenta (PLGF). O VEGF-A é o principal envolvido na angiogênese, enquanto que o VEGF-C e o VEGF-D estão envolvidos na linfangiogênese (BYRNE; HAYES-BOUCHIER; HARMEY, 2005; DVORAK, 2005; HAGEDORN; BIKFALVI, 2000; RIBATTI, 2004).

As atividades da família VEGF são mediadas através de domínios de tirosina cinase VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3; a expressão destes é auto regulada na célula vascular endotelial durante a embriogênese e angiogênese tumoral (BYRNE; HAYES-BOUCHIER; HARMEY, 2005; PRADEEP; SUNILA; KUTTAN, 2005); outros autores citam as neuropilinas, também como receptores que podem mediar efeitos na progressão do tumor, afetando a angiogênese ou produzindo

efeitos diretamente nas células tumorais (BYRNE; HAYES-BOUCHIER; HARMEY, 2005; ELLIS, 2006; RIBATTI, 2004).

O VEGF é um potente peptídeo angiogênico, com efeitos biológicos que incluem regulação do desenvolvimento de células tronco hematopoiéticas, remodelagem da matriz extracelular e regeneração de citocinas inflamatórias, sendo considerado tanto um fator de crescimento, como um fator de permeabilidade vascular (PRADEEP; SUNILA; KUTTAN, 2005).

Assim sendo, o VEGF é um importante fator de crescimento para as células endoteliais dos vasos sanguíneos, que mostra resposta pleiotrópica que facilita a migração, proliferação, formação de tubos e a sobrevivência das células endoteliais; portanto o VEGF é uma ligação comum entre a inflamação, permeabilidade e a angiogênese (BYRNE; HAYES-BOUCHIER; HARMEY, 2005; PRADEEP; SUNILA; KUTTAN, 2005).

Altas concentrações de VEGF biologicamente ativo têm sido encontradas na pleura e fluido ascítico de pacientes, apresentando como uma importante causa de morbidade e mortalidade; vários estudos têm indicado que o VEGF apresenta um papel importante na formação da ascite maligna, aumentando a permeabilidade de proteínas do plasma (LUO et al., 1998; NAGY et al., 1995; POURGHOLAMI et al., 2006).

A ligação entre inflamação e o desenvolvimento do câncer foi reconhecida desde 1863, quando Rudolf Virchow descobriu leucócitos em tecidos neoplásicos e fez a primeira relação entre inflamação e cânceres. Desde então, um número de cânceres têm tido ligação a origem inflamatória e em muitos casos têm sido considerado como o ambiente tumoral altamente semelhante a um sítio inflamatório (ARIAS et al., 2006). Assim, dentre as substâncias envolvidas no processo

inflamatório merecem destaque as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos.

As prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos pertencem à classe dos eicosanóides, derivados do ácido aracdônico. A ciclogênase (COX) é uma importante enzima que participa na via do metabolismo do ácido aracdônico, gerando cinco prostanóides primários: prostaglandinas D_2 , E_2 , F_2 , I_2 e tromboxano A_2 . O potencial papel dos prostanóides na regulação, progressão e metástase do tumor é bem ilustrado pelo envolvimento das COXs (WANG; HONN; NIE, 2007).

A COX-2 e a PG E_2 estimulam a proliferação e diferenciação das células tumorais e estão associadas à neovascularização do tumor (HULL; KO.; HAWCROFT, 2004; WANG; HONN; NIE, 2007).

A prostaglandina E_2 é encontrada em vários fluidos corporais e é produzida por uma variedade de tecidos, incluindo o bronquiolar, gastrointestinal, vascular, uterino, etc. A PG E_2 está envolvida em processos inflamatórios crônicos, considerada um facilitador para a progressão de cânceres (WANG; HONN; NIE, 2007). Quantidade aumentada de PG E_2 é encontrada em várias condições patológicas e em um grande número de cânceres, principalmente no de pulmão e no de cólon (KASHFI; RIGAS, 2005; WANG; HONN; NIE, 2007).

A expressão aumentada de COX-2 também tem sido intensamente documentada em alguns tipos de cânceres, particularmente nos de cólon, pâncreas, pulmão, gástrico, mama e próstata (WANG; HONN; NIE, 2007).

Existem evidências epidemiológicas de que é possível prevenir o câncer, portanto, a quimioprevenção representa uma oportunidade muito promissora para o seu controle (DE FLORA; FERGUSON, 2005). Este fato tem sido confirmado através de estudos, que mostram que os antiinflamatórios não esteroidais (AINES)

diminuíram significativamente a incidência do câncer de cólon (KASHFI; RIGAS, 2005). Outros estudos têm demonstrado a ligação entre o uso de AINES, que inibe a atividade de COX, com a redução da incidência de câncer de mama, prognóstico favorável e sobrevida após diagnóstico, em mulheres pós-menopausa (HARRIS; BEEBE-DONK; ALSHAFIE, 2006; RAHME et al., 2005).

Portanto, a inibição da angiogênese, o VEGF e a COX são alvos atrativos para a terapia anti-câncer, pois oferecem teoricamente a esperança de um controle na progressão das neoplasias (HOTZ et al., 2005).

1.4 Tumor Ascítico de Ehrlich

Modelos experimentais, como o de câncer espontâneo em animais, oferecem oportunidades de estudos que auxiliam na compreensão da resposta imune do hospedeiro, bem como na avaliação da atividade e mecanismo de ação dos compostos, com perspectivas de desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (REBELLO, 2005; OLIVEIRA, 2003).

Um dos modelos experimentais bastante usados é o tumor ascítico de Ehrlich, que foi descrito por Ehrlich e Apollant em 1905, como um adenocarcinoma de mama, que teve origem espontânea em camundongos (MELO, 2004; OLIVEIRA, 2003).

Esse modelo tem sido usado para investigar a atividade protetora sobre a mielopoiese (QUEIROZ et al., 2004; SILVA et al., 2002; SHEELA; RAMAKRISHANA; SALIMATH, 2006; BINCOLLETO et al., 2005; SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007; NASCIMENTO et al., 2006; VALADARES; QUEIROZ, 2002; VALADARES et al., 2006a, 2006b; DONGRE et al., 2007; RAJKAPOOR et al., 2007) e mecanismos

antiangiogênicos (GURURAJ et al., 2002; GOSH; MAITY, 2006) de muitos compostos naturais e sintéticos.

O tumor ascítico de Ehrlich é amplamente utilizado, porque se mostra bastante vantajoso frente a outros tumores; por apresentar inespecificidade diante das diferentes linhagens murinas; por não regredir de forma espontânea; por ser facilmente transplantável no tecido cutâneo ou no peritônio, desenvolvendo-se em tumor sólido ou ascítico, respectivamente, apresenta um comportamento agressivo, pois cresce rapidamente, mesmo quando implantado em doses extremamente pequenas e é capaz de crescer em todos os animais que são transplantados (DONGRE et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2006; SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007; SUBIZA et al. 1987, 1989).

Como muitos outros tumores experimentais, o TAE produz alterações severas no sistema hematopoiético do portador, expressas por uma diminuição no número de células progenitoras, principalmente dos macrófagos e da linhagem granulocítica, com presença de hematopoiese extramedular, onde é observada anemia, trombocitopenia e leucocitose granulócito-dependente, além de imunossupressão (QUEIROZ et al., 2004; MORALES; VÉLEZ; SUBIZA, 1999; SUBIZA et al. 1989).

Alguns autores acreditam que a diminuição do número de células progenitoras na medula óssea está associada à maciça migração da medula, através do sangue, levando a um acúmulo no baço (KEEB; LALA, 1978; SUBIZA et al., 1989).

Dentre os mecanismos propostos para o estabelecimento do tumor frente ao sistema imune, destaca-se, essencialmente a associação deste à produção de citocinas imunossupressoras, regulação negativa de fatores de crescimento e de

indução de macrófagos e células T com propriedades supressoras (SEGURA; BARBERO; MÁRQUEZ, 1997). Durante o processo de desenvolvimento tumoral ocorre uma migração do fenótipo Th₁ para o Th₂ (FECCHIO et al. 1990; SEGURA; BARBERO; MÁRQUEZ, 1997).

Foi observado que o aumento de PG E₂, está diretamente relacionado a um fraco influxo de células inflamatórias na cavidade peritoneal e a uma inibição da liberação das citocinas IL-2 e IFN-γ pelos linfócitos T (VALADARES; QUEIROZ, 2002). Estes fatos são importantes ao considerar que o crescimento do TAE provoca uma reação inflamatória local, altera os padrões de migração celular, além de estimular os macrófagos (MELO, 2004).

O fluido ascítico é essencial para o crescimento do tumor e os constituintes são fontes nutricionais diretos das células do tumor (DONGRE et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2006; RAJKAPOOR et al., 2007).

Nos tumores ascíticos, uma camada do tumor estroma é formada no tecido peritoneal, isto é, o estroma desenvolve-se em um compartimento separado da maioria das células tumorais que estão suspensas no fluido ascítico. Estes tecidos circunvizinhos tornam altamente vascularizados como influência direta ou indireta de diversos fatores de crescimento e citocinas derivadas do componente principal do fluido ascítico, isto é, células tumorais, células inflamatórias e células mesoteliais. Entre essas moléculas, o VEGF tem sido demonstrado em altas concentrações e representa um papel crucial no aumento da permeabilidade da vasculatura vizinhas em uma variedade de tumores ascíticos em animais e em seres humanos (TEIXEIRA et al., 2006).

O crescimento do tumor está associado com a angiogênese, com a inflamação e também com o lipídeo endógeno e o fator de ativação de plaquetas

(FERREIRA et al., 2007). O VEGF é essencial para promover a formação e o acúmulo de fluido ascítico (LUO et al., 1998; NAGY et al., 1995; POURGHOLAMI et al., 2006).

Foi demonstrado em estudos recentes, que a resposta inflamatória é essencial para o controle do tumor Ehrlich, pois o alto influxo de células inflamatórias promove o desenvolvimento do tumor. Este efeito provavelmente está relacionado com a angiogênese e fatores de crescimento induzidos pela inflamação (NASCIMENTO et al., 2006).

Em modelos experimentais, a correlação entre o volume ascítico e os níveis de VEGF tem sido relatada e o bloqueio do VEGF tem reduzido drasticamente a formação do líquido ascítico (LUO et al., 1998; POURGHOLAMI et al., 2006). Alguns estudos mostram que a redução do fluido ascítico está acompanhada com uma drástica queda nos níveis de VEGF no líquido ascítico e no plasma (POURGHOLAMI et al., 2006).

Como foi descrito anteriormente, considerando o potencial papel na promoção da angiogênese do tumor, na metástase e no acúmulo do fluido, o VEGF é um alvo atrativo para intervenção terapêutica.

Com a finalidade de prosseguir os estudos com essa planta é que foi proposto este trabalho, já que a mesma se mostrou muito promissora para descoberta de novos compostos. Ademais, o *S. umbellatum* é empiricamente utilizada pela população como “remédio natural” para o combate ao câncer, embora não exista nenhuma citação relevante na literatura de suas atividades farmacológicas.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial antitumoral e antiangiogênico de *Synadenium umbellatum*, utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade do extrato bruto etanólico (EBE) de *S. umbellatum* e das frações clorofórmica (FC) e hexânica (FH), através dos métodos de redução do MTT e exclusão do azul de Tripiano, frente às células do TAE e da linhagem leucêmica K-562.
- ✓ Avaliar a sobrevida dos animais portadores de TAE, após tratamento com EBE e com a FC e FH de *S. umbellatum*.
- ✓ Avaliar a inibição do crescimento tumoral em animais portadores de TAE, após tratamento com EBE e com a FC e FH de *S. umbellatum*.
- ✓ Avaliar a angiogênese dos animais portadores de TAE, após tratamento com EBE e com a FC e FH de *S. umbellatum*, através da fotografia dos vasos e dosagens de hemoglobina, hematócrito, VEGF e PG E₂.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

3.1.1 Coleta e identificação de *S. umbellatum*

O material botânico (folha) do *S.umbellatum* foi coletado de espécime cultivado numa residência do Bairro Feliz, Goiânia, Goiás, no verão de 2005/2006 (Figura 1). A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. José Realino de Paula, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (FF/UFG). A exsicata do material, contendo caule, folhas, flores e frutos, foi depositada no herbário desta Universidade sob o número UFG - 27160.



Figura 1: Fotografia da planta *S. umbellatum* Pax, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, tirada em novembro de 2005. Tamanho 11 x 9 cm.

3.1.2 Preparação do extrato e fracionamento

Dezessete quilos de folhas da planta foram coletados, colocadas em estufa com ventilação a 40°C para secagem durante 48 horas. Após a secagem total, as folhas foram trituradas em moinho de facas.

Para obtenção do extrato bruto etanólico de *S. umbellatum*, o pó das folhas (1,3 kg) foi submetido à maceração em álcool etílico a 95% P. A., na proporção 1: 5 (m/v), sob agitação mecânica por 5 horas. Depois este foi filtrado em papel de filtro (Whatman® nº 1). Este processo foi repetido por três vezes. Os três filtrados obtidos foram misturados e evaporados em rotaevaporador a 40° C sob pressão reduzida, com a finalidade de concentrar o extrato. Depois, calculou-se o rendimento do EBE.

Parte do EBE obtido foi submetido ao fracionamento, de acordo com Ferri (1996), com algumas modificações. Quarenta e cinco gramas de EBE foram pesados, dissolvidos em 1,35 litros de metanol a 4°C e deixado em repouso por 18 horas nesta mesma temperatura. Em seguida a solução metanólica foi filtrada e ao filtrado foi adicionado 580 mL de água destilada a 4°C. A solução metanol-água foi filtrada em celite para a retirada da clorofila, e a partir desta solução, iniciou-se a partição do extrato.

Em um funil de separação, foi adicionado a solução metanol-água e o hexano na proporção 1:1, agitado lentamente e após a separação das fases, coletou-se a fração hexânica, este processo foi repetido por três vezes.

Depois, o mesmo processo foi realizado, por três vezes, utilizando o solvente clorofórmio e após separação das fases coletou-se a fração clorofórmica e a fração metanol-água restante.

Em seguida, as frações obtidas foram evaporadas os solventes, em rotaevaporador a 40°C; sendo que a fração metanol-água foi também liofilizada (Figura 2).

Após a evaporação completa dos solventes, calculou-se o rendimento das frações obtidas; hexânica (FH), clorofórmica (FC) e metanólica (FM), em relação ao extrato bruto etanólico (EBE).

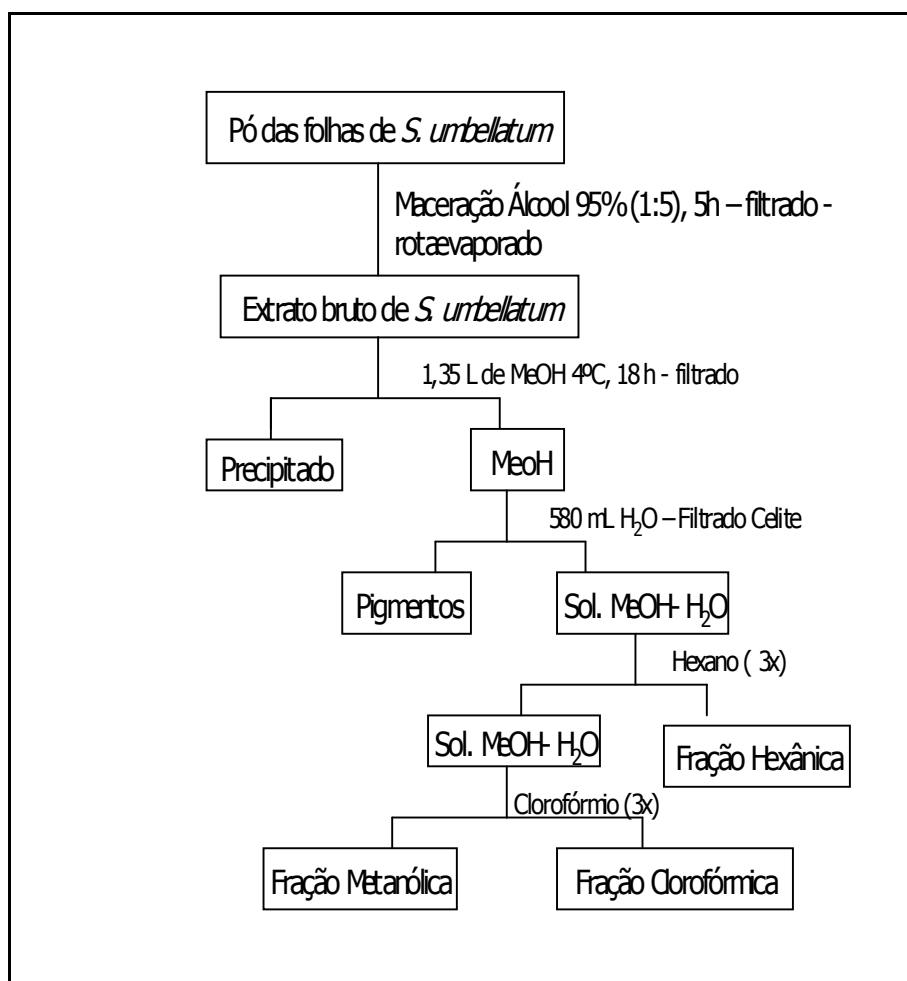


Figura 2: Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto etanólico de *S. umbellatum* e suas frações.

3.1.3 Preparo da solução do extrato de *S. umbellatum* e frações usadas nos ensaios

Para os ensaios *in vivo*, solução-mãe do extrato (EBE) e das frações (FC e FH) foram preparadas imediatamente antes dos experimentos. A solução-mãe do EBE foi preparada a 10 mg/mL e a partir desta foram feitas sucessivas diluições para se obter a concentração necessária, levando-se em consideração a média de peso dos animais, doses usadas (5, 10 e 25 mg/kg) e o volume de administração (0,2 mL/ animal). A solução-mãe da FC foi preparada a 2 mg/mL e a da FH foi a 1 mg/mL e, a partir destas, foram feitas as diluições necessárias, levando-se em consideração os mesmos parâmetros do EBE, sendo que as doses usadas da FC foram 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg e as da FH foram 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg (calculadas a partir do rendimento do EBE). Estas soluções foram preparadas usando solução fisiológica a 0,9% (SF 0,9%) estéril e 5 % de polissorbato 80 (Tween 80).

Para os ensaios *in vitro*, foram preparadas soluções a 200 mg/mL do EBE, a 23,2 mg/mL da FC, 7,6 mg/mL da FH e 24 mg/mL da FM, usando solução fisiológica a 0,9% estéril e 5 % de Tween 80. Depois estas soluções foram filtradas, sob fluxo laminar, em filtro estéril de 0,2 micra e diluições sucessivas foram feitas nas placas de cultura, no momento do teste.

