

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

INAIPI BOSSIERY ANDRADE GORGÔNIO DA NÓBREGA

EFEITO DO TRATAMENTO INTRALESIONAL DE SACARÍDEOS EXTRAÍDOS DO
MESOCARPO DE BABAÇU EM MODELO DE TUMOR SÓLIDO MURINO

São Luís,MA

2017

INAIPI BOSSIERY ANDRADE GORGÔNIO DA NÓBREGA

EFEITO DO TRATAMENTO INTRALESIONAL DE SACARÍDEOS EXTRAÍDOS DO
MESOCARPO DE BABAÇU EM MODELO DE TUMOR SÓLIDO MURINO

Monografia apresentada ao Curso de Medicina da
Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção
do título de Médico.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo
dos Santos.

São Luís,MA

2017

ANDRADE GORGÔNIO DA NÓBREGA, INAIPI BOSSIERY.

EFEITO DO TRATAMENTO INTRALESIONAL DE SACARÍDEOS
EXTRAÍDOS DO MESOCARPO DE BABAÇU EM MODELO DE TUMOR SÓLIDO
MURINO / INAIPI BOSSIERY ANDRADE GORGÔNIO DA NÓBREGA. -
2017.

37 p.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.
Monografia (Graduação) - Curso de Medicina,
Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS, 2017.

1. Câncer. 2. Mesocarpo de babaçu. 3. Tumor de
Ehrlich. I. Silva de Azevedo dos Santos, Ana Paula. II.
Título.

INAIPI BOSSIERY ANDRADE GORGÔNIO DA NÓBREGA

EFEITO DO TRATAMENTO INTRALESIONAL DE SACARÍDEOS EXTRAÍDOS DO
MESOCARPO DE BABAÇU EM MODELO DE TUMOR SÓLIDO MURINO

Artigo apresentado à coordenação do Curso de
Medicina da Universidade Federal do Maranhão, para a
obtenção do grau de Médico.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo
dos Santos.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos (**Orientadora**)

Doutora em Imunologia pela Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Izabel Cristina Portela Bógea Serra (**1º Examinador**)

Doutora em Biotecnologia - RENORBIO pela Universidade Federal do Maranhão

Profa. Pós-Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (**2º Examinador**)

Pós- doutora pelo Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Oncologia/INCA

Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva (**3º Examinador**)

Doutora em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Ora, Àquele que é poderoso para fazer tudo muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos, segundo o poder que em nós opera. (Efésios 3.20)

Obrigada,

Aos meus pais, Bossuet e Iracema, por terem sonhado meus sonhos, acreditado em mim e lutado tantas batalhas para que eu chegasse até aqui. Vocês são meu alicerce, minha fortaleza, meus amores. Quem eu sou, vem do exemplo de vocês!

Aos meus irmãos, por não desistirem de mim. Vocês são meus parceiros de brincadeiras, de sonhos e de vida.

Aos familiares, vocês me apoiaram, incentivaram, riram e choraram comigo. Essa vitória também é de vocês!

Aos meus grandes amigos que a Universidade Federal do Maranhão me presenteou: Crislaine Andrade, Luciano Vanolli, Vinícius Carneiro, Elisabeth Moraes, Einart Guedes e Gabriella Matos. Esse tempo passou suavemente por causa da companhia de vocês. As risadas, brincadeiras, puxões de orelha, tudo isso me mudou. Fez-me crescer e aprender como pessoa. Levo todos em meu coração!

Aos meus mestres, pelo conhecimento, pela dedicação e por terem acreditado em meu potencial. Em especial a Professora Doutora Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos. A definição mais genuína de educador pode lhe ser atribuída, pois seus ensinamentos suplantam o curto tempo de sala de aula, envolve companheirismo, amizade, além dos ensinamentos técnicos e de vida. Seu nome e seu exemplo estarão firmados em minha mente por onde eu caminhar.

A Luana, inicialmente companheira de laboratório, mas com seu jeito doce e cativante fizeram nascer uma verdadeira amizade. Obrigada por estar comigo nesse processo!