3.2 Reagentes e Medicamentos

- Álcool Etílico 95% P.A. (Synth)
- Azul de Tripano (Vetec)
- Celite 545 (Biotec)
- Cetamina 0,1g/ml (Cristália)

- Clorofórmio (Synth)
- Dimetilsufóxido (DMSO)
- EDTA (Labtest)
- Kit para dosagem de hemoglobina (Labtest)
- Kit para dosagem de PGE 2 (R&D Systems)
- Kit para dosagem de VEGF (R&D Systems)
- Meio RPMI 1640 (Sigma)
- Metanol (Synth)
- Metotrexato 25 mg/mL (Libra)
- MTT (Boehringer Mannheim)
- n- Hexano (Synth)
- Padrão de hemoglobina (Labtest)
- Polissorbato 80 - tween (Vetec)
- Solução Fisiológica 0,9% (Halex Istar)
- Soro Bovino Fetal (Gibco)
- Xilazina 20 mg/ml (Bayer)

3.3 Animais

3.3.1 Aclimação dos Animais

Para a realização dos experimentos *in vivo* foram usados camundongos *Swiss*, machos, com idade entre 8 a 10 semanas (pesando $35,8 \pm 4,5$ g), fornecidos pela Indústria Química do Estado de Goiás (IQUEGO). Os animais foram mantidos agrupados ao acaso em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura

constante de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 h, por 5 dias. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos e submetidos ao tratamento.

3.3.2 Modelo Experimental – Tumor Ascítico de Ehrlich

As células tumorais de Ehrlich foram mantidas nas dependências do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Experimental da Faculdade de Farmácia /UFG através de sucessivas passagens entre animais, pela via intraperitoneal (IP). Estas células tumorais crescem de forma ascítica na cavidade peritoneal dos camundongos.

Para o desenvolvimento do TAE, camundongos foram inoculados, via IP, com uma suspensão de 2×10^6 células tumorais/mL, em um volume de 0,2 mL/animal. Para obtenção da suspensão de células utilizadas nos ensaios, os camundongos portadores de tumores foram sacrificados, o líquido ascítico colhido com seringa estéril.

Uma alíquota (20 uL) do líquido ascítico foi diluído em azul de Tripiano (180 uL), 2 vezes, para contagem das células viáveis, em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica. De acordo com número de células contadas, foi realizada uma diluição do líquido ascítico com SF 0,9% a fim de se obter 2×10^6 células viáveis/mL, para a inoculação nos animais em experimentação (BINCOLETTO et al., 2005; DONGRE et al., 2007; ORSOLIC; BASIC, 2005; QUEIROZ et al., 2004; VALADARES; QUEIROZ, 2002).

3.3.3 Tratamento dos animais

Para a realização dos ensaios de avaliação da sobrevida e da inibição tumoral, foram divididos em cinco grupos de 10 e 6 animais, respectivamente. Os camundongos foram submetidos ao tratamento de acordo com os protocolos descritos abaixo.

Os ensaios *in vivo* foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

- Protocolo I

Grupo 1 - animais portadores de TAE e sem tratamento.

Grupo 2 - animais portadores de TAE e tratados com EBE 5 mg/kg/dia

Grupo 3 - animais portadores de TAE e tratados com EBE 10 mg/kg/dia

Grupo 4 - animais portadores de TAE e tratados com EBE 25 mg/kg/dia

Grupo 5 - animais portadores de TAE e tratados com metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia

- Protocolo II

Grupo 1 - animais portadores de TAE e sem tratamento

Grupo 2 - animais portadores de TAE e tratados com FC 1,2 mg/kg/dia

Grupo 3 - animais portadores de TAE e tratados com FC 2,3 mg/kg/dia

Grupo 4 - animais portadores de TAE e tratados com FC 5,8 mg/kg/dia

Grupo 5 - animais portadores de TAE e tratados com metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg

- Protocolo III

Grupo 1 - animais portadores de TAE e sem tratamento

Grupo 2 - animais portadores de TAE e tratados com FH 0,4 mg/kg/dia

Grupo 3 - animais portadores de TAE e tratados com FH 0,8 mg/kg/dia

Grupo 4 - animais portadores de TAE e tratados com FH 1,9 mg/kg/dia

Grupo 5 - animais portadores de TAE e tratados com metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia

Todos os animais foram inoculados, pela via intraperitoneal, com um volume de 0,2 mL da solução de células tumorais (2×10^6 células/mL). O dia da inoculação do tumor foi considerado dia zero (Do). O tratamento dos animais iniciou 24 h após a inoculação do TAE, administrando-se 0,2 mL das doses do EBE e das FC e FH de *S. umbellatum* e de metotrexato, durante 10 dias consecutivos, pela via intraperitoneal. Os animais do grupo TAE (controle) receberam apenas o diluente, no mesmo volume administrado aos animais tratados.

3.4 Células Tumorais

Para os ensaios de citotoxicidade, foram utilizadas células do tumor ascítico de Ehrlich e da linhagem leucêmica K-562.

As células ascíticas foram obtidas de animais portadores de tumor mantidos no laboratório, e estas foram, coletadas por técnica asséptica no momento do teste. Após coleta, as células foram lavadas com SF 0,9% estéril e contadas, em câmara de Neubauer, usando o azul de Tripiano, como corante. Após contagem, foi preparada a suspensão de células na concentração de 2×10^6 células/mL, para posterior realização dos testes.

As células da linhagem leucêmicas K-562 foram obtidas de culturas mantidas no laboratório, através de expansão contínua em meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de soro bovino fetal, em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. As células foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e

ressuspensas em meio RPMI 1640, contadas e a concentração foi ajustada para 1×10^6 células/mL.

3.5 Ensaios *in vitro*

3.5.1 Avaliação de citotoxicidade de *S. umbelatum* pelo método de redução do tetrazolium (MTT)

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT {brometo de [3-(4,5 - dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan, pela enzima succinato-desidrogenase, o que resulta em cristais azuis insolúveis (NIU; ZHAO; JING, 2001; RIBEIRO-DIAS et al., 2000; SILVA et al, 2004). Este produto, acumulado dentro da célula, é solubilizado através da adição de um solvente apropriado. A intensidade da coloração é utilizada para medir a integridade mitocondrial, conseqüentemente, a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

As células do TAE (2×10^6 células/mL) e da linhagem leucêmica K-562 (1×10^6 células/mL) foram semeadas em placa de 96 poços, 90 uL por poço, e incubadas com 10 uL de diferentes concentrações do EBE (0,15 – 20 mg/mL); FC (0,018 – 2,32 mg/mL); FH (0,006 – 0,76 mg/mL) e FM (0,3 – 2,4 mg/mL), em triplicata. Após incubação de 24 e 48 horas, em estufa úmida a 37° C e 5% de CO₂, adicionou-se 10 uL do corante MTT 5mg/ml e a placa foi novamente incubada por mais 4 horas. Em seguida, centrifugou-se a placa, a 2000 rpm por 5 minutos, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se 100 uL de dimetilsufóxido (DMSO) para solubilização do precipitado de formazan formado. Agitou-se bem a

placa e a absorbância foi medida em leitor de placa de Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) a 560 nm. A absorbância obtida das células controle (não tratadas) foi considerada como 100% de viabilidade celular. A citotoxicidade do extrato e das frações foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Células viáveis} = \frac{\text{Média da absorbância de cada concentração do extrato}}{\text{Média da absorbância do controle}} \times 100$$

A concentração inibitória 50% (CI₅₀), foi definida como a concentração que resulta em 50% de morte celular e foi derivada de uma curva concentração resposta. Os resultados obtidos foram analisados, submetidos à análise estatística e apresentados em gráficos (MOSMANN, 1983).

3.5.2 Avaliação de citotoxicidade de *S. umbelatum* pelo método de exclusão do azul de Tripano

Este método avalia a integridade da membrana celular, permitindo ou não a entrada do corante através da membrana plasmática (ANAZZETTI et al., 2003; MELO et al. 2003).

A suspensão celular de TAE (2 x10⁶ células/mL) e da linhagem leucêmica K-562 (1 x10⁶ células/mL), foi distribuída em placa de 96 poços, 90 µL por poço, e incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ a 5% , por 24 e 48 horas, com 10 µL do EBE (0,4 mg/mL); FC (0,1 mg/mL) e FH (0,08 mg/mL), em triplicata. Após estes períodos de incubação, uma alíquota de 20 µL da suspensão de células foi retirada e diluída em azul de Tripano 0,2%. As células foram observadas conforme as suas alterações morfológicas e contadas em câmara de Neubauer. As células viáveis, que excluíram o corante, possuíam um aspecto translúcido e as células mortas

apresentavam a coloração arroxeada (ANAZZETTI et al., 2003; MELO et al. 2003; OOI et al., 2004).

O percentual de inibição celular, na presença do extrato e das frações em estudo, foi calculado da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição celular: } 100 - \frac{\text{Média do número de células viáveis do poço tratado} \times 100}{\text{Média do número de células viáveis do controle}}$$

Este ensaio foi realizado por três vezes, e cada concentração do extrato e das frações de *S. umbellatum* foi realizada em triplicata. Os resultados obtidos foram analisados, submetidos à análise estatística e apresentados em gráficos.

3.6 Ensaios *in vivo*

3.6.1 Avaliação da sobrevida dos animais tratados com EBE, FC e FH de *S. umbellatum*

Para determinação da sobrevida, os animais foram tratados com EBE, FC e FH de *S. umbellatum* conforme o item 3.3.3, seguindo os protocolos I, II e III respectivamente, e foram observados diariamente até a morte. Os dados obtidos foram analisados utilizando a curva de Kaplan-Meier (SUNILA; KUTTAN, 2004; VALADARES et al., 2006a; VALADARES; QUEIROZ, 2002).

3.6.2 Avaliação da inibição do crescimento tumoral após tratamento com o EBE, FC e FH de *S. umbellatum*

Vinte e quatro horas após o término do tratamento com o EBE, a FC e a FH de *S. umbellatum* (conforme protocolos do item 3.3.3), os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, para retirada do líquido ascítico do peritônio do animal. O líquido ascítico foi centrifugado a 2500 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi congelado para posteriores análises e o botão celular foi ressuspenso com 2 mL de SF 0,9%, para a contagem das células. Uma alíquota da suspensão de células (20 uL) foi diluída em 180 uL de azul de Tripiano (1:10), e contadas em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica. Os dados obtidos foram submetidos a análises posteriores, e a média das células tumorais contadas no grupo TAE foi considerado 100% (FECCHIO et al., 1990; GHOSH; MAITY, 2006; GUPTA et al., 2004; SHEELA et al. 2006).

3.6.3 Avaliação da hemoglobina sérica e o hematócrito dos animais portadores de TAE após tratamento com EBE, FC e FH de *S. umbellatum*

Vinte e quatro horas após o término do tratamento com o EBE, a FC e a FH de *S. umbellatum* (conforme protocolos do item 3.3.3), os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina (1:2) para a coleta de sangue, que foi usado para a determinação do hematócrito e dosagem da hemoglobina sérica.

Na determinação do hematócrito foi utilizado tubo capilar heparinizado e este foi centrifugado por 3 minutos a 2500 rpm e a leitura foi feita em escala apropriada. Os valores dos hematócritos foram expressos em %.

A hemoglobina sérica foi determinada, usando o método de Drabkin; adicionou-se 20 uL de sangue com EDTA em 5 mL do reagente de cor (Labtest®), homogenizado, após 10 minutos procedeu-se a leitura a 520 nm, em

espectrofotômetro Cary 50. As absorbâncias obtidas foram multiplicadas pelo fator de calibração, previamente definido através do padrão de hemoglobina. O conteúdo de hemoglobina foi expresso em g/dL.

3.6.4 Avaliação da angiogênese nos animais portadores de TAE após tratamento com EBE, FC e FH de *S. umbellatum*

Vinte e quatro horas após o término do tratamento com o EBE, a FC e a FH de *S. umbellatum* (conforme protocolos do item 3.3.3), os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e retirado a pele da região abdominal para a verificação da angiogênese. Nesta avaliação, as peles dos animais foram fotografadas com câmara digital 7.2, e uma análise morfológica macroscópica dos vasos foi realizada posteriormente (TEIXEIRA et al., 2006).

3.6.5 Dosagem do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O VEGF foi dosada usando o kit específico (VEGF - R&D Systems^R), o qual consiste em um método quantitativo para determinar concentrações de VEGF em sobrenadante de cultura de células, tecidos, soros e plasmas, utilizando a técnica de imunoensaio enzimático do tipo sanduíche (Elisa - sanduíche).

O anticorpo policlonal específico para VEGF oriundo de camundongo reveste uma microplaca. Padrões, controles e amostras foram adicionados nos poços e o VEGF presente ligou-se ao um anticorpo imobilizado. Após lavagem para retirar as substâncias não ligadas, uma enzima ligada ao anticorpo policlonal específico foi adicionada em cada poço. Uma nova lavagem foi realizada para

remover reagentes-enzima-anticorpo não ligados e a seguir uma solução substrato foi adicionada em cada poço. A reação enzimática produziu uma substância azul que se tornou amarela após adição de uma solução que interrompeu a reação. Após a densidade óptica foi determinada a 450 nm em leitor de Elisa. A intensidade da cor medida foi proporcional a quantidade de VEGF ligado ao anticorpo. Os valores das amostras foram determinados através de curva padrão.

Determinou-se o valor do VEGF, dos animais tratados com EBE e não tratados (conforme protocolo I do item 3.3.3), seguindo a metodologia do manual que encontrava no kit. Cada amostra foi feita em duplicata e os valores encontrados foram expressos em pg/mL.

3.6.6 Dosagem de Prostaglandina E₂

A prostaglandina E₂ foi determinada usando o kit específico (PG E₂ - R&D Systems^R), que consiste em um método quantitativo para determinar PG E₂ em sobrenadante de cultura de células, tecidos, soros e plasmas, utilizando a técnica de imunoensaio enzimático do tipo competitivo.

A PG E₂ presente na amostra compete com a quantidade fixada da enzima peroxidase, por sítios no anticorpo monoclonal de camundongos. Durante a incubação, o anticorpo monoclonal de camundongo se ligou ao anticorpo anti – camundongo fixado na microplaca. Uma lavagem foi realizada para remover o excesso de conjugado e amostra não ligada, uma solução substrato foi adicionada em cada poço para determinar a atividade enzimática. O desenvolvimento de cor foi interrompido por uma solução, tão logo foi adicionada. A absorbância foi lida a 450 nm em leitor de Elisa. A intensidade da cor observada foi inversamente proporcional

à concentração de PG E₂ na amostra. Os valores das amostras foram determinados através de curva padrão.

Determinou-se a PG E₂ dos animais tratados com EBE e dos não tratados (conforme protocolo I do item 3.3.3), seguindo a metodologia do manual que se encontrava no kit. Cada amostra foi feita em duplicata e os valores encontrados foram expressos em pg/mL.

3.7 Análise Estatística

No teste de avaliação da citotoxicidade foi feita a análise a partir da média dos resultados de três experimentos, em triplicata, que foram transformados em % do controle e a CI₅₀ foi obtida graficamente pela curva concentração resposta.

Nos ensaios *in vivo*, os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e as diferenças estatísticas entre os grupos foram detectadas pela análise de variância (ANOVA) e o teste de contraste de Tukey, a posteriori.

Para a análise da sobrevida dos animais utilizou-se a curva de Kaplan Meier, Log-rank.

Para todos os testes considerou-se significativo, quando $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Material botânico

As folhas frescas do *S. umbellatum* coletadas (17 kg), após secagem e trituração, produziram 1,3 kg de folhas secas.

Após a extração e a evaporação do álcool, obteve-se aproximadamente 90 g de EBE, correspondendo a um rendimento de 6,9%.

Parte do EBE (45g) foi fracionada e foram obtidas três frações: uma fração hexânica, uma fração clorofórmica e uma fração metanol-água e estas apresentaram os seguintes rendimentos: 4%, 11,5% e 12,3%, respectivamente.

4.2 Ensaios *in vitro*

4.2.1 Avaliação de citotoxicidade de *S. umbellatum* pelo método de redução do tetrazolium (MTT)

Na avaliação da citotoxicidade do extrato de *S. umbellatum*, pelo método de redução do tetrazolium, utilizou-se células do TAE e da linhagem leucêmica K-562 e investigou-se o potencial efeito citotóxico do EBE, FC e FH em diferentes concentrações, em cultura de 24 e 48 horas. Os resultados encontrados estão apresentados nas figuras 3, 4 e 5 (tabelas 1, 2 e 3 do apêndice).

O extrato bruto etanólico (0,15 – 20 mg/mL) produziu um efeito citotóxico concentração-dependente, sobre as células do TAE, conforme mostra o percentual de viabilidade celular. A menor concentração do extrato apresentou 74,9 % e 100%

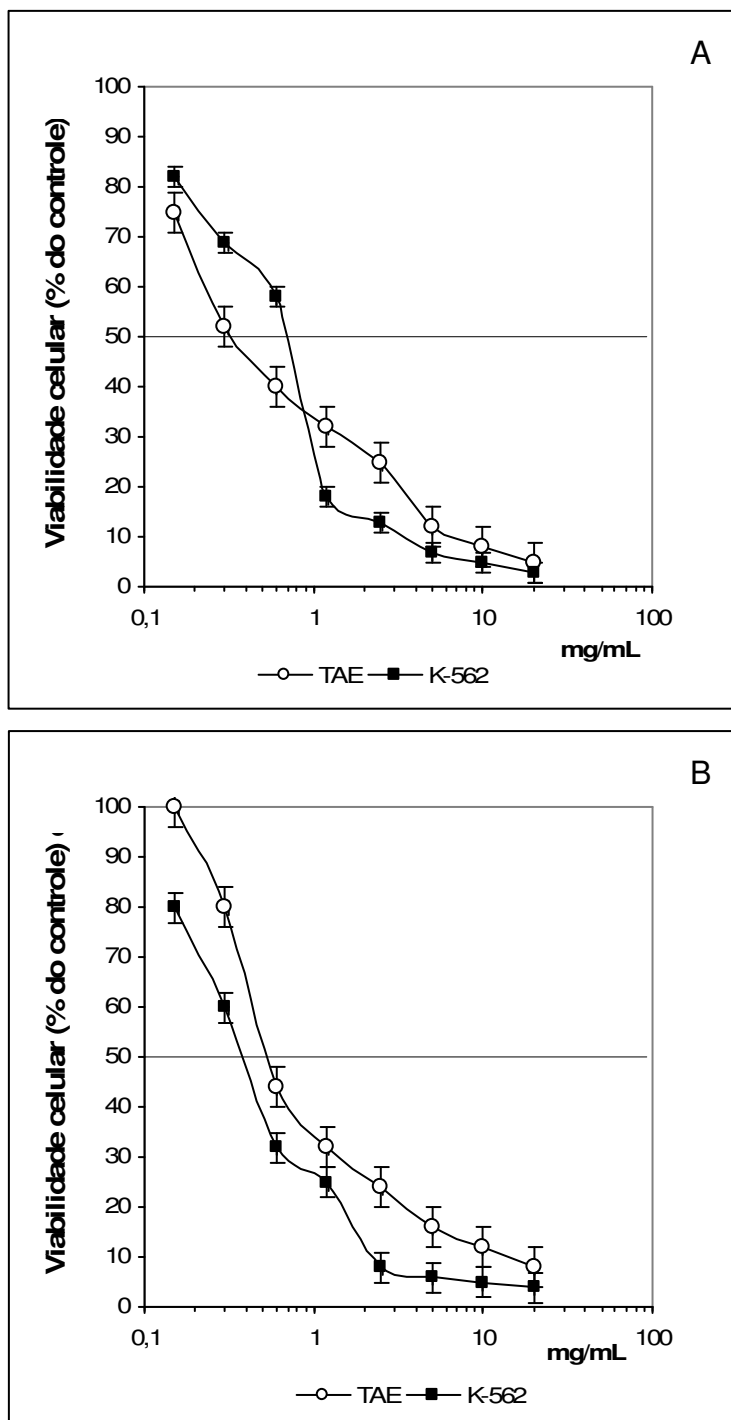
de células viáveis, enquanto que a maior concentração apresentou 5,3% e 8,1% , nas 24 e 48 horas de incubação, o que representou uma inibição celular de 94,7% e 91,9%, respectivamente. Na linhagem K-562, a viabilidade celular para a menor concentração foi 82% e 80% e para a maior concentração usada do extrato o percentual de células viáveis foi de 8,1% e 4%, representando uma inibição de celular de 91,9% e 96%, respectivamente (figura 3).

Em relação à ação da fração clorofórmica de *S. umbellatum* (0,018 – 2,32 mg/mL), a menor concentração usada não apresentou nenhum efeito citotóxico nas células do TAE, enquanto que a maior concentração apresentou 6,1% e 10,9% de células vivas, produzindo uma inibição de 93,9% e 89,1% nas células tumorais. Nas células K-562, a menor concentração da FC também não produziu nenhum efeito citotóxico, mas a maior concentração apresentou 2,4% e 8,2% de células viáveis e morte em 97,6% e 91,8% das células, respectivamente (figura 4).

Em relação à fração hexânica de *S. umbellatum* (0,006 – 0,76 mg/mL), a menor concentração usada no teste, não apresentou efeito citotóxico nas células do TAE, e a maior concentração apresentou 6,5% e 10,7% de células vivas, produzindo uma inibição de 93,5% e 89,3% nas células tumorais. Nas células K-562, a menor concentração produziu um pequeno efeito citotóxico, mas a maior concentração apresentou 4,3% e 8,6% de células viáveis, produzindo morte em 95,7% e 91,4% das células, respectivamente (figura 5).

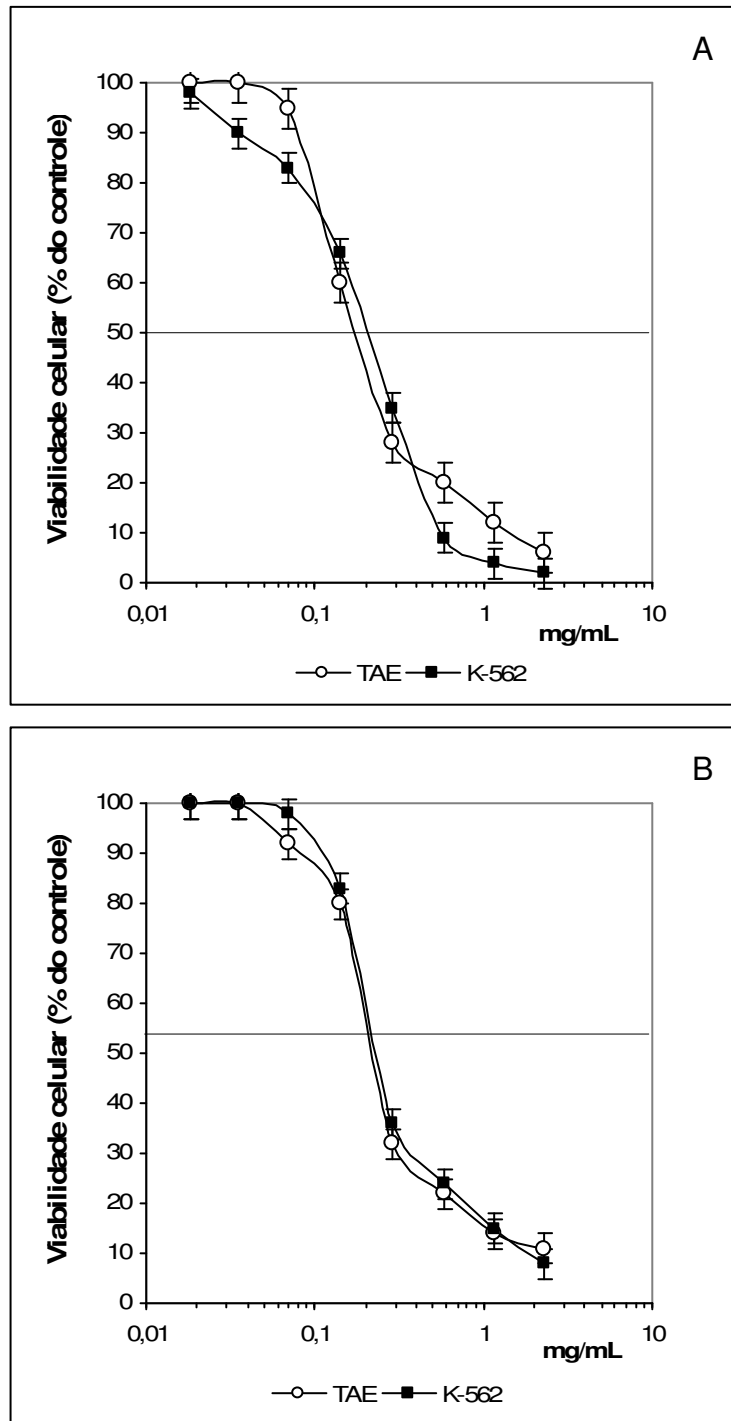
Considerou-se efetiva a concentração do extrato e das frações que causou morte em 50% das células. O EBE, a FC e a FH produziram um marcante efeito citotóxico, de forma concentração dependente, com valores de CI_{50} , para os dois tipos de células e tempo de incubação, de aproximadamente 0,4; 0,1 e 0,08 mg/mL, respectivamente.

Em relação à fração metanólica, nos testes de triagem, não apresentou efeito citotóxico sobre as células do TAE e da linhagem K-562, causando morte celular em no máximo 36% das células tumorais, portanto, não foi usada nos demais ensaios.



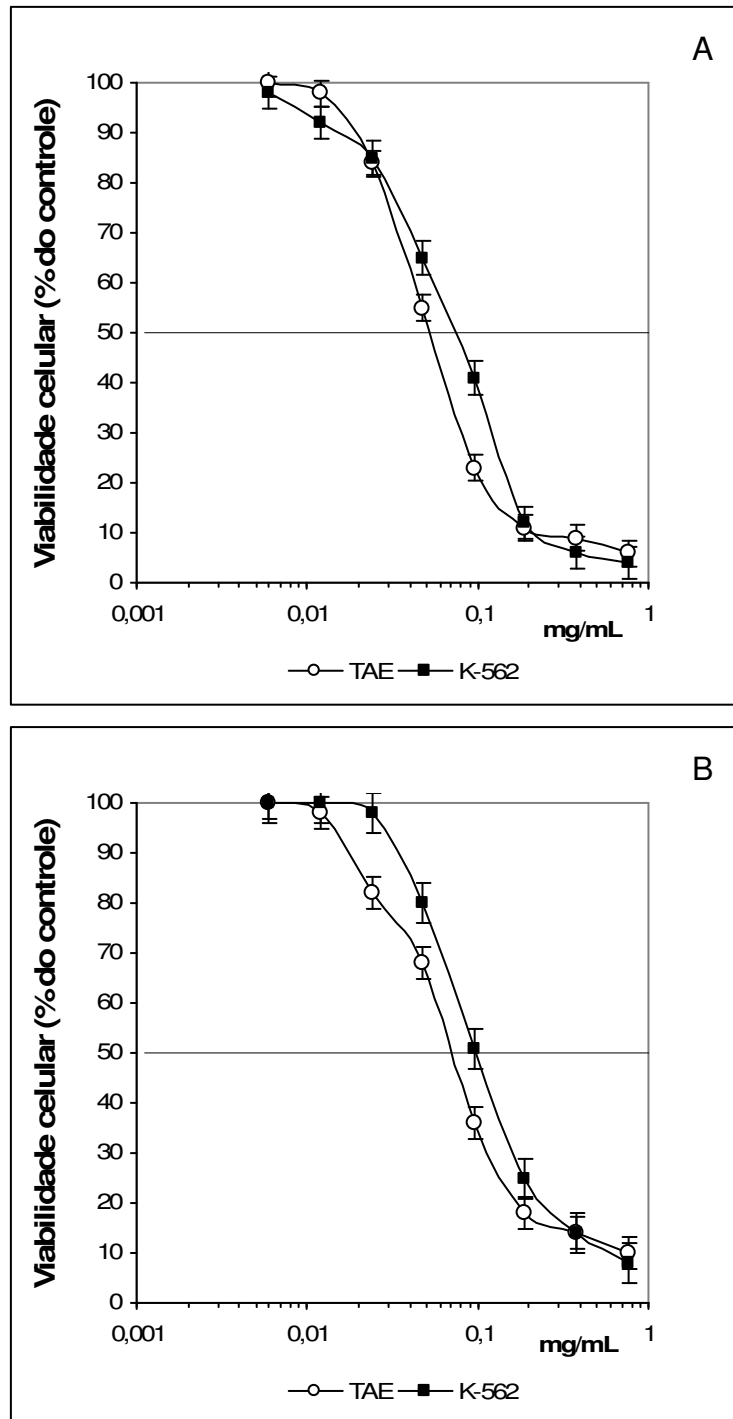
$CI_{50} \sim 0,4 \text{ mg/mL}$

Figura 3: Viabilidade de células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e da linhagem celular K-562 após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, com diferentes concentrações de extrato bruto etanólico de *S. umbellatum* (0,15 – 20 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em triplicata. A linha horizontal corresponde a CI_{50} .



$CI_{50} \sim 0,1 \text{ mg/mL}$

Figura 4: Viabilidade de células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e da linhagem celular K-562 após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, com diferentes concentrações da fração clorofórmica de *S. umbellatum* (0,018 – 2,32 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em triplicata. A linha horizontal corresponde a CI_{50} .



$CI_{50} \sim 0,08 \text{ mg/mL}$

Figura 5: Viabilidade de células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e da linhagem celular K-562 após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, com diferentes concentrações da fração hexânica de *S. umbellatum* (0,006 – 0,76 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em triplicata. A linha horizontal corresponde a CI_{50}

4.2.2 Avaliação de citotoxicidade de *S. umbellatum* pelo método de exclusão do azul de Tripano

Na avaliação da citotoxicidade de *S. umbellatum*, pelo método de exclusão do azul de Tripano, foi usada também células do TAE e da linhagem leucêmica K-562, em cultura de 24 e 48 horas.

A inibição celular apresentada, após exposição ao EBE (0,4 mg/mL), FC (0,1 mg/mL) e FH (0,08 mg/mL) em concentrações correspondentes as CI_{50} encontradas pelo método de redução do MTT estão apresentadas na figura 6 (tabela 4 do apêndice).

Esses valores de CI_{50} , para o EBE, FC e FH, no método de azul de Tripano, produziram inibição de aproximadamente 75%, 72% e 73 % no crescimento e viabilidade das células do TAE e 95%, 58% e 64% na viabilidade das células K-562, após 24 horas de exposição, respectivamente. Após 48 horas de exposição, o extrato bruto e as frações apresentaram inibição de aproximadamente de 92%, 82% e 90 % das células do TAE e 99% de morte celular para as células da linhagem K-562.

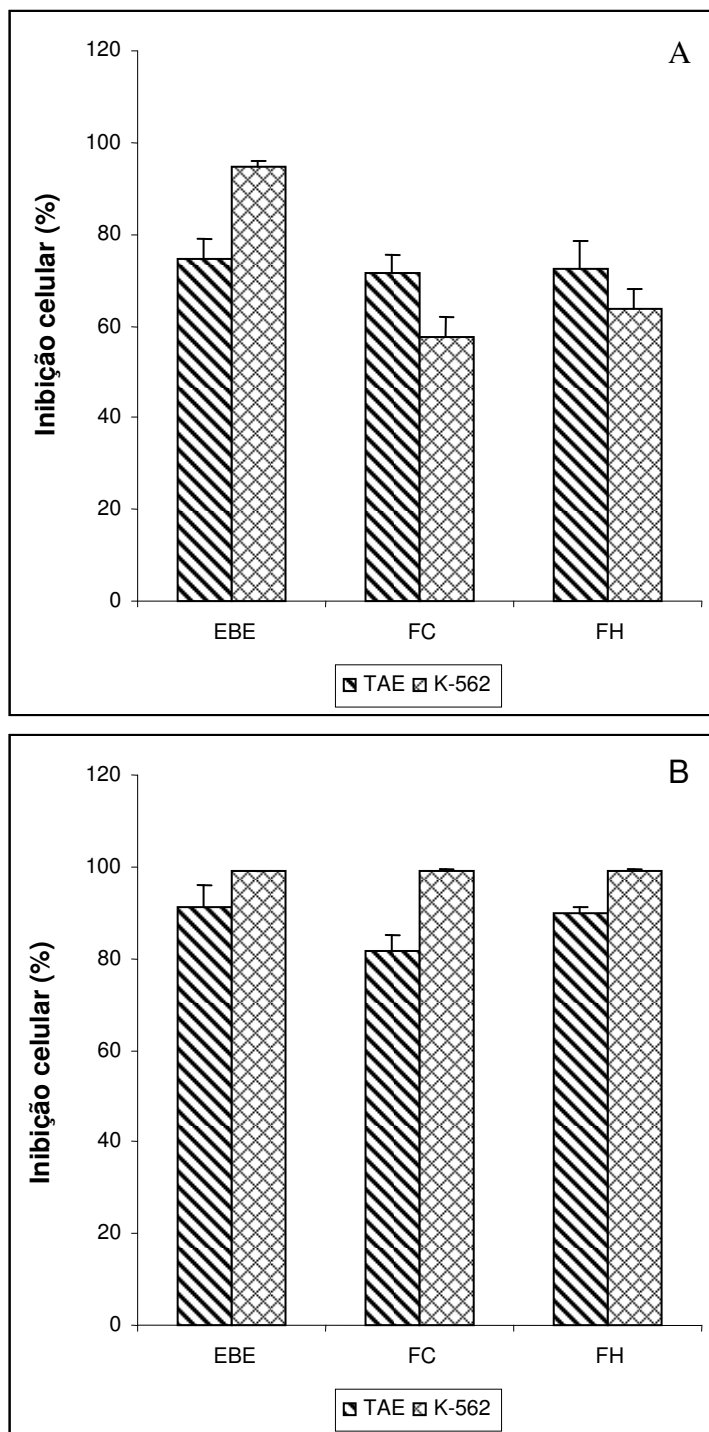


Figura 6: Inibição celular do TAE e da linhagem K-562, avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripiano, após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, com extrato bruto etanólico (EBE - 0,4 mg/mL), fração clorofórmica (FC - 0,1 mg/mL) e fração hexânica (FH - 0,08 mg/mL) de *S. umbellatum*. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão da triplicata de experimentos.

4.3 Ensaios *in vivo*

4.3.1 Avaliação da sobrevida dos animais tratados com o EBE, a FC e a FH de *S. umbellatum*

A avaliação da sobrevida dos animais portadores do TAE e tratados com EBE nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia, por 10 dias está apresentada na figura 7 (tabela 5 do apêndice).

Os animais portadores de tumor, e que não foram tratados, sobreviveram até o 25º dia de observação, e os animais tratados com as menores doses do EBE (5 e 10 mg/kg/dia) sobreviveram até o 25º e 30º dia de observação, respectivamente, enquanto que, os animais tratados com a dose 25 mg/kg/dia sobreviveram até o 50º dia. Por outro lado, os animais tratados com o metotrexato, um agente quimioterápico conhecido, sobreviveram até o 33º de observação.

O grupo tratado com o EBE na dose 25 mg/kg/dia apresentou um aumento de 100% da probabilidade de sobrevida, apresentando diferença estatisticamente significativa (teste Log-rank, $p < 0,05$), e os demais grupos tratados com EBE não apresentaram diferença no tempo de sobrevida. O grupo tratado com o metotrexato apresentou um aumento na sobrevida de 32 %, mas não significativo estatisticamente, quando comparado ao grupo não tratado.

O efeito do tratamento com a FC do *S. umbellatum* nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia na sobrevida dos animais portadores de TAE encontram-se demonstrado na figura 8 (tabela 6 do apêndice). Os animais não tratados sobreviveram até o 28º dia de avaliação e os animais que foram tratados com a FC com as doses menores sobreviveram até 29º dia. Já o grupo que recebeu a maior

dose sobreviveu até 32º dia, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (teste Log-rank, $p > 0,05$).

A avaliação da sobrevida dos animais portadores do TAE tratados com a fração hexânica está apresentada na figura 9 (tabela 7 do apêndice).

Os animais do grupo controle (TAE) sobreviveram até o 22º dia de avaliação e os animais tratados com a FH do extrato nas doses 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia, sobreviveram até 29º, 22º e 25º dias de observação, respectivamente. O grupo de animais tratados com a dose 0,4 mg/kg/dia da FH foi o que mais tempo sobreviveu, apresentando um aumento de 32% na sobrevida, embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido detectada, quando comparado ao grupo controle. Os outros dois grupos tratados não apresentaram aumento na sobrevida dos animais (teste Log-rank, $p > 0,05$).

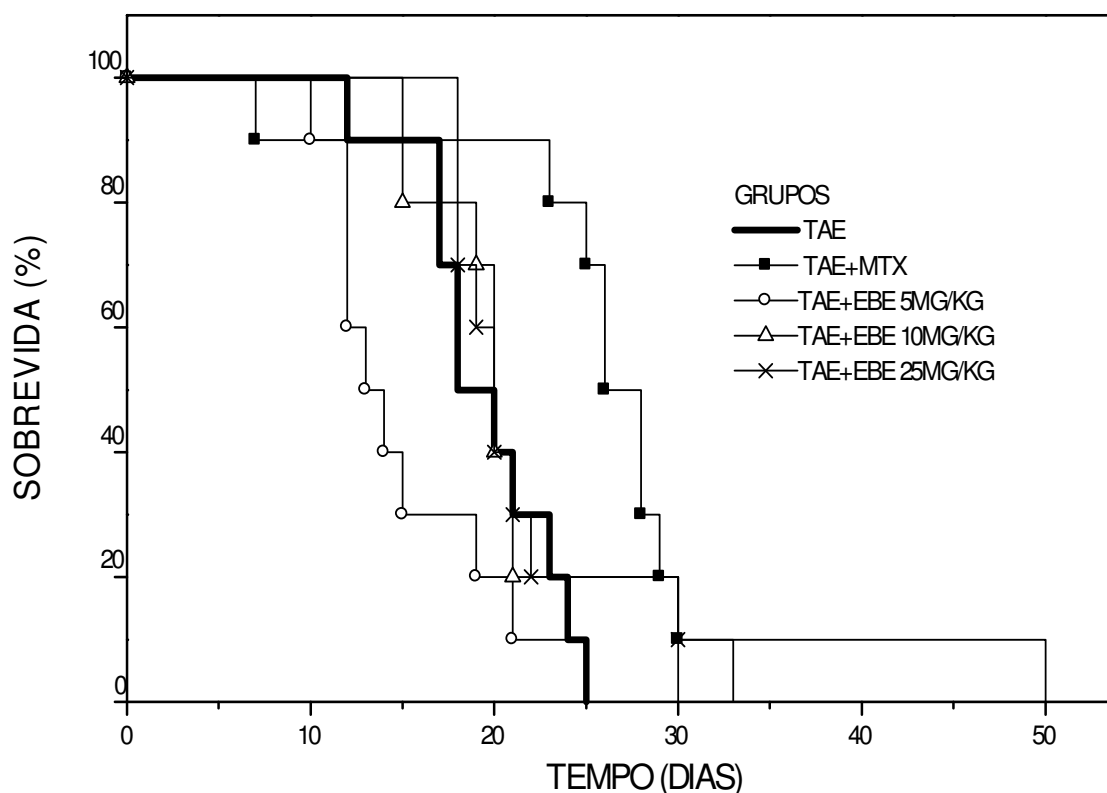


Figura 7: Efeito do extrato bruto etanólico (EBE) de *S. umbellatum* e do metotrexato (MTX) na sobrevivência de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Os grupos de animais foram tratados com EBE nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2×10^6 células/mL de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte (Curva Kaplan – Meier, Log-rang). $p < 0,001$ em relação ao grupo TAE.