A Universidade Federal do Maranhão, ao Laboratório de Imunofisiologia e ao Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer.

Tudo envolvido na minha formação tem a ver com vocês, aqueles que amo, respeito, admiro e me inspiro. Hoje recebo o título de médica, também graças a vocês!

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

(Marie Skłodowska Curie)

RESUMO

O câncer representa um problema de saúde pública mundial definido como uma doença genética causada pela perda da homeostase e o crescimento desordenado das células. O sistema imunológico atua reconhecendo antígenos tumorais podendo ou não eliminar esses tumores, conceito de imunosseleção. Durante o reconhecimento pelas células imunes, receptores naturais na superfície de membranas são capazes de reconhecer moléculas, como os carboidratos. Eles estão em grande quantidade em compostos naturais, como o extrato aquoso do mesocarpo do babaçu, *Attalea speciosa*, que demonstraram em ensaios biológicos propriedades imunomodulatórias, propondo ser um adjuvante na imunoterapia antitumoral, testados em modelos experimentais. Este trabalho propõe avaliar a resposta imune antitumoral dos carboidratos do mesocarpo de babaçu em modelo experimental de Ehrlich. Para isso, 1g do pó do mesocarpo de babaçu foi extraído com água e, seguido de precipitação com etanol 80% aquecido em banho maria a 80°C por 15 minutos, relação droga:solvente (1:30). O material foi centrifugado e o sobrenadante concentrado em rotaevaporador. Para o ensaio da atividade biológica foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, inoculados via subcutânea com 5×10^6 células tumorais, na pata posterior direita e separados em quatro grupos (n=15/grupo): Controle, tratado com solução tampão fosfato salina; Ciclofosfamida (Ciclo) na dose 333mg/Kg; Polissacarídeos (Poli) recebeu a fração sacarídica na dose 166mg/Kg; e ciclofosfamida e polissacarídeos (Ciclo + Poli) nas doses respectivas de 166mg/kg e 83mg/Kg. O tratamento intralesional foi feito a cada três dias (dia: 3, 6, 9, 12 e 15). No décimo quinto dia, os animais foram sacrificados e avaliados o tamanho da pata, a celularidade nos órgãos linfóides (baço, medula e linfonodo poplíteo), dosagem de citocinas e enzimas hepáticas no soro. Os resultados mostraram que o polissacarídeo do babaçu não reduziu o crescimento do tumor, porém houve um aumento na celularidade da medula óssea, redução na produção de citocina MCP1 e baixos níveis de enzimas hepáticas no soro. Nossos dados sugerem que pelo tratamento intralesional, a fração sacarídica do mesocarpo de babaçu não tem efeito antitumoral direto *in loco*. Entretanto sistemicamente, reduziu a produção de citocina inflamatória e de enzimas hepáticas, além de melhorar a celularidade da medula, sugerindo efeitos positivos sobre a resposta imune e hepática do hospedeiro.