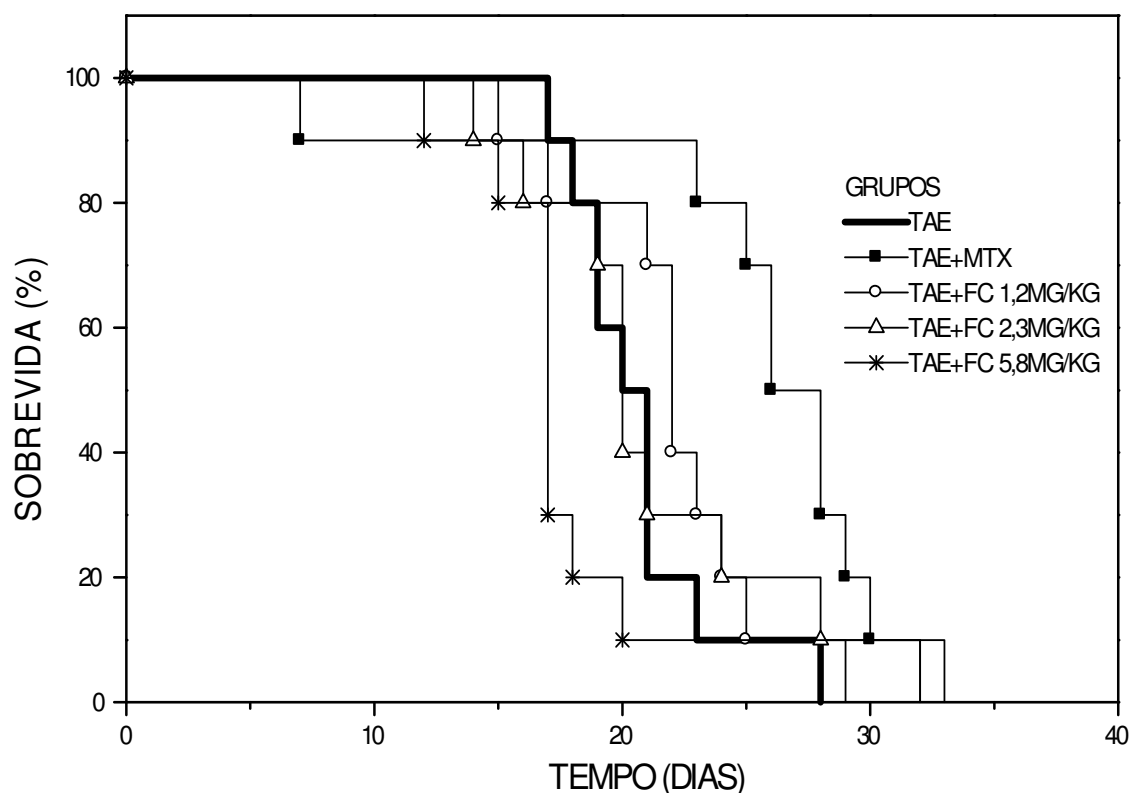


Figura 8: Efeito da fração clorofórmica (FC) de *S. umbellatum* e do metotrexato (MTX) na sobrevida de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Os grupos de animais foram tratados com FC nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2×10^6 células/mL de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte (Curva Kaplan – Meier, Log-rank). $p > 0,05$ em relação ao grupo TAE.

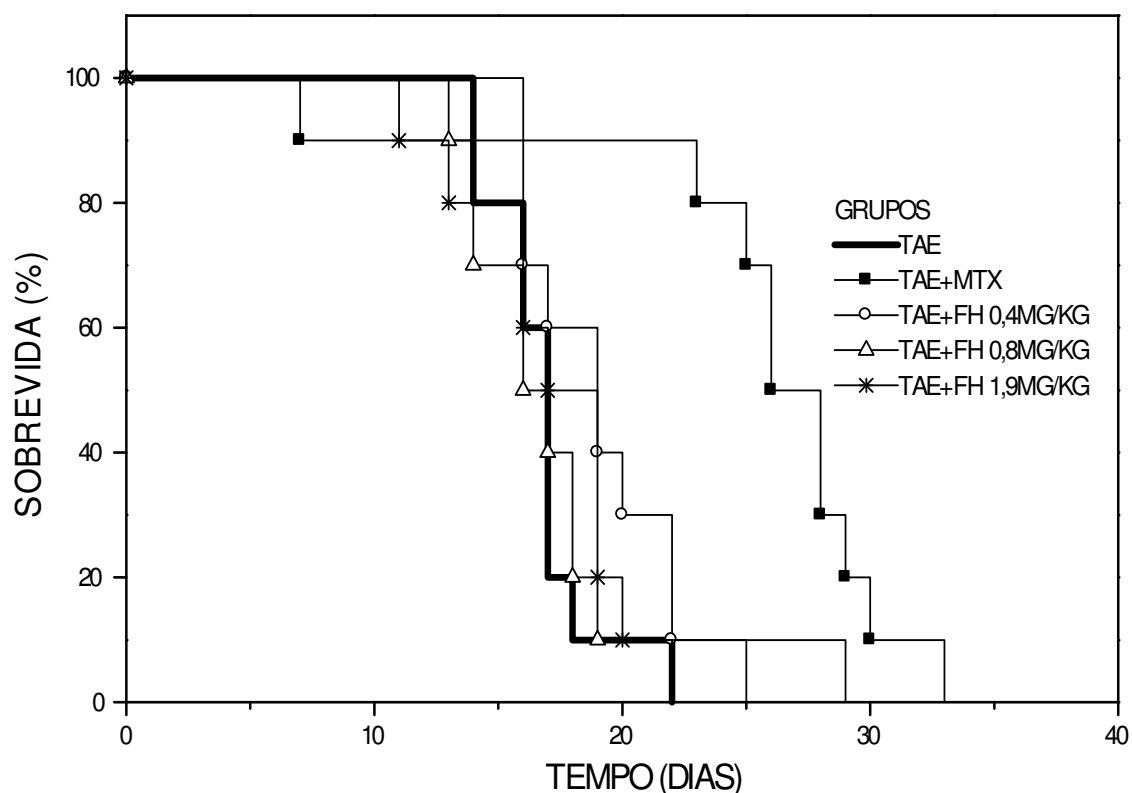


Figura 9: Efeito da fração hexânica (FH) de *S. umbellatum* e do metotrexato (MTX) na sobrevida de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Os grupos de animais foram tratados com FH nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2×10^6 células/mL de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte (Curva Kaplan – Meier, Log-rang). $p > 0,05$ em relação ao grupo TAE.

4.3.2 Avaliação da inibição do crescimento tumoral após tratamento com o EBE, a FC e a FH de *S. umbellatum*

Na avaliação da inibição do crescimento tumoral, o EBE exibiu uma diminuição no número de células tumorais, de maneira dose-dependente, quando comparado ao grupo TAE, conforme demonstrado na figura 10 (tabela 8 do apêndice).

A média do número de células tumorais encontradas no grupo TAE correspondeu a 100% de viabilidade celular, os grupos tratados com EBE nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia apresentaram em relação ao TAE $91,2 \pm 22,1\%$, $79,5 \pm 15,4\%$ e $63,4 \pm 17,5\%$, respectivamente. O metotrexato (1,5 mg/kg/dia) apresentou $31,3 \pm 6,8\%$ de células tumorais. Observou-se, portanto, que houve uma inibição no crescimento tumoral de 8,8%, 20,5% e 36,6% nos animais tratados com EBE nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia, respectivamente. No grupo tratado com a dose de 25mg/kg/dia a diferença foi estatisticamente significativa, quando comparada ao grupo TAE (teste de Tukey, $p < 0.05$).

O tratamento com a fração clorofórmica nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia não alteraram de forma significativa o número de células tumorais, apresentando em relação ao grupo TAE, $96,0 \pm 11,4\%$; $95,3 \pm 9,2\%$ e $90,0 \pm 23,2\%$, de viabilidade celular, respectivamente, conforme mostra a figura 11 (tabela 9 do apêndice).

Os animais tratados com a fração hexânica nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia apresentaram viabilidade celular, em relação ao grupo TAE de $91,5 \pm 16,2\%$; $89,5 \pm 9,8$ e $89,1\% \pm 10,5\%$, respectivamente. A inibição no crescimento tumoral de 8,5%; 10,5% e 10,9% foram observadas com as relativas doses, mas não

estatisticamente significativa (teste de Tukey, $p > 0.05$), quando comparada ao grupo TAE. Estes resultados estão apresentados na figura 12 e tabela 10 do apêndice.

Em relação aos animais tratados com o metotrexato houve uma redução significativa de 68,7% do número de células tumorais quando comparado ao grupo TAE (teste de Tukey, $p < 0.05$) e de 32%, quando comparado ao grupo tratado com o EBE 25mg/kg/dia, conforme mostram as figuras 10, 11 e 12 (tabelas 8, 9 e 10 do apêndice).

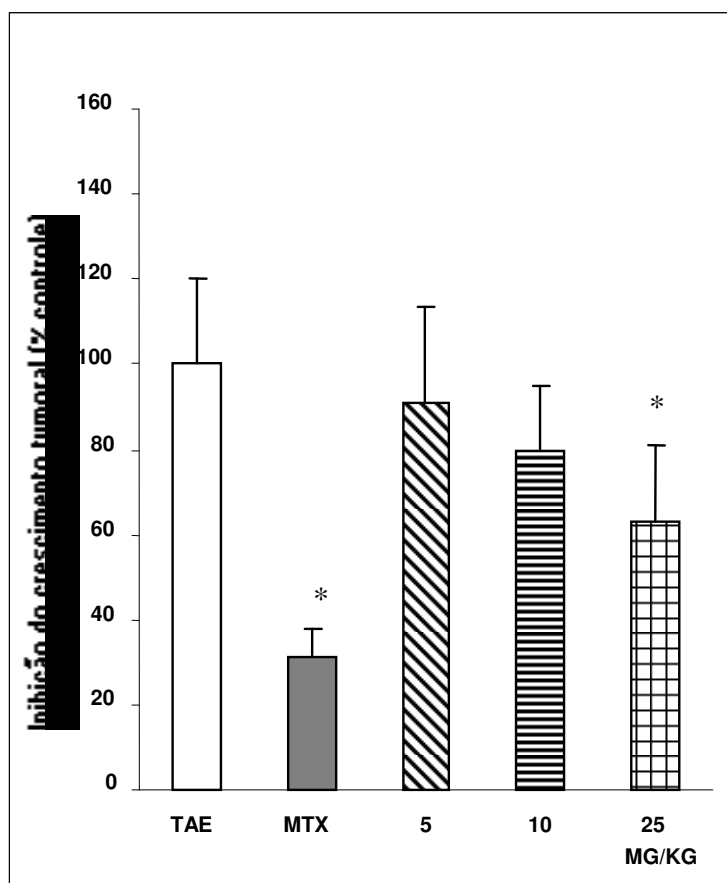


Figura 10: Avaliação da inibição tumoral em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados por via IP, durante 10 dias, com extrato bruto etanólico de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores acima representam a média e o desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.

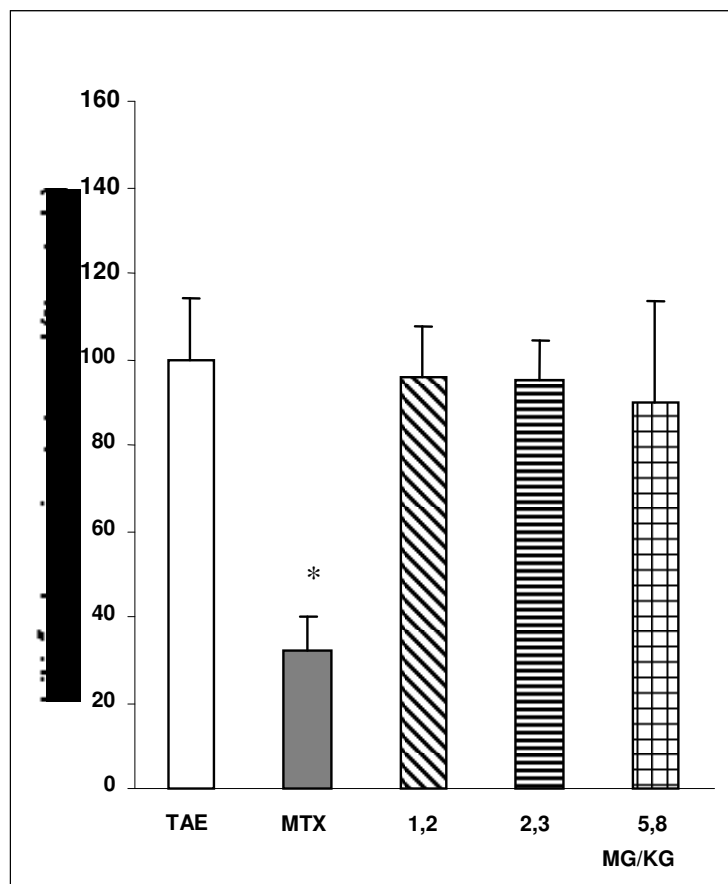


Figura 11: Avaliação da inibição tumoral em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), tratados por via IP, durante 10 dias, com a fração clorofórmica de *S. umbellatum* nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores acima representam a média e o desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.

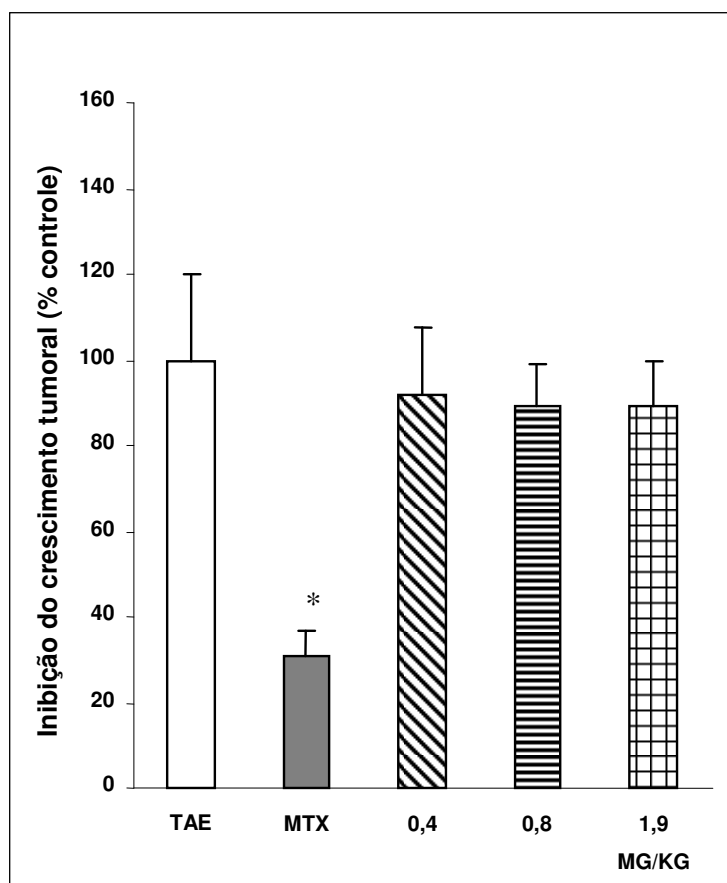


Figura 12: Avaliação da inibição tumoral em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), tratados por via IP, durante 10 dias, com a fração hexânica de *S. umbellatum* nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores acima representam a média e o desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.

4.3.3 Avaliação da hemoglobina sérica e do hematócrito dos animais portadores de TAE após tratamento com EBE, FC e FH de *S. umbellatum*

A avaliação da hemoglobina sérica e do hematócrito dos animais portadores de TAE mostrou que o desenvolvimento tumoral induz a uma diminuição do número de hemácias e do conteúdo hemoglobínico nos animais, quando comparado ao grupo controle (sem tumor). Já os animais que foram tratados com EBE de *S. umbellatum* na dose de 25 mg/kg/dia apresentou melhora do quadro hematimétrico, quando comparado ao grupo TAE. Os resultados estão apresentados nas figuras 13,14 e 15 (tabelas 11, 12 e 13 do apêndice).

Os animais dos grupos controle, TAE (não tratados) e MTX apresentaram os seguintes valores de hemoglobina sérica de $12,8 \pm 0,5$; $10,8 \pm 0,7$ e $10,6 \pm 1,0$ g/dL, respectivamente e os animais tratados com EBE 5, 10 e 25 mg/kg /dia apresentaram os seguintes resultados $11,9 \pm 0,7$; $12,2 \pm 0,7$ e $12,6 \pm 1,9$ g/dL, respectivamente. Comparando estatisticamente os valores apresentados por cada grupo, observou-se que o grupo tratado com o EBE na dose 25mg/kg/dia apresentou diferença significativa em relação ao TAE, os grupos tratados com 10 e 25 mg/kg/dia apresentaram diferença em relação ao grupo tratado com MTX (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os valores de hemoglobina encontrados nos animais tratados com FC nas doses 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg foram os seguintes, respectivamente: $12,7 \pm 0,9$; $12,1 \pm 1,2$ e $12,4 \pm 0,7$ (g/dL). Não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos TAE e controle (teste de Tukey, $p > 0,05$).

A hemoglobina sérica nos animais tratados com FH foi semelhante aos detectados no sangue dos animais que receberam o EBE e a FC, os valores obtidos

foram os seguintes: $12,5 \pm 1,2$; $12,7 \pm 0,9$; $12,8 \pm 0,5$ (g/dL). Também não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos TAE e controle. (teste de Tukey, $p > 0,05$).

O grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TAE e ao grupo tratado com MTX (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Em relação aos valores de hematócrito, foi observada uma diferença significativa estatisticamente entre o grupo tratado com EBE 25 mg/kg/dia ($52,7 \pm 5,6$ %) e o grupo controle ($52,2 \pm 3,8$ %), quando comparado ao grupo TAE ($43,3 \pm 3,3$ %). Quanto ao valor de hematócrito dos animais tratados com a FC e a FH não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos.

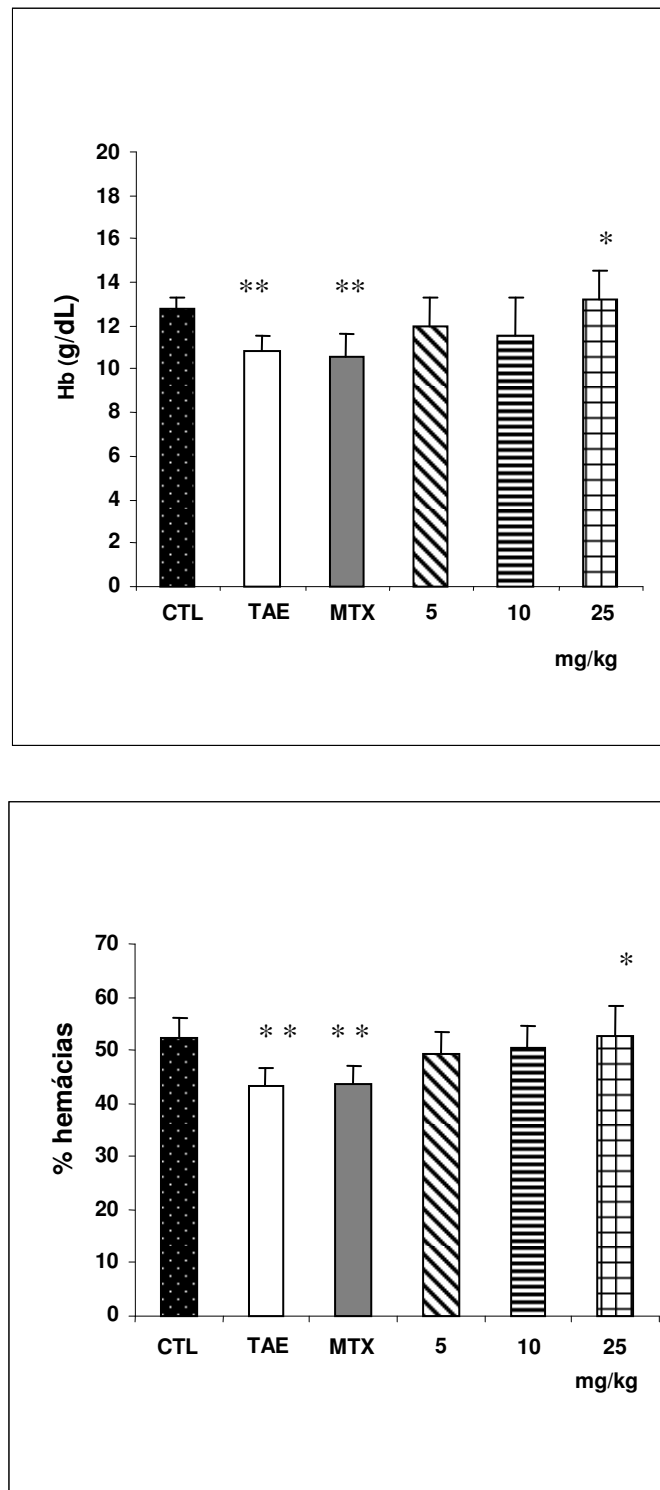


Figura 13: Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), tratados com extrato bruto etanólico (EBE) de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia; tratados com metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e de animais sem tumor (CTL). Os valores acima representam a média $\pm$ desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao TAE; ** $p < 0,05$ em relação ao CTL

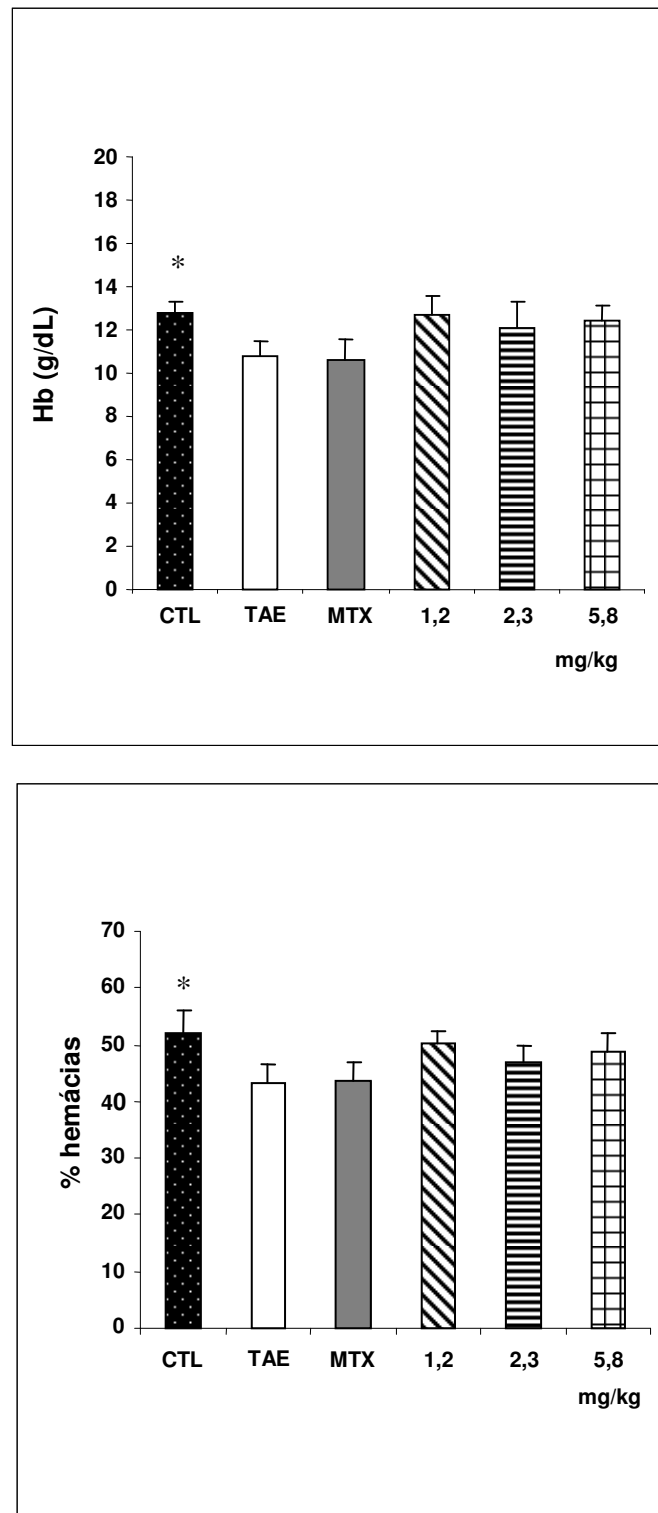


Figura 14: Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), tratados com a fração clorofórmica (FC) de *S. umbellatum* nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia; tratados com metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e de animais sem tumor (CTL). Os valores acima representam a média $\pm$ desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao TAE.

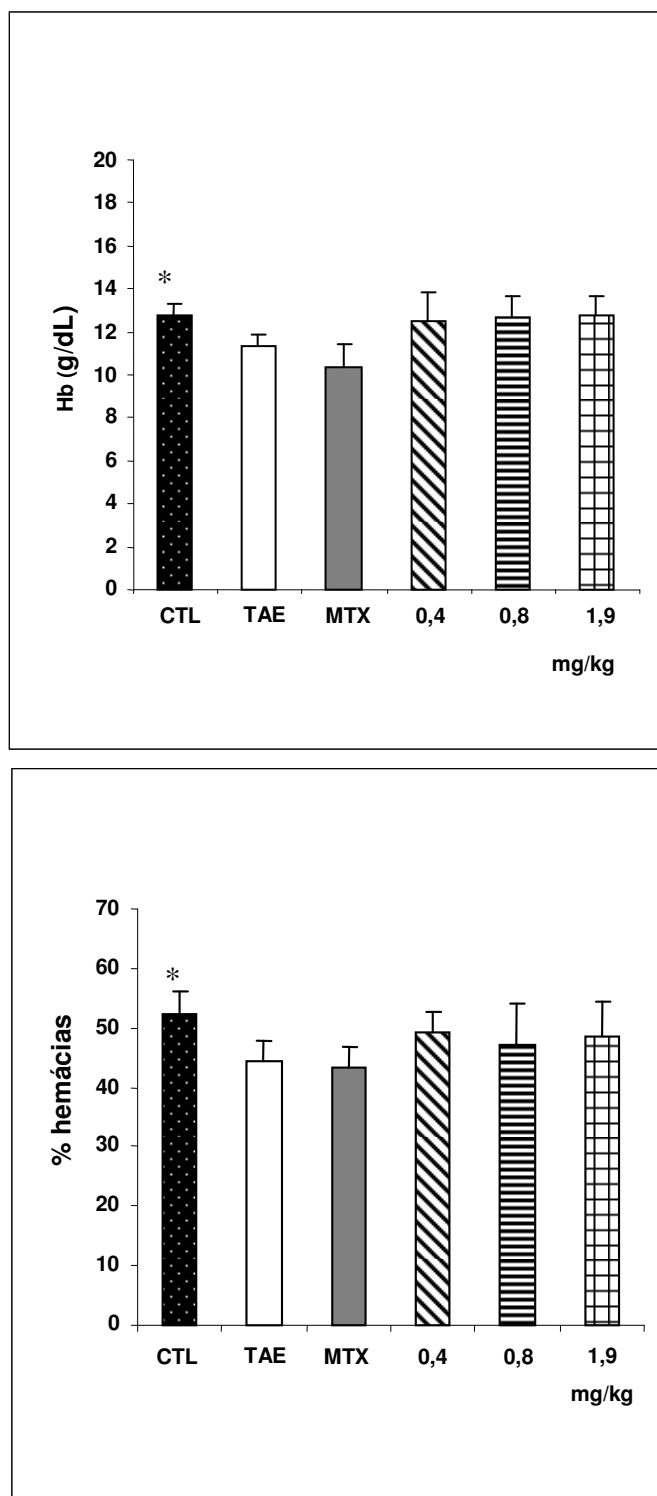


Figura 15: Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) dos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), tratados com a fração hexânica (FH) de *S. umbellatum* nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia; tratados com metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e de animais sem tumor (CTL). Os valores acima representam a média $\pm$ desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao TAE.

4.3.4 Avaliação da angiogênese nos animais portadores de TAE após tratamento com EBE, FC e FH de *S. umbellatum*

A análise fotográfica dos vasos revelou alterações na angiogênese dos grupos estudados, conforme mostram as figuras 16, 17 e 18.

Os animais portadores de TAE e que não foram tratados, apresentaram a vascularização da parede peritoneal aumentada, com vasos tortuosos, congestionados de eritrócitos e bem dilatados. O tratamento nos animais com o EBE apresentou uma alteração evidente, na dose de 25 mg/kg/dia, apresentando uma redução na ramificação e no calibre dos capilares, semelhante àquela encontrada no grupo controle (animais sem tumor). Este mesmo padrão também foi observado no grupo de animais portadores de TAE e tratados com o MTX.

Assim, os animais que foram tratados com a FC e FH, não apresentaram diferença visível no padrão vascular, quando comparado ao grupo TAE.

Estes dados em conjunto demonstram o potencial antiangiogênico do extrato bruto de *S. umbellatum*.

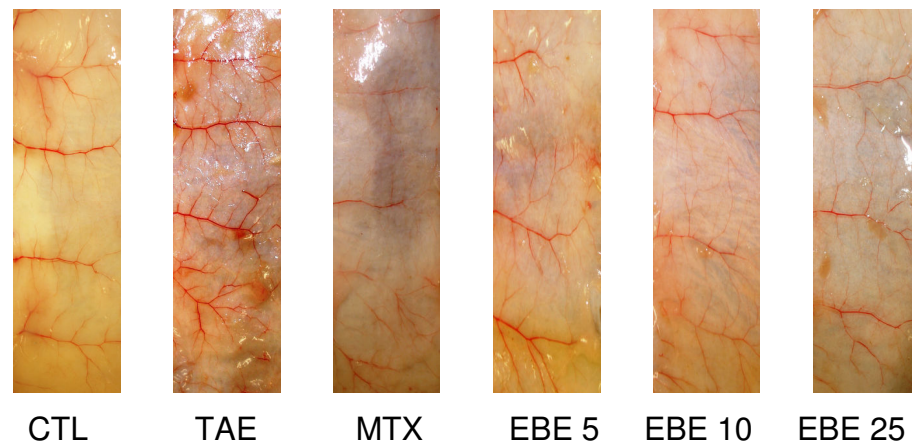


Figura 16: Fotografia do padrão vascular dos animais transplantados com tumor ascítico de Ehrlich (TAE) tratados com extrato bruto etanólico (EBE) de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia; de animais tratados com metotrexato (MTX) na dose 1,5 mg/kg/dia, via IP, por 10 dias, de animais somente portadores de tumor (TAE) e de animais sem tumor (CTL).

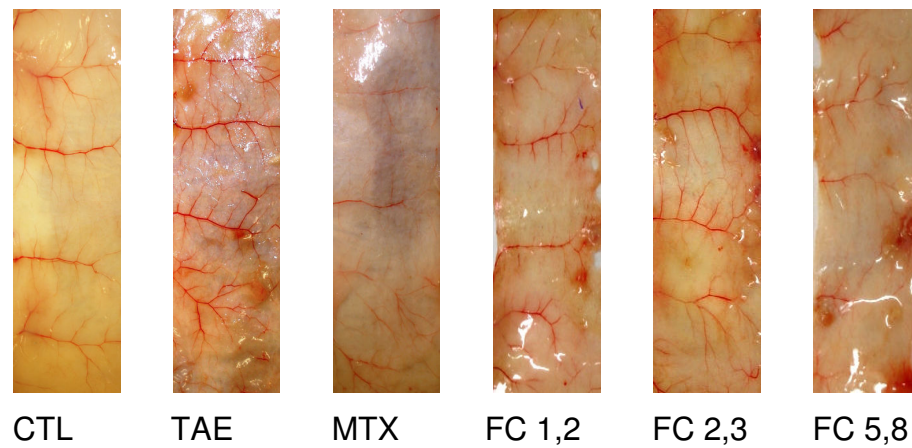


Figura 17: Fotografia do padrão vascular dos animais transplantados com tumor ascítico de Ehrlich (TAE) tratados com a fração clorofórmica (FC) de *S. umbellatum* nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia; de animais tratados com metotrexato (MTX) na dose de 1,5 mg/kg/dia, via IP, por 10 dias; de animais somente portadores de tumor (TAE) e de animais sem tumor (CTL).

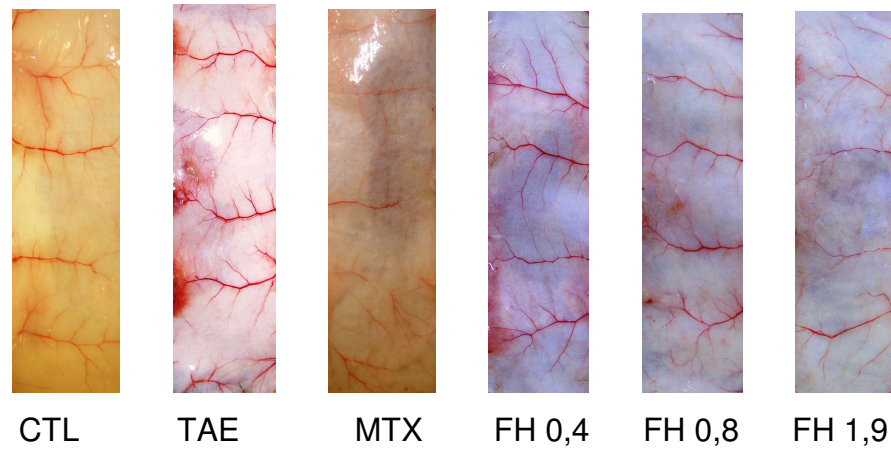


Figura 18: Fotografia do padrão vascular dos animais transplantados com tumor ascítico de Ehrlich (TAE) tratados com a fração hexânica (FH) de *S. umbellatum* nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia; e de animais tratados com metotrexato (MTX) na dose de 1,5 mg/kg/dia, via IP, por 10 dias, de animais somente portadores de tumor (TAE) e de animais sem tumor (CTL).

4.3.5 Dosagem do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

Como apresentado na figura 19 (tabela 14 do apêndice), o tratamento, com extrato bruto etanólico de *S. umbellatum*, produziu uma modulação negativa nos níveis do VEGF, quando comparado ao grupo apenas portador de tumor ascítico de Ehrlich.

Os animais do grupo TAE apresentaram valores de VEGF 3.343 ± 144 pg/mL no líquido ascítico, enquanto que o grupo de animais tratados com EBE na dose 25 mg/kg/dia apresentou valor de VEGF de 1.906 ± 497 pg/mL. Este grupo apresentou uma redução significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$) dos níveis de VEGF, quando comparado ao grupo TAE.

Os grupos tratados com as doses de 5 e 10 mg/kg/dia, não apresentou redução nos níveis de VEGF, quando comparado ao grupo TAE (teste de Tukey, $p > 0,05$).

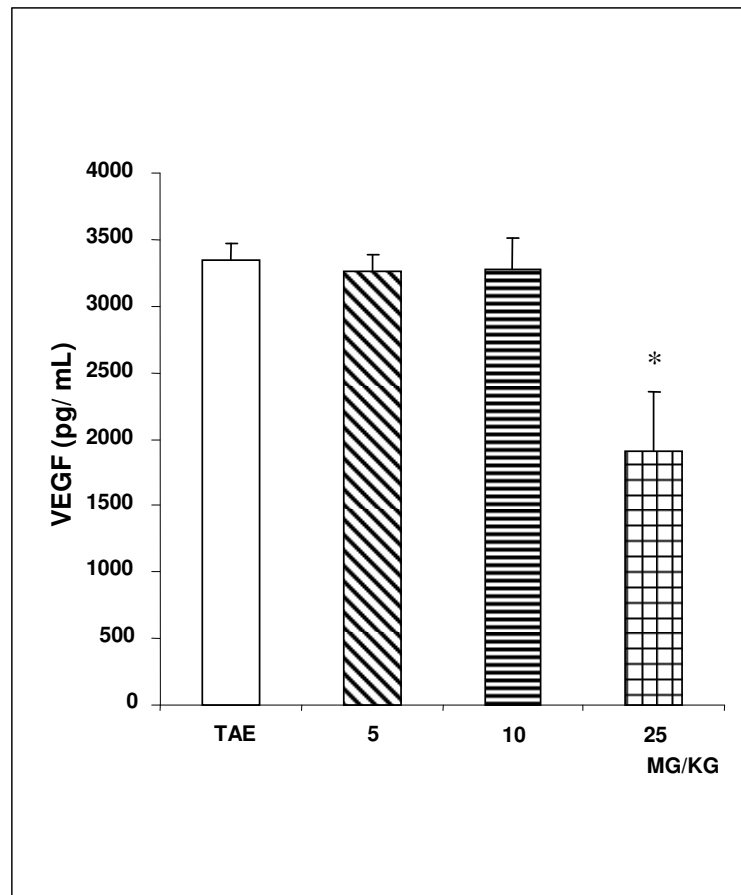


Figura 19: Níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - pg/mL), determinado pelo método Elisa, no líquido ascítico de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), tratados via IP, por 10 dias, com extrato bruto etanólico (EBE) de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia e de animais não tratados (TAE). Os valores acima representam a média $\pm$ desvio padrão de cada respectivo grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo não tratado (TAE).