Palavras-chave: Tumor de Ehrlich, Mesocarpo de babaçu, Câncer

ABSTRACT

Cancer represents a worldwide public health problem defined as a genetic disease caused by loss of homeostasis and disordered growth of cells. The immune system acts by recognizing tumor antigens and may or may not eliminate these tumors, a concept of immunoselection. During recognition by immune cells, natural receptors on the surface of membranes are able to recognize molecules, such as carbohydrates. They are in great quantity in natural compounds, such as the aqueous extract of the babassu mesocarp, *Attalea speciosa*, which demonstrated in biological assays immunomodulatory properties, proposing to be an adjuvant in antitumor immunotherapy, tested in experimental models. This work proposes to evaluate the antitumor immune response of the carbohydrates of the babassu mesocarp in an Ehrlich experimental model. For this, 1g of the babassu mesocarp powder was extracted with water and, followed by precipitation with 80% ethanol heated in a water bath at 80 ° C for 15 minutes, drug:solvent ratio (1:30). The material was centrifuged and the supernatant concentrated in a rotary evaporator. For the biological activity assay, male Swiss mice inoculated subcutaneously with 5×10^6 tumor cells were used in the right hind paw and separated into four groups (n=15/group): Control, treated with phosphate buffered saline solution; Cyclophosphamide (Cycle) at the dose 333mg/kg; Polysaccharides (Poly) received the saccharide fraction at the dose 166mg/kg; And cyclophosphamide and polysaccharides (Cycle + Poly) at the respective doses of 166mg / kg and 83mg/kg. The intralesional treatment was done every three days (day: 3, 6, 9, 12 and 15). On the fifteenth day, the animals were sacrificed and the size of the paw, the cellularity in the lymphoid organs (spleen, medulla and popliteal lymph node), cytokine dosage and liver enzymes in the serum were evaluated. The results showed that the babassu polysaccharide did not reduce the tumor growth, but there was an increase in the cellularity of the bone marrow, reduction in the production of cytokine MCP1 and low levels of serum hepatic enzymes. Our data suggest that by intralesional treatment, the saccharidic fraction of the babassu mesocarp has no direct antitumor effect in loco. However, systemically, it reduced the production of inflammatory cytokine and liver enzymes, as well as improving marrow cellularity, suggesting positive effects on the immune and hepatic response of the host.

Key words: Ehrlich tumor, Mesocarp of babassu, Cancer

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ilustração do fruto da Palmeira do Babaçu	13
Figura 2. Desenho experimental para avaliação da atividade antitumoral	18
Figura 3. Crescimento do tumor sólido após o tratamento intralesional com polissacárideos de babaçu	21
Tabela 1. Efeito do tratamento com a fração polissacarídica do mesocarpo de babaçu sobre órgãos linfoides	23
Figura 4. Concentração de Proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1) no soro	24
Figura 5. Efeitos do tratamento da fração polissacarídica sobre as enzimas hepáticas .	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CICLO – Ciclofosfamida

CICLO + POLI – Ciclofosfamida + Polissacarídeo

DNA - Ácido Desoxirribo Nucleico (do inglês *Deoxyribo Nucleic Acid*)

GOT – Transaminase Glutamico-oxálica

GPT – Transaminase Glutamico-pirúvica

IFN- γ – Interferon Gama

IL - Interleucina

LDH – Desidrogenase Lactica (do inglês *Lactate Dehydrogenase*)

MBL – Mannose Binding Lectin

MCPI – Proteína Quimiotática de Monócito (do inglês *Momocute Chemotactic Protein 1*)

MO – Medula Óssea

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

PBS – Solução Tampão Fosfato (do inglês *Phosphate Buffer Saline*)

POLI - Polissacarídeo

TNF – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
ANEXO.....	37

1. INTRODUÇÃO

O câncer é atualmente responsável por uma em cada seis mortes no mundo. Mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer todos os anos, e esse número deve subir para mais de 21 milhões de pessoas em 2030. Progressos e fortalecimentos no diagnóstico precoce, por meio da oferta de tratamento e diagnóstico básico para todos, podem ajudar os países a atingir metas nacionais ligadas aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), segundo a agência da Organização das Nações Unidas (ONU). (ONU, 2017)

A estimativa para o Brasil, no biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 60 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, decorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado equipara-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes (INCA, 2015).

Globalmente, mais de 70% de todas as mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda, que têm poucos ou nenhum recurso para a prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer. Independentemente do nível de recursos, todos os países podem implementar os quatro componentes básicos do controle do câncer: prevenção, detecção precoce, diagnóstico e tratamento e cuidados paliativos, e assim evitar e curar muitos cânceres, bem como paliativos do sofrimento (OMS, 2017).