4.3.6 Dosagem de Prostaglandina E₂

No entanto, nos níveis de prostaglandina E₂ determinado no líquido ascítico dos animais portadores de TAE e tratados com extrato bruto etanólico de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia, não se observou nenhuma alteração.

Os animais do grupo TAE apresentaram valores de PG E₂ 10.440 ± 67 pg/mL, enquanto que o grupo de animais tratados com a maior dose do EBE (25 mg/kg/dia) apresentou valor de PG E₂ 10.290 ± 356 pg/mL. Os valores obtidos não apresentaram nenhuma diferença significativa quando comparado ao grupo TAE, e estão apresentados na figura 20 e tabela 15 do apêndice.

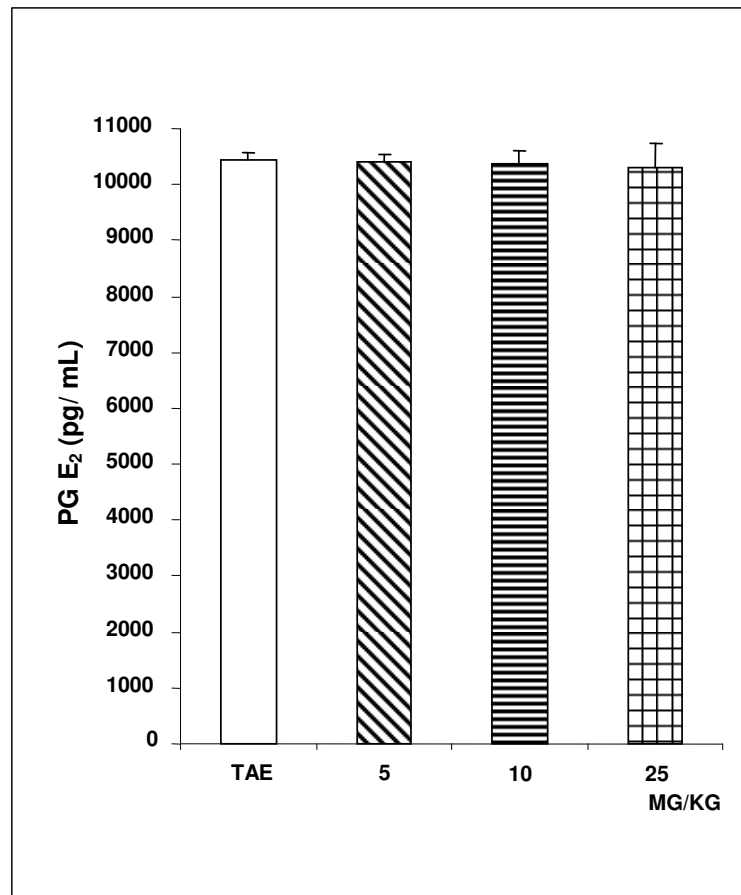


Figura 20: Níveis de prostaglandina E₂ (PG E₂ - pg/mL) determinado pelo método Elisa, no líquido ascítico de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), tratados via IP, por 10 dias, com extrato bruto etanólico (EBE) de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia e de animais não tratados (TAE). Os valores acima representam a média $\pm$ desvio padrão de cada respectivo grupo.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Os produtos naturais têm apresentado um papel significativo na descoberta de fármacos, em especial, no desenvolvimento de agentes contra o câncer e doenças inflamatórias.

Historicamente, as análises iniciais de novos compostos antineoplásicos baseiam-se na eficácia contra uma série de tumores murinos transplantáveis. No entanto, com o objetivo de superar possíveis limitações nas avaliações de compostos antitumorais, emprega-se atualmente, linhagens celulares derivadas de tumores humanos como forma de triagem e direcionamento (OLIVEIRA, 2003).

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* são métodos rápidos e racionais para a triagem de plantas, com atividade demonstrada positiva em um número enorme de espécies existentes (MATHUR et al. 2006). A citotoxicidade é um dos alvos da quimioterapêutica de atividade antitumoral, e muitos dos agentes antitumorais usados na clínica atualmente, possuem uma significativa atividade citotóxica em sistemas de cultura celular, bem como *in vivo* (AJITH; JANARDHANAN, 2003).

Muitos pesquisadores têm utilizado as culturas de células para avaliar a citotoxicidade de compostos com potencial atividade terapêutica de produtos naturais (AJITH; JANARDHANAN, 2003; BINCOLETTTO et al., 2005; CONEGERO et al., 2003; MELO, 2004; NAPOLITANO et al., 2005; OOI et al., 2004; SUNILA; KUTTAN, 2004; VOSS; EYOL; BERGER, 2006) e sintéticos (JENDIROBA et al., 2002; VALADARES et al., 2006b) e resultados promissores têm sido obtidos.

Neste estudo, foram investigados os efeitos antitumorais e antiangiogênico do extrato bruto de *S. umbellatum* e frações, utilizando o tumor ascítico de Ehrlich e a linhagem de célula K-562 para os ensaios *in vitro* e o modelo

de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich para as avaliações *in vivo*. Avaliou-se previamente, a atividade citotóxica do extrato bruto e das frações de *S. umbellatum*, *in vitro*, para posteriormente direcionar os ensaios *in vivo*.

Os resultados obtidos com os ensaios *in vitro* demonstraram que o extrato bruto etanólico, a fração clorofórmica e a fração hexânica apresentam potencial antitumoral, uma vez que foram capazes de interferir no crescimento e viabilidade das células do tumor ascítico de Ehrlich (carcinoma) e da linhagem leucêmica K-562 (tumor hematológico).

A citotoxicidade de *S. umbellatum* foi investigada usando os métodos de redução de MTT e o de exclusão do azul de Tripiano, fornecendo assim, os primeiros dados sobre a concentração inibitória 50% do EBE, das frações clorofórmica e hexânica nas 24 e 48 horas de incubação.

Os objetivos dos ensaios de citotoxicidade, realizados neste estudo, incluíram avaliar a integridade da membrana celular e atividade mitocondrial, os quais produzem informações da susceptibilidade das organelas celulares e compartimentos (ANAZETTI et al., 2003; LOVELAND et al., 1992; MELO et al., 2003).

O método de redução do MTT avalia a capacidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial em reduzir o MTT a cristais de formazan (NIU; ZHAO; JING, 2001; RIBEIRO-DIAS et al., 2000), mede a viabilidade celular baseada na endocitose, uma característica fundamental da maioria das células vivas (ANAZETTI et al. 2003; MOSMANN, 1983). E o teste azul de Tripiano permite uma avaliação da integridade estrutural da membrana celular (ANAZETTI et al. 2003; LOVELAND et al., 1992), ou seja, avalia a capacidade da célula de permitir a entrada do corante

através da membrana plasmática e depois expulsá-lo para o meio extracelular (OLIVEIRA, 2003; SCUDIERO; SHOEMAKER; PAULL, 1988).

Os resultados encontrados no teste de citotoxicidade, utilizando o método de redução do MTT, possibilitaram a determinação da concentração inibitória 50% (CI_{50}), do extrato bruto e das frações frente às células do TAE e da linhagem K-562. Os valores encontrados foram de aproximadamente 0,4; 0,1 e 0,08 mg/mL para o EBE, FC e FH, respectivamente. Considerando estas CI_{50} , verificou-se através do método de exclusão do azul de Tripiano, que o EBE, a FC e a FH inibiram a viabilidade celular do TAE e K-562 em aproximadamente 75%, 72% e 73 % e 95%, 58% e 64%, após 24 horas de exposição, respectivamente. Após 48 horas de exposição estes apresentaram redução de 92%, 82% e 90% da viabilidade celular do TAE e 99% da viabilidade das células K-562.

Estes resultados demonstraram que existe uma diferença nos valores de CI_{50} , determinada por cada método. No teste de redução do MTT, os valores encontrados foram maiores que no teste de exclusão do azul de Tripiano, pois considerando as mesmas concentrações dos extratos, a inibição celular foi maior. Estes dados podem ser explicados, pelo menos em parte, devido aos diferentes princípios dos métodos, pois no MTT apesar da membrana celular apresentar danos causados pela ação de *S. umbellatum*, as organelas citoplasmáticas, no caso, as mitocôndrias, ainda podem apresentar condições de realizar algumas das funções bioquímicas (OLIVEIRA, 2003).

Vários fatores podem interferir com a citotoxicidade, incluindo a concentração do agente químico, tempo de exposição, densidade e o tipo de célula. A duração da exposição e a concentração do fármaco apresentam uma relação com a atividade citotóxica, uma longa exposição pode aumentar a sensibilidade, além de

predizer os efeitos no ciclo celular e os efeitos cumulativos dos agentes (ANAZETTI et al., 2003; MELO et al., 2000). Observa-se, portanto, que nos ensaios de citotoxicidade, o tempo e a concentração de *S. umbellatum* interferiram nos seus efeitos.

Os resultados mostraram um efeito citotóxico concentração-dependente sendo que o EBE de *S. umbellatum*, foi o que melhor apresentou o efeito citotóxico, seguido da FH e da FC; achados como estes também foram observados por Conejero et al. (2003) em um estudo com a planta *Alchornea glandulosa* Poepp, uma Euphorbiaceae, onde o extrato bruto foi mais eficaz quando comparado com as frações.

Em adição a atividade citotóxica observada nos ensaios *in vitro* com *S. umbellatum*, foi avaliado as propriedades antitumorais do EBE, FC e FH desta planta, usando o modelo *in vivo* do tumor ascítico de Ehrlich.

Recentemente as propriedades antitumorais das Euphorbiaceae têm sido demonstradas por produzir citotoxicidade *in vivo*. Neste sentido, Baloch et al. (2007), demonstraram que o éster 12-deoxiforbol da *Euphorbia cornigera* Boiss tem uma importante atividade inibitória no crescimento e viabilidade de células KB (células de adenocarcinoma de nasofaringe). Luo e Wang (2006) documentaram o efeito anti-proliferativo de um diterpeno isolado da *Euphorbia fischeriana* Steud, nas células K-562 alcançando o ciclo celular na fase 1 e subsequentemente induzindo a apoptose.

Outro estudo demonstrou que a *Euphorbia cheiradenia* Boiss & Hohen induz fragmentação de DNA e apoptose em células K-562 (AMIRGHOFRAH et al., 2006). Além disso, Premaratna, Shadaksharaswamy e Nanjappa (1984b) mostraram

que lecitinas de *Synadenium grantii* prolongam a formação de fluido ascítico em ratos portadores de sarcoma ascítico de Yoshida.

E em relação a *S. umbellatum*, nenhum relato sobre a atividade antitumoral ou citotóxica foi encontrado na literatura, mas dados de estudos realizados por Valadares, Castro e Cunha (2007), mostraram que o extrato etanólico desta planta possui atividade mutagênica e citotóxica, dose-dependente, sobre as células da medula óssea de camundongos.

A implantação do TAE nos animais induz reação inflamatória local, com aumento da permeabilidade vascular o que resulta em uma formação intensa de edema, migração celular e uma progressiva formação de fluido ascítico (FECHIO et al. 1990).

Os estudos da avaliação da inibição tumoral, *in vivo*, nos animais inoculados com TAE e tratados com extrato de *S. umbellatum*, demonstraram que houve uma redução no crescimento do tumor de 36,6% para EBE 25 mg/kg/dia. Já a FC e a FH apresentaram inibição tumoral menor, de aproximadamente 10%. O número de células viáveis na cavidade peritoneal foi menor nos animais tratados com EBE.

Estes resultados foram corroborados com os da sobrevida, em que os animais tratados com EBE, na dose de 25mg/kg/dia, tiveram aumento na expectativa de vida.

Um dos critérios seguro para avaliação de fármacos anticâncer é o prolongamento da vida do animal (GUPTA et al., 2004; DONGRE et al., 2007) e este critério foi observado nos animais tratados com o EBE na dose de 25 mg/kg/dia.

Trabalhos na literatura sugerem que o perfil da resposta terapêutica de agentes com atividade tumoral, no modelo do tumor ascítico de Ehrlich, consiste na

reversão da profunda mielossupressão e do elevado nível de PG E₂ induzido pelo modelo tumoral (QUEIROZ et al., 2004; VALADARES et al., 2006b). São considerados resultados positivos aqueles que aumentam a taxa ou duração de sobrevida, reduz o crescimento do tumor na cavidade peritoneal e decresce o número de leucócitos no sangue (GUPTA et al., 2004; VALADARES et al., 2006b; DONGRE et al., 2007).

Na avaliação da sobrevida, o EBE apresentou atividade muito satisfatória, pois aumentou em 100% a probabilidade de sobrevida dos animais tratados com a dose de 25 mg/kg/dia, quando comparado ao grupo não tratado, mostrando-se superior, mesmo quando comparado com o antitumoral metotrexato, que apresentou um acréscimo de 32 % na expectativa de vida dos animais. Os achados com o MTX sobre a sobrevida podem ser explicados, devido aos diversos efeitos adversos que este fármaco causa, dentre eles estão a depressão da medula, lesões do epitélio gastrintestinal e nefrotoxicidade (RANG et al. 2003).

Estudos envolvendo extratos de origem vegetal, por exemplo, *Withania somnifera* (L.) Dunal (MELO, 2004), *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007), *Embllica officinalis* Gaertn (JOSE; KUTTAN; KUTTAN, 2001), *Euphorbia tirucalli* (VALADARES et al., 2006b), *Piper longum* Linn. (SUNILA; KUTTAN, 2004), demonstraram que a preservação da integridade da hematopoiese está intimamente associada à capacidade do fármaco de aumentar a taxa de sobrevida. Desta forma, fica evidente que este modelo experimental é uma valiosa ferramenta dentro da fase pré-clínica do desenvolvimento de novos fármacos.

Os principais problemas encontrados na quimioterapia do câncer são a mielossupressão e a anemia (GUPTA et al., 2004; RAJKAPOOR et al., 2007). A anemia que ocorre nos animais portadores de tumor é principalmente devido à

redução do número de hemácias ou produção de hemoglobina, e isto pode ocorrer por deficiência de ferro, por hemólise ou ainda por outras condições mielotóxicas (GUPTA et al. 2004; RAJKAPOOR et al., 2007). Neste contexto, o tratamento com *S. umbellatum* apresentou valores de hemoglobina sérica e hematócrito próximo aos níveis encontrados nos animais normais (não portadores de TAE). A diferença encontrada nestes valores, quando comparada ao grupo portador de TAE, foi significativa para o EBE na dose de 25 mg/kg/dia. Em relação aos valores hematimétricos alterados, encontrados no grupo TAE, deve-se a anemia que o tumor causa nos seus hospedeiros e no caso do MTX a presença de anemia pode ser devido à ação do fármaco como um antagonista dos folatos e por apresentar efeito depressor na hematopoiese. Estes dados sugerem que a atividade antitumoral evidenciada com o *S. umbellatum* não interfere com a linhagem eritróide da hematopoiese, pelo contrário, pode ser um indicativo de efeito protetor sobre a medula óssea. Resultados como estes, em que se observa uma reversão dos parâmetros hematológicos, já foram relatados por outros autores (DONGRE et al., 2007; GUPTA et al., 2004).

Os resultados em conjunto mostram um aumento da sobrevida, acompanhado de um quadro hematológico normal, nos animais tratados com EBE na dose de 25 mg/kg/dia, demonstrando claramente o efeito do EBE sobre o TAE. Outros estudos com plantas da família Euphorbiaceae, como a *Phyllanthus polyphylus* Wall (RAJKAPOOR et al., 2007) e a *Euphorbia tirucalli* (VALADARES et al., 2006b) também demonstraram aumento na sobrevida dos animais portadores de tumor quando tratados com extratos dessas espécies botânicas. Em relação ao estudo com a *Euphorbia tirucalli* um efeito hematoprotetor foi observado em paralelo à atividade antitumoral (VALADARES et al., 2006b).

A angiogênese é um dos mais importantes fatores envolvidos no desenvolvimento e progressão dos tumores humanos (FOLKMANN et al, 1989).

Estudos na literatura demonstram a angiogênese em animais portadores de TAE (GURURAJ et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2006) e está associado à presença de fatores indutores de angiogênese no fluido ascítico. Neste sentido, o envolvimento do VEGF na formação da ascite maligna encontra-se bem documentado (GURURAJ et al, 2002; LUO et al. 1998; LUO; TOYODA; SHIBUYA, 1998).

Na análise da formação dos vasos sanguíneos observou-se que os animais portadores de TAE apresentaram a região abdominal altamente vascularizada com vasos sanguíneos tortuosos, congestionados de eritrócitos e bem calibrosos, conforme descrito por Teixeira et al. (2006). Por outro lado, os animais tratados com EBE apresentaram vascularização similar àquela encontrada no grupo controle, sugerindo uma possível atividade da *S. umbellatum* como antiangiogênico.

Teixeira et al. (2006), estudaram a ativação da seqüência do desenvolvimento celular, angiogênese, inflamação e produção de citocinas no músculo abdominal de animais portadores de ascite e demonstraram que o TAE promove alterações na estrutura e na função do músculo abdominal, demonstraram também, que a vascularização da região peritoneal apresentava alterações bem visíveis e era invadida por células inflamatórias. E como conseqüências das alterações morfológicas no músculo, alterações bioquímicas e nas atividades funcionais também foram detectadas. O conteúdo de hemoglobina (índice vascular) junto com os níveis de citocinas pró-angiogênicas, VEGF e TNF- α aumentaram progressivamente no músculo seguindo o desenvolvimento da ascite. Alterações na

vascularização da região peritoneal e aumento nos níveis de VEGF também foram observados por Ferreira et al. (2007).

Para certificar sobre a possível ação do *S. umbellatum* na angiogênese, determinou-se os níveis de VEGF no fluido ascítico, pois, conforme demonstrado por Teixeira et al. (2006) e Ferreira et al. (2007), os níveis de VEGF encontram-se aumentado em animais portadores de TAE, o que torna um indicador importante e indiscutível para a avaliação da atividade antiangiogênica de compostos.

Os animais portadores de TAE tratados com EBE na dose de 25 mg/kg/dia, por 10 dias, apresentaram uma redução significativa nos níveis de VEGF, quando comparado ao grupo TAE, o que ratifica a ação do extrato sobre a vascularização, visto que o VEGF é um dos principais reguladores pró-angiogênicos, neste modelo experimental.

Estes resultados sugerem tanto um efeito direto sobre as células tumorais, quanto um efeito indireto envolvendo a ativação dos macrófagos e a inibição da permeabilidade vascular.

O VEGF é uma citocina que atua de maneira autócrina e parácrina, sendo um importante mitógeno para a proliferação de células endoteliais do TAE *in vivo* (SHEELA et al., 2006; SUNILA; KUTTAN, 2006) sendo uma citocina importante na angiogênese normal e anormal (SUNILA; KUTTAN, 2006).

Diversos estudos relataram a atividade de produtos naturais e da dieta sobre a angiogênese específica dos tumores, como exemplo, pode-se citar a curcumina (GURURAJ et al., 2002), a *Whithania somnifera* (MATHUR et al., 2006), *Glycyrrhiza glabra* L. (SHEELA; RAMAKRISHANA; SALIMATH, 2006) e *Piper longum* (SUNILA; KUTTAN, 2006). O resveratrol, um composto polifenólico encontrado nas uvas e em outras frutas, pode inibir efeitos angiogênicos induzido

por VEGF em células endoteliais de veias do cordão umbilical humano (PRADEEP; SUNILA; KUTTAN, 2005). Outros compostos originados de produtos naturais, como capsaicina (espécie *Capsicum*), a sanguinarina (*Sanguinaria canadensis* L.), ácido elágico (frutas), catequinas (chá verde) também inibiram o VEGF, e conseqüentemente, a angiogênese. Estes agentes parecem alvejar mecanismos comuns na angiogênese do tumor o que poderá permitir a identificação de alvos críticos para terapia e quimioprevenção antiangiogênica (PRADEEP; SUNILA; KUTTAN, 2005). Portanto, compostos que inibem os efeitos do VEGF apresentam potencial, para prover uma nova, efetiva e, bem tolerada terapia contra tumores, em especial os sólidos.

Estes agentes poderão oferecer uma nova oportunidade terapêutica para as outras doenças, nas quais a angiogênese desempenha um papel patológico importante.

Os inibidores da angiogênese mostram-se promissores como agente anticâncer e podem atuar tanto nos estágios pré-invasivos como invasivos do câncer (GHOSH; MAITY 2006; MATHUR et al., 2006; SHEELA; RAMAKRISHANA; SALIMATH, 2006).

Esses resultados mostram que há inibição da neovascularização pelo *S. umbellatum*, sobretudo, o EBE, na região peritoneal dos animais, em associação com a redução dos níveis de VEGF, confirmando assim, o potencial antiangiogênico encontrado nesta planta.

A prostaglandina E_2 regula a proliferação de linfócitos e inibe a atividade tumoricida dos macrófagos normais, já está bem estabelecido que a PG E_2 exerce uma retroalimentação negativa nos macrófagos e que os macrófagos dos animais portadores de tumor produzem mais PG E_2 que os macrófagos de animais normais

(BINCOLETTTO et al., 2005; FECHIO et al., 1990). A PG E₂ pode modular uma variedade de resposta imune, incluindo a mitogênese T-linfocítica, produção de linfocinas e citotoxicidade tumoral mediada por células NK e macrófagos. A imunossupressão pode está diretamente induzida por PG E₂ ou estas substâncias podem induzir células T-supressoras. A maioria das células mononucleares na cavidade peritoneal são macrófagos que são considerados as maiores células envolvidas na rejeição do tumor (BINCOLETTTO et al., 2005; PARHAR; LALA, 1988).

Os níveis de prostaglandina E₂ determinado no líquido ascítico dos animais tratados com o EBE não apresentaram alterações em relação ao grupo que não recebeu tratamento, apesar de estudos realizados por Oliveira (2007) com esta planta ter demonstrado atividade antiinflamatória.

Embora os mecanismos de ação envolvidos no efeito antitumoral do *S. umbellatum* não tenham sido totalmente esclarecidos, mecanismos como ativação da atividade imunomoduladora, atividade citotóxica sobre as células tumorais, além da capacidade de induzir alterações nos níveis de glutathione e capacidade de induzir apoptose e/ou necrose, são observados nos estudos de investigação de atividade tumoral de compostos (MELO, 2004; ORSOLIC; BASIC, 2005). São também, freqüentemente apontados como mecanismo importante dos compostos, a ação direta ou indireta nas células tumorais por estimulação das células hospedeiras, principalmente macrófagos. Tais estímulos poderão induzir produção e liberação de várias citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e óxido nítrico. Algumas dessas citocinas têm efeito citotóxico nas células tumorais, outras atuam em células ativando as células NK e linfócitos T citotóxicos (LIU et al. 1995; MELO, 2004; ORSOLIC; BASIC, 2005; YAMAMOTO et al. 1995). Em adição, estas citocinas poderão estimular a produção de proteína C reativa e fator complemento C3 que

deverá atuar como opsonização nas células tumorais. A combinação desses efeitos poderá impedir o crescimento tumoral e levar a eliminação de células tumorais (ORSOLIC; BASIC, 2005).

É provável que a atividade antitumoral do *S. umbellatum* seja o resultado das atividades sinérgicas dos compostos presentes no extrato sobre os mecanismos descritos.

Os dados apresentados mostram claramente que o *S. umbellatum* tem uma atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* e atividade antiangiogênica *in vivo*. Esta planta produz um efeito letal sobre as células tumorais, aumenta a sobrevida dos animais portadores de TAE, em associação com a diminuição da produção do VEGF. Sendo assim, estes resultados fornecem perspectivas interessantes para estudos posteriores de toxicologia e farmacologia da *S. umbellatum* como um candidato a fármaco anticâncer.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que:

✓ O EBE, a FC e a FH de *S. umbellatum* possuem efeito citotóxico concentração-dependente, sobre as células do tumor ascítico de Ehrlich e da linhagem leucêmica K-562. O EBE foi o que melhor apresentou o efeito citotóxico, seguido da FH e da FC.

✓ O EBE de *S. umbellatum* na dose de 25 mg/kg/dia apresentou um aumento na probabilidade de sobrevivência dos animais.

✓ O EBE de *S. umbellatum* na dose de 25 mg/kg/dia apresentou redução no crescimento tumoral

✓ O EBE de *S. umbellatum* na dose de 25 mg/kg/dia apresentou efeito sobre o quadro hematológico, reduzindo a anemia causada pelo tumor.

✓ O EBE *S. umbellatum* apresentou inibição da neovascularização na região peritoneal dos animais, associado à redução dos níveis de VEGF, confirmando assim, o potencial antiangiogênico desta planta.

✓ O *S. umbellatum* apresenta uma atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* e uma atividade antiangiogênica *in vivo*.

Perspectiva

7 PERSPECTIVA

Diante da conclusão obtida neste trabalho, torna-se importante apontar os seguintes aspectos para o prosseguimento dos estudos acerca da atividade antitumoral do *S. umbellatum*, dentre eles pode-se citar:

- ✓ Prospeção fitoquímica
- ✓ Isolamento e caracterização da substância bioativa
- ✓ Identificação do mecanismo de ação da atividade antitumoral e antiangiogênica
- ✓ Investigação da atividade mielotóxica e/ou mieloprotetora do extrato de *S. umbellatum* e das frações.
- ✓ Prosseguimento dos estudos toxicológicos e farmacológicos.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJITH, T. A.; JANARDHANAM, K.K. Cytotoxic and antitumor activities of polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 157-162, 2003.

ALMEIDA, V. L. de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo - celulares específicos e ciclo – celular não específico que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.118-129, 2005.

AMIRGHOFRAN, Z.; BAHMANI, M.; AZADMEHR, A.; JAVIDNIA, K. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. **J Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 132, p. 427-432, 2006.

ANAZETTI, M. C. et al. Comparative cytotoxicity of dimethylamide – crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL 60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**. v. 188, p. 261-274, 2003.

ARIAS, J. I. et al. Inflammation and câncer: is trophism the link? **Surgical Oncology**, v. 15, p. 235-242, 2006.

BAGAVATHI, R.; SORG, B.; HECKER, E. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. **Planta medica**. p. 506-512, 1988.

BALOGH, I. B.; BALOGH, M.K.; SAQIB, Q.N. Anti-tumor 12-deoxyphorbol esters from *Eufhorbia cornigera*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1-8, 2007. Doi: 10.1016/j.ejemech.2007.03.016.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal – As bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2004, 243 p.

BINCOLETTTO, C. et al. Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 679-688, 2005.

BLEBEA, J. et al. Differential effects of vascular growth factors on arterial and venous angiogenesis. **Journal of Vascular Surgery**, v. 35, n. 3, p. 532-538, 2002.

BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. **Plantas tóxicas**. 2006. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/sinitox/prognacional.htm> >. Acesso em 18.fev.2006.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa da incidência de câncer para 2008 no Brasil e nas cinco regiões**. 2007. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/conteudo> >. Acesso em 26.nov.2007.

BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 157-193.

BYRNE, A. M.; HAYES-BOUCHIER, D. J.; HARMEY, J. H. Angiogenic and survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 777-794, 2005.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. **Quimioterapia das doenças neoplásicas**. In: GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G ; LIMBIRD, L. E.– **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw – Hill, 2003, p. 1035-1039.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179 -189, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência Cultura**, v. 55, n. 33, p. 37-39, 2003.

CARIGNAN, J. R. **Biologia do câncer: carcinogênese, oncogenes e epidemiologia**. In: ROSENTHAL, S.; CARIGNAN, J. R.; SMITH, B. D. **Oncologia Prática – Cuidados com o paciente**. 2 ed. São Paulo: Revinter, 1995, cap. 1, p. 1-11.

CONEGERO, L. S. et al. Constituintes químicos de Alchornea glandulosa (Euphorbiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 825-827, 2003.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Robbins Patologia estrutural e funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, cap. 8, p. 233-293.

DE FLORA, S.; FERGUNSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**. v. 591, p. 8-15, 2005.

DONGRE, S. H. et al. Antitumor activity of the methanol extract of *Hypericum hookerianum* stem against Ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice. **Journal Pharmacology Sciences**, v. 103, p. 354-359, 2007.

DVORAK, H. F. Angiogenesis: update 2005. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 3, p. 1835-1842, 2005.

ELLIS, L. M. The role of neuropilins in cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 5, p. 1099-1107, 2006.

FECCHIO, D. et al. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich Tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 125-132, 1990.

FERREIRA, M. A. N. D. et al. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). **Life Sciences**, v. 81, p. 210 – 217, 2007.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: Di Stasi, L.C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 1996. p. 129-156.

FOLKMANN, J. et al. Induction of angiogenesis during the transition from hiperplasia to neoplasia. **Nature**, v. 339, p. 58-61, 1989.

GERWINS, P. et al., Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. **Critical Rev Oncology and Hematology**, v. 34, n. 3, p. 185-194, 2000.

GHOSH, S.; MAITY, P. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization in combination with cisplatin reduces EAC tumor growth. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1550-1559, 2006.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUPTA, M. et al. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcionoma in swiss albino mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, p. 177-184, 2004.

GURURAJ, A. E. et al. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 297, p. 934-942, 2002.

HAGEDORN, M.; BIKFALVI, A. Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. **Oncology Hematology**, v. 34, p. 89-110, 2000.

HARRIS, R. E.; BEEBE-DONK, J.; ALSHAFIE, G. A. Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **BMC Cancer**, v. 6, n. 27, p. 1-5, 2006.

HAYES, A. J.; LI, L. Y.; LIPPMAN, M. E. Science, medicine, and the future: antivasular therapy: a new approach to cancer treatment. **BMJ**, v. 318, p. 853-855, 1999.

HOTZ, H. G. et al. VEGF antisense therapy inhibits tumor growth and improves survival in experimental pancreatic cancer. **Surgery**, v. 137, n. 2, p. 192-199, 2005.

HUANG, T. H. M. Hierarchy of epigenetic networks in cancer genomes. **Acta Oncológica Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 562-564, 2004.

HULL, M. A.; KO, S. C.; HAWCROFT, G. Prostaglandin EP receptors: targets for treatment and prevention of colorectal cancer? **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 8, p. 1031-1039, 2004.

JAGER, A. K.; HUTCHINGS, A.; STADEN, van J. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 95-100, 1996.

JENDIROBA, D. B. et al. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapy-resistant leukemia cell lines by N-N-dimethylsphingosine. **Leukemia Research**, v. 26, p. 301-310, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 4. ed. São Paulo, 1977.

JOSE, J. K.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Antitumour activity of *Embllica officinalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 65-69, 2001.

KASHFI, K.; RIGAS, B. Non-COX-2 targets and cancer: Expanding the molecular target repertoire of chemoprevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 969-986, 2005.

KEEB, G.; LALA, P. K. Effects of Ehrlich ascites tumor transplantation in mice on the distribution of cells capable of forming hemopoietic colonies *in vitro*. **European Journal of Cancer**, v. 14, p. 331-342, 1978.

KESHET, E.; BEN-SASSON, S. A. Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 11, p. 1497-1501, 1999.

KINGHORN, D. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 69, n. 12, p. 1446-1447, 1980.

KLAASEN, C. D.; WATKINS III, J.B. *Casarett e Doull Toxicologia – a ciência básica dos tóxicos*. 5. ed. Portugal: Mc Graw – Hill, 2001, p. 153 – 244.

KUMAR, K. B. H.; KUTTAN, R. Chemoprotective activity of na extract of *Phyllanthus amarus* against cyclophosphamide induced toxicity in mice. **Phytomedicine**. v. 12, n. 6, p. 494 – 500, 2005.

LAPA, A. J. et al. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS/ UFSC, 2003, cap. 11, p.247 – 261.

LEWIN, B. Oncogenes e Câncer. In: **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001, cap. 28, p. 838 – 873.

LOVELAND, B. E. et al. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. **Biochemistry International**, v. 27 p. 501-510. 1992.

LIU, Z., SIMPSON, R. J.; CHEERS, C. Interaction of interleukin-6, tumour necrosis factor and interleukin-1 during *Listeria* infection. **Immunology**, v. 85, p. 562-567, 1995.

LUO, H., WANG, A. Induction of apoptosis in K562 cells by jolkinolide B. **Canadian Journal of Physiology Pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 959-965, 2006.

LUO, J. C.; TOYODA, M.; SHIBUYA, M. Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody. **Cancer Research**, v. 58, p. 2594-2600, 1998.

LUO, J. C. et al. Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. **Cancer Research**, v. 58, p. 2652-2660, 1998.

MACNEY, A. et al. Activation of the Epstein Barr virus lytic cycle by the latex of the plant *Euphorbia tirucalli*. **British Journal of Cancer**, v. 19, p. 1566-1569, 2003.

MAITY, P.; CHAKRABORTY, P.; BHATTACHARYA, P. Angiogenesis – a putative new approach in glutamine related therapy. **Pathology Oncology Research**, v. 5, n. 4, p. 309-314, 1999.

MANS, D. R. A.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: target plant collection as rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **The Oncologist**, v. 5, p. 185-198, 2000.

MATHUR, R. et al. Evaluation of the effect of *Withania somnifera* root extracts on cell cycle and angiogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 336-341, 2006.

MELO P. S. et al., Violacein and its beta – cyclodextrina complexes induce apoptosis and differentiation in HL 60 cells. **Toxicology**, v. 186, p. 217-225, 2003.

MELO, A. **Estudo da atividade imunomoduladora do extrato bruto de *Withania somnifera* em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich**. 2004. 126 p. Tese de Doutorado em Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas.

MENON, M. et al. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, f. **Plant Science**. v. 163, p. 131-139, 2002.

MORALES, J. R.; VÉLEZ, D.; SUBIZA, J. L. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Experiment Hematology**, v. 27, p. 1757-1767, 1999.

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

NAGY, J. A. et al. Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. **Cancer Research**, v. 55, p. 360-368, 1995.

NAPOLITANO, D. R. et al. Down – modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 37-41, 2005.

NASCIMENTO, F. R. F., et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v. 78, p. 2650 – 2653, 2006.

NIU, Q.; ZHAO, C.; JING, Z. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 251, p. 11-19, 2001.

OLIVEIRA, C. R. **Resposta hematopoiética em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com paladaciclos**. 2003. 106 p. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas.

OLIVEIRA, R. B. **Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e depressora do sistema nervoso central folhas do *Synadenium umbellatum* Pax. (Cola-Nota)**. 2007. 135 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 976 - 984, 2002.

OOI, L. S. M. et al. Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 117-122, 2004.

ORSÓLIĆ, N.; BÄSIC, I. Water – soluble derivate of própolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 37-45, 2005.

ORTÊNCIO, W. B. **Medicina popular do Centro Oeste**. 2 ed. Brasília: Theasaurus, 1997. 464 p.

PARHAR, R. S.; LALA, P. K. Prostaglandin E₂-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 44, p. 474-484, 1988.

PINEDO, H. M.; SLAMON, D. J. Translational Research: The Role of VEGF in Tumor Angiogenesis. **The Oncologist**, v. 5, n. 1, p. 1-2, 2000.

POURGHOLAMI, M. H. et al. Albendazole: a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor and malignant ascites formation in OVCAR-3 tumor-bearing nude mice. **Clinical Cancer Research**, v. 2, n. 6, p. 1928-1934, 2006.

PRADEEP, C. R.; SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. **Integrative Cancer Therapies**, v. 4, n. 4, p. 315-321, 2005.

PREMARATNA, A.; SHDAKSHARASWAMY, M.; NANJAPPA. Isolation, purification & properties of a lectin from the latex *Synadenium grantii* Hook f. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. v. 18, p. 32-35, 1984a.

PREMARATNA, A.; SHDAKSHARASWAMY, M.; NANJAPPA. Some Biological properties of *Synadenium grantii* Lectin. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 27, p. 91-97, 1984b.

QUEIROZ, M. L. S. et al. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v. 26, n. 4, p. 511-525, 2004.

QUER, P. F. **Plantas medicinales: el dioscórides renovado**. Barcelona: Editorial Labor, 1962.

RAHME, E. et al. Association between frequent use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs breast cancer. **BMC Cancer**, v. 5, n. 159, p. 1-8, 2005.

RAJESH, R. et al. Purification and characterization of 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, p. 1313-1322, 2006.

RAJKAPOOR, B. et al. Antitumour and cytotoxic effects of *Phyllanthus polyphyllus* on Ehrlich ascites carcinoma and human cancer cell lines. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 70149-1-7, 2007.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003, 904 p.

REBELLO, J. de M. **Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró – oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas**. 2005. 112 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; PRESTA, M. The discovery of angiogenic factors: A historical review. **General Pharmacology**, v. 35, p. 227-231, 2002.

RIBATTI, D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. **British Journal of Haematology**, v. 128, p. 303-309, 2004.

RIBEIRO-DIAS, F. et al. Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cells by MTT assay: differential inhibition by PGE₂ and EDTA. **Journal of Immunological Methods**, v. 241, p. 121-129, 2000.

ROGERIO, A. P. et al. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 795-804, 2007.

SALMON, S. E. ; SARTORELLI, A. C. **Quimioterapia do câncer**. In: KATSUNG, B. C. **Farmacologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 629-654.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS/ UFSC, 2003, cap. 15, p. 371-395.

SCHWARTSMANN, G. et al. Anticancer drug discovery and development throughout the world. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 18s, p. 47- 59, 2002.

SCUDIERO, D. A.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D. Evaluation of soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Research**, v. 48, p. 4827-4833, 1988.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MÁRQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **Letters Federation of European Societies**, v. 414, p. 1-6, 1997.

SHEELA, M. L.; RAMAKRISHANA, M. K.; SALIMATH, B. P. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 494-498, 2006.

SILVA, R. J. et al. Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom. **Mediators of Inflammation**, v. 11, p. 99-104, 2002.

SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zonthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**, 2007. DOI:10.1016/ejphar2007.07.065

SILVA, T.M.A. et al. Citotoxicidade do promotor de tumor e a sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36, n. 4, p. 237-239, 2004.

SOUZA, M. A. et al. Isolation and partial characterization of D-galactose-binding lectin from the latex *Synadenium carinatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, n. 5, p. 705-716, 2005.

SRIVASTAVA, V. et al. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5892-5908, 2005.

SUBIZA, J. L. et al. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. **International Journal Cancer**, v. 44, p. 307-314, 1989.

SUBIZA, J. L. et al. IgM response and resistance to ascites tumor growth. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 25, p. 87-92, 1987.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 339-346, 2004.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. *Piper longum* inhibits VEGF and proinflammatory cytokines and tumor-induced angiogenesis in C57BL/6 mice. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 733-741, 2006.