Dentro dessa perspectiva, entende-se o câncer como uma doença genética com o processo de formação, carcinogênese, em geral se dando lentamente, e podendo levar vários anos até que uma célula cancerosa origine um tumor indetectável (ALMEIDA *et al.*, 2005). O dano ao DNA é a condição básica para a perda da homeostase tecidual e o crescimento desordenado das células (DENDULURI, 2004). Esse envolve seis alterações essenciais na fisiologia celular que, coletivamente, determinam o crescimento maligno: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, evasão de morte celular (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão e metástase do tecido. Cada uma destas alterações fisiológicas - novas capacidades adquiridas durante o desenvolvimento do tumor - representa a ruptura bem-sucedida de um mecanismo de defesa contra o câncer ligado às células e tecidos. Propõe-se que estas seis capacidades são compartilhadas em comum pela maioria e talvez por todos os tipos de tumores humanos. Esta

multiplicidade de defesas pode explicar por que o câncer é relativamente raro durante uma vida humana média (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Secundariamente, fala-se sobre o conceito de vigilância imunológica, em que o sistema imune é capaz de reconhecer e eliminar tumores em desenvolvimento, podendo assim evitar o surgimento de tumores clinicamente aparentes, mesmo na ausência de intervenção terapêutica. Com o desenvolvimento de novas tecnologias científicas, tais como modelos animais, anticorpos específicos e mutações gênicas dirigidas, foi possível investigar experimentalmente a existência não só de uma vigilância, mas também da imunoeedição (DUNN e SCHREIBER, 2004; ZITVOGEL, TESNIERE e KROEMER, 2006). A imunoeedição é composta por três fases: eliminação, equilíbrio e escape, conhecidos como os três “Es”. A fase da eliminação, em que células malignas ou pré-malignas são reconhecidas e destruídas pelo sistema imunológico, constitui a teoria original da vigilância imunológica. O equilíbrio representa uma fase dinâmica, podendo ser capaz de durar até anos, em que elementos do sistema imune, atuando contra as células tumorais, são capazes de controlá-las, porém não de eliminando-as completamente. Assim, há uma resposta imune que exerce pressão seletiva num conjunto de células neoplásicas instáveis e continuamente sujeitas a mutação. O resultado é uma seleção “darwiniana”, em que sobrevivem e replicam-se células tumorais mais resistentes à atuação imune, com reduzida imunogenicidade, formando uma nova população clonal no tumor, processo é também chamado imunosseleção. Quando os clones tumorais resistentes são selecionados para poderem crescer independentemente de uma resposta imunológica normal e competente, chega-se a fase do escape, em que as células neoplásicas fogem do controle imunológico (ZITVOGEL, TESNIERE e KROEMER, 2006; DUNN e SCHREIBER, 2004; ONUCHIC e CHAMMAS, 2010).

A evolução da imunologia molecular e celular, das interações existentes entre os tumores e mecanismos de reconhecimento imune do hospedeiro têm melhorado expressivamente, tornando notória a oportunidade para o desenvolvimento de terapias antitumorais (KHONG, 2004; RESTIFO e ROSENBERG, 2005).

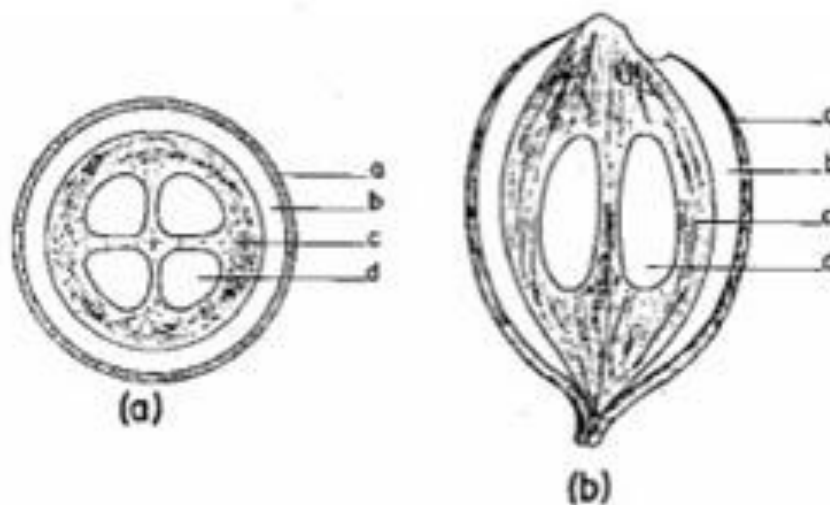
O sistema imunológico pode ser ativado por substâncias presentes na superfície celular através de receptores naturais capazes de reconhecer moléculas, como os carboidratos, que se apresentam na forma de glicolipídeos, glicoproteínas e polissacarídeos (BOETTNER, 2002). Os carboidratos adquirem uma maior visibilidade quando atuam como sinalizadores e receptores, fazendo com que a comunicação entre