TEIXEIRA, A. S. et al. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. **Life Sciences**, v. 78, p. 1637-1645, 2006.

UZABAKILHO, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. Grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 11, p. 3041 - 3045, 1987.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, artigo no prelo. 2007.

VALADARES, M. C.; QUEIROZ, M. L. S. The effect of a Titanocene Dichloride derivate, $TiIV(C_5H_5)_2NCS_2$, on the haemotopoietic response of Ehrlich tumour – bearing mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 439, p. 35 – 42, 2002.

VALADARES, M. C. et al. Antitumour activity of [1,2-di(cyclopentadienyl)-1,2-di(p-N,N-dimethylaminophenyl)-ethanediyl] titanium dichloride in xenografted Ehrlich's ascites tumour. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, p. 264-270, 2006a.

VALADARES, M. C. et al. *Euphorbia tirucalli* L. Modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour – bearing mice. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 294-299, 2006b.

VEIGA JUNIOR, F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519 – 528, 2005.

VOSS, C.; EYOL, E.; BERGER, M. R. Identification of potent anticancer in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 3, p. 177-187, 2006.

WAGNER, A. D. et al. Anti-angiogenic therapy for metastatic colorectal cancer (Protocol for a Cochrane Review). **The Cochrane Library**, v. 2, 2007.

WANG, M.; HONN, K.V.; NIE, D. Cyclooxygenases, prostanoids and tumor progression. **Cancer metastasis**, v. 26, n. 3, p. 525-534, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **National cancer control programmes: polices and managerial guidelines**. 2. ed. 2002. Disponível em: < <http://www.who.int/cancer> >. Acesso em 04 fev 2006.

YAMAMOTO, N. et al., Regulatory mechanisms for production of IFN- γ and IFN - α by antitumour T-cells or macrophages in the tumour-bearing state. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 2281-2290, 1995.

YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B. Seleção, extração e identificação de drogas novas anticâncer de plantas brasileiras. **Acta Oncológica Brasileira**, v. 20, n. 1, p.15-20, 2000.

Apêndice

APÊNDICE A – Tabelas de dados

Tabela 1: Viabilidade de células do TAE e da linhagem K-562 (% em relação ao controle), após 24 e 48 horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, com diferentes concentrações de EBE de *S. umbellatum* (0,15 – 20 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três experimentos, em triplicata.

	EBE mg/mL	%	0,15	0,3	0,6	1,2	2,5	5	10	20
24H	TAE	Média	74,9	52,6	40,2	32,3	25,5	12,5	8,2	5,3
		DP	8,1	2,2	5,1	3,4	4,4	3,2	3,2	2,1
	K-562	Média	82	69,5	58,2	18,2	12,9	7,7	5,1	3,7
		DP	5,1	1,2	5,9	2,1	1,3	0,9	1,1	0,6
48H	TAE	Média	100	80,4	44,2	32,4	23,6	16,4	11,9	8,1
		DP	4,9	3,6	5,2	6,2	4,2	3,1	3,4	2,2
	K-562	Média	80	60,2	32,2	25,4	8,5	6,3	4,8	4
		DP	3,2	5,3	4,1	3,5	2,6	3,1	2,7	1,6

EBE = Extrato Bruto Etanólico

TAE = Tumor ascítico de Ehrlich

DP = Desvio Padrão

Tabela 2: Viabilidade de células do TAE e da linhagem K-562 (% em relação ao controle) após 24 e 48 horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, com diferentes concentrações de FC de *S. umbellatum* (0,018 – 2,32 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, em triplicata.

		FC mg/mL	%	0,018	0,035	0,07	0,14	0,29	0,58	1,16	2,32
24H	TAE	Média	100	100	95,6	60,3	28,3	20,3	11,9	6,1	
		DP	5,2	6,4	4,2	6,3	3,3	1,5	0,9	0,9	
	K-562	Média	98,6	90,3	83,1	66,2	35,3	9,5	4,1	2,4	
		DP	4,1	6,4	4,2	6,3	3,3	1,5	0,9	0,5	
48H	TAE	Média	100	100	91,7	79,9	32,4	22,1	14,6	10,9	
		DP	5,5	3,2	2,7	3,8	2,2	1,1	1,9	2,5	
	K-562	Média	100	100	98	83	36,2	24,4	15,6	8,8	
		DP	4,4	5,8	3,8	2,6	3,7	0,3	0,6	1,2	

FC = Fração Clorofórmica

TAE = Tumor ascítico de Ehrlich

DP = Desvio Padrão

Tabela 3: Viabilidade de células do TAE e da linhagem K-562 (% em relação ao controle), após 24 e 48 horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, com diferentes concentrações de FH de *S. umbellatum* (0,006 – 0,76 mg/mL). A atividade citotóxica foi determinada pelo método de redução do MTT. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, em triplicata.

	FH mg/mL	%	0,006	0,012	0,024	0,048	0,096	0,19	0,38	0,76
24H	TAE	Média	100	98,4	84,4	55,2	22,8	10,7	9,5	6,5
		DP	4,1	3,3	3,1	5,6	2,1	0,8	0,7	1,4
	K-562	Média	98,1	92,1	85,2	64,8	40,8	12,2	6,1	4,3
		DP	1,3	6,2	5,6	1,6	4,9	5,1	1,3	0,4
48H	TAE	Média	100	98,4	81,8	68,9	36,2	17,9	14,4	10,7
		DP	6,2	4,4	3,2	1,4	3,1	1,6	2,9	2,1
	K-562	Média	100	100	98,5	80,4	51	25,2	14,4	8,6
		DP	4,2	3,8	5,5	4,8	5,1	4,2	2,5	1,6

FH = Fração Hexânica

TAE = Tumor ascítico de Ehrlich

DP = Desvio Padrão

Tabela 4: Inibição celular do TAE e da linhagem leucêmica K-562 (% em relação ao controle), avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripiano, após 24 e 48 horas de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, com EBE (0,4 mg/mL), FC (0,1 mg/mL) e FH (0,08 mg/mL) de *S. umbellatum* em concentrações correspondentes as respectivas CI₅₀ encontrada no método de redução de MTT. Cada valor representa a média ± desvio padrão de três experimentos, em triplicata.

	Células	%	EBE 0,4 mg/mL	FC 0,1 mg/mL	FH 0,08mg/mL
24H	TAE	Média	74,7	71,5	72,4
		DP	4,3	4,2	6,2
	K-562	Média	94,6	57,6	63,7
		DP	1,2	4,2	4,3
48H	TAE	Média	91,4	81,5	89,8
		DP	4,6	3,4	1,3
	K-562	Média	99	99	99
		DP	0,2	0,5	0,4

EBE = Extrato Bruto Etanólico

FC = Fração Clorofórmica

FH = Fração Hexânica

TAE = Tumor ascítico de Ehrlich

DP = Desvio Padrão

Tabela 5: Efeito do EBE de *S. umbellatum* e do metotrexato (MTX) na sobrevivência de animais portadores de TAE. Os grupos de animais foram tratados com EBE nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2×10^6 de células de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte.

Dias de Observação	TAE	MTX 1,5 mg/kg/dia	5 mg/kg/dia	10 mg/kg/dia	25 mg/kg/dia
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	1	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	1	-	-
11	-	-	-	-	-
12	1	-	3	-	-
13	-	-	1	-	-
14	-	-	1	-	-
15	-	-	1	2	-
16	-	-	-	-	-
17	2	-	-	-	-
18	2	-	-	-	3
19	-	-	1	1	1
20	1	-	-	3	2
21	1	-	1	2	1
22	-	-	-	-	1
23	1	1	-	-	-
24	1	-	-	-	-
25	1	1	1	-	-
26	-	2	-	-	-
27	-	-	-	-	-
28	-	2	-	-	-
29	-	1	-	-	-
30	-	1	-	2	1
31	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-
33	-	1	-	-	-
34	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-

40	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	1

EBE = Extrato Bruto Etanólico
TAE = Tumor ascítico de Ehrlich
MTX = Metotrexato

Tabela 6: Efeito da FC de *S. umbellatum* e do metotrexato (MTX) na sobrevida de animais portadores TAE. Os grupos de animais foram tratados com FC nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2×10^6 de células de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte.

Dias de Observação	TAE	MTX 1,5 mg/kg/dia	1,2 mg/kg/dia	2,3 mg/kg/dia	5,8 mg/kg/dia
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	1	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	1
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	1	-
15	-	-	1	-	1
16	-	-	-	1	-
17	1	-	1	-	5
18	1	-	-	-	1
19	2	-	-	1	-
20	1	-	-	3	1
21	3	-	1	1	-
22	-	-	3	-	-
23	1	1	1	-	-
24	-	-	1	1	-
25	-	1	1	-	-
26	-	2	-	-	-
27	-	-	-	-	-
28	1	2	-	1	-
29	-	1	-	-	-
30	-	1	-	-	1
31	-	-	-	-	-
32	-	-	1	1	-
33	-	1	-	-	-

FC = Fração Clorofórmica

TAE = Tumor ascítico de Ehrlich

MTX = Metotrexato

Tabela 7: Efeito da FH de *S. umbellatum* e do metotrexato (MTX) na sobrevida de animais portadores de TAE. Os grupos de animais foram tratados com FH nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia e com MTX 1,5 mg/kg/dia, pela via intraperitoneal, por 10 dias, iniciando 24 h após a inoculação de 2×10^6 de células de TAE. Os animais do grupo controle (TAE) receberam somente o diluente. Os grupos de 10 animais foram observados diariamente até a morte.

Dias de Observação	TAE	MTX 1,5 mg/kg/dia	0,4 mg/kg/dia	0,8 mg/kg/dia	1,9 mg/kg/dia
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	1	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	1
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	1	1
14	2	-	-	2	-
15	-	-	-	-	-
16	2	-	3	2	2
17	4	-	1	1	1
18	1	-	-	2	-
19	-	-	2	1	3
20	-	-	1	-	1
21	-	-	2	-	-
22	1	-	-	1	-
23	-	1	-	-	-
24	-	-	-	-	-
25	-	1	-	-	1
26	-	2	-	-	-
27	-	-	-	-	-
28	-	2	-	-	-
29	-	1	1	-	-
30	-	1	-	-	-
31	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-
33	-	1	-	-	-

FH = Fração Hexânica

TAE = Tumor ascítico de Ehrlich

MTX = Metotrexato

Tabela 8: Avaliação da inibição tumoral em animais, inoculados com TAE e tratados por via IP, durante 10 dias, com EBE de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores representam o número de células tumorais multiplicado por 10^6 /mL e o percentual em relação a média do grupo controle (TAE). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.

	TAE		5		10		25		MTX 1,5	
	cél/mL	%	cél/mL	%	cél/mL	%	cél/mL	%	cél/mL	%
1	150	88,6	100	59,1	125	73,8	117	69,1	70	41,3
2	194	114,6	200	118,1	161	95,1	95	56,1	47	27,8
3	124	73,2	163	96,3	119	70,3	114	67,3	45	26,6
4	157	92,7	120	70,9	114	67,3	128	75,6	55	32,5
5	220	129,9	180	106,3	174	102,8	136	80,3	60	35,4
6	171	101,0	163	96,3	115	67,9	54	31,9	50	29,5
M	169,3	100,0	154,3	91,2	134,7	79,5	107,3*	63,4	53	31,3*
DP	33,9	20,0	37,5	22,1	26,1	15,4	29,6	17,5	11,5	6,8

TAE = Tumor Ascítico de Ehrlich

M = Média

DP = Desvio Padrão

Tabela 9: Avaliação da inibição tumoral em animais, inoculados com TAE e tratados por via IP, durante 10 dias, com a FC de *S. umbellatum* nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores representam o número de células tumorais multiplicado por 10^6 /mL e o percentual em relação a média do grupo controle (TAE). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.

	TAE		1,2		2,3		5,8		MTX 1,5	
	cél/mL	%	cél/mL	%	cél/mL	%	cél/mL	%	cél/mL	%
1	300	110,4	247	90,9	288	106,0	237	87,2	120	44,2
2	284	104,5	298	109,6	269	99,0	359	132,1	72	26,5
3	275	101,2	297	109,3	216	79,5	252	92,7	88	32,4
4	229	84,3	242	89,0	268	98,6	167	61,4	75	27,6
5	272	100,1	221	81,3	268	98,6	228	83,9	105	38,6
6	271	99,7	261	96,0	245	90,1	225	82,8	69	25,4
M	271,8	100,0	261,0	96,0	259,0	95,3	244,7	90,0	88,2	32,4*
DP	23,6	13,9	31,1	11,4	25,1	9,2	63,1	23,2	20,5	7,5

TAE = Tumor ascítico de Ehrlich

M = Média

DP = Desvio Padrão

Tabela 10: Avaliação da inibição tumoral em animais, inoculados com TAE e tratados por via IP, durante 10 dias, com a FH de *S. umbellatum* nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia e um grupo controle (TAE). Os valores representam o número de células tumorais multiplicado por 10^6 /mL e o percentual em relação a média do grupo controle (TAE). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.

	TAE		0,4		0,8		1,9		MTX 1,5	
	cél/mL	%	cél/mL	%	cél/mL	%	cél/mL	%	cél/mL	%
1	64	130,6	44	89,8	41	83,7	39	79,6	18	36,7
2	33	67,3	50	102,0	38	77,6	49	100,0	14	28,6
3	51	104,1	57	116,3	42	85,7	50	102,0	13	26,5
4	49	100,0	37	75,5	51	104,1	45	91,8	12	24,5
5	49	100,0	36	73,5	48	98,0	38	77,6	15	30,6
6	48	98,0	45	91,8	43	87,8	41	83,7	19	38,8
M	49,0	100,0	44,8	91,5	43,8	89,5	43,7	89,1	15,2	31,0*
DP	9,9	20,1	7,9	16,2	4,8	9,8	5,1	10,5	2,8	5,7

TAE = Tumor Ascítico de Ehrlich

M = Média

DP = Desvio Padrão

Tabela 11: Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) dos animais portadores de TAE e tratados, via IP, por 10 dias, com EBE de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia, metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e animais sem tumor (CTL). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.

	TAE		5		10		25		MTX 1,5		CTL	
	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht
1	11,7	49	12,1	55	12,4	51	14,9	53	10,1	43	13,0	48
2	11,2	43	11,5	45	13,0	56	14,5	58	12,1	49	12,0	58
3	10,9	41	11,2	44	12,0	52	11,9	49	10,4	44	13,0	53
4	11,1	45	13,1	52	13,1	51	10,9	44	9,6	40	12,4	54
5	9,4	40	11,4	48	12,0	43	13,0	53	9,9	41	12,8	52
6	10,8	42	11,8	51	11,0	50	10,3	59	11,6	45	13,4	48
M	10,8	43,3	11,9	49,2	12,2	50,5	12,6*	52,7*	10,6	43,7	12,8*	52,2*
DP	0,7	4,2	0,7	4,3	0,7	4,2	1,8	5,6	1,0	3,2	0,5	3,8

TAE = Tumor ascítico de Ehrlich

M = Média

DP = Desvio Padrão

CTL = Controle (sem tumor)

Hb = Hemoglobina

Ht = Hematócrito

Tabela 12: Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) de animais portadores de TAE e tratados, via IP, por 10 dias com FC de *S. umbellatum* nas doses de 1,2; 2,3 e 5,8 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e animais sem tumor (CTL). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.

	TAE		1,2		2,3		5,8		MTX 1,5		CTL	
	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht
1	11,7	49	13,1	45	11,7	48	11,6	55	10,1	43	13,0	48
2	11,2	43	12,6	49	10,1	45	11,6	45	12,1	49	12,0	58
3	10,9	41	12,3	51	13,2	46	13,1	46	10,4	44	13,0	53
4	11,1	45	14,2	52	12,8	46	12,5	48	9,6	40	12,4	54
5	9,4	40	11,7	50	13,2	52	12,5	49	9,9	41	12,8	52
6	10,8	42	12,1	47	11,5	45	13,2	49	9,3	45	13,4	48
M	10,8	43,3	12,7	49,0	12,1	47,0	12,4	48,7	10,6	43,7	12,8	52,2*
DP	0,7	3,3	0,9	2,6	1,2	2,7	0,7	3,5	1,0	3,2	0,5	3,8

TAE = Tumor Ascítico de Ehrlich

M = Média

DP = Desvio Padrão

CTL = Controle (sem tumor)

Hb = Hemoglobina

Ht = Hematócrito

Tabela 13: Níveis de hemoglobina sérica (g/dL) e de hematócrito (%) de animais portadores de TAE e tratados, via IP, por 10 dias com FH de *S. umbellatum* nas doses de 0,4; 0,8 e 1,9 mg/kg/dia; metotrexato (MTX) 1,5 mg/kg/dia; de animais não tratados (TAE) e animais sem tumor (CTL). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.

	TAE		0,4		0,8		1,9		MTX 1,5		CTL	
	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht	Hb	Ht
1	12,0	48	14,5	47	11,9	56	14,3	58	9,9	40	13,0	48
2	11,8	45	13,3	53	13,2	46	12,9	43	12,1	47	12,0	58
3	10,8	41	11,0	50	11,8	55	12,3	52	9,4	41	13,0	53
4	11,6	47	12,7	53	12,7	43	12,7	44	11,0	48	12,4	54
5	10,4	39	11,5	44	14,4	44	12,7	45	9,8	40	12,8	52
6	11,0	45	12,3	48	12,3	38	11,9	50	10,3	43	13,4	48
M	11,3	44,2	12,5	49,2	12,7	47,0	12,8	48,7	10,4	43,2	12,8	52,2*
DP	0,6	3,4	1,2	3,5	0,9	7,1	0,8	5,8	0,9	3,5	0,5	3,8

TAE = Tumor Ascítico de Ehrlich

M = Média

DP = Desvio Padrão

CTL = Controle (sem tumor)

Hb = Hemoglobina

Ht = Hematócrito

Tabela 14: Níveis de VEGF (pg/mL), determinado pelo método de Elisa, no líquido ascítico de animais portadores de TAE e tratados, via IP, por 10 dias, com EBE de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg/dia e de animais não tratados (TAE). ANOVA, teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TAE.

	TAE	5	10	25
1	3380	3445	3465	1370
2	3500	3100	3240	2550
3	3155	3180	2875	2205
4	3235	3210	3585	1940
5	3445	3365	3180	1465
6	3340	3250	3250	1900
MÉDIA	3342,5	3258,3	3270,0	1905,0*
DP	129,2	126,4	246,0	444,3

TAE = Tumor ascítico de Ehrlich
 DP = Desvio Padrão

Tabela 15: Níveis de PG E₂ (pg/mL) determinado pelo método de Elisa, no líquido ascítico de animais portadores de TAE e tratados, via IP, por 10 dias, com EBE de *S. umbellatum* nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg e de animais não tratados (TAE). ANOVA, teste de Tukey.

	TAE	5	10	25
1	10.528	10.354	10.203	9.578
2	10.328	10.453	10.378	10.328
3	10.428	10.453	10.403	10.403
4	10.478	10.428	10.428	10.428
5	10.453	10.403	10.378	10.528
6	10.428	10.412	10.378	10.478
MÉDIA	10.440	10.417	10.361	10.290
DP	67	37	80	356

TAE = Tumor Ascítico de Ehrlich

DP = Desvio Padrão