moléculas e outras células seja estabelecida. A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína ligadora de carboidrato, presente no soro humano, que participa do sistema imune inato (SHARMA *et al.*, 2008), elas apresentam domínios de reconhecimento de carboidrato e ligam-se a estruturas de manose presentes na superfície de patógenos proporcionando a opsonização e fagocitose dos microorganismos (JANEWAY *et al.*, 2002; TEIJO, 2002). Sabe-se também que a MBL exerce influência na modulação da resposta inflamatória (TAKAHASHI *et al.*, 2006), por estimulação e liberação de citocinas por monócitos de maneira dose-dependente (JACK *et al.*, 2001).

Estudos feitos com o extrato aquoso do mesocarpo de babaçu evidenciaram uma composição rica de carboidratos em sua estrutura (SILVA e PARENTE, 2001). Estas biomoléculas têm sido estudadas pela sua relevância em processos endógenos diversos como, por exemplo, na ativação do sistema imune (ELISANDRA *et al.*, 2007).

O fruto do babaçu (*Attalea speciosa* Mart.) é conhecido como coco, têm formas elipsoidais, parecendo cilindros, e constitui-se em quatro partes principais: o epicarpo (camada externa dura e fibrosa), o mesocarpo (camada fibrosa intermediária, rica em amido e localizada entre o epicarpo e o endocarpo), o endocarpo (camada interna onde permanece a amêndoa) e a amêndoa (massa de nutrientes, com interior branco, coberto com uma película de cor marrom) (BARROS, 2011). A disposição física do fruto do babaçu (*Orbignya* sp) inclui quatro partes aproveitáveis: epicarpo (11%), mesocarpo (23%), endocarpo (59%) e amêndoa (7%) (SOLER *et al.*, 2007).

Figura 1: Ilustração do fruto da Palmeira do Babaçu



Fonte: Emmerich, 1987. Cortes transversal (a) e longitudinal (b). Componentes: a. epicarpo, b. mesocarpo, c. endocarpo, d. amêndoa.

O babaçu produz frutos contendo várias amêndoas que são comercializadas para fins industriais e também consumidas como alimento (EMBRAPA, 1984). A partir disso, o governo federal vem incentivando o uso da farinha do mesocarpo de babaçu como um dos ingredientes a ser adicionado à merenda escolar em algumas comunidades do interior do Maranhão (SOUZA, 2009).

Além da amêndoa, o fruto também produz uma farinha a partir do mesocarpo que, segundo relatos populares, apresenta propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (LAGOS, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006). Essa farinha tem em sua composição 68,3% de amido, 1,54% de proteínas; 0,27% de lipídios; 1,25% de glicídios solúveis; 2,51% de fibras e aminoácidos (ROSENTHAL, 1975).

A farinha do mesocarpo de babaçu apresenta propriedades utilizadas na prática popular, como no tratamento de feridas crônicas, úlceras gástricas, úlceras duodenais, diversas inflamações, como uterinas e de ovários, artrite e tumores (SANTOS, POZETTI e VARANDA, 2006), além de propriedades biológicas, como anti-inflamatórias e imunomoduladoras (BARROQUEIRO, 2001b), cicatrizante (FERREIRA *et al.*, 2006), de hemaglutinação e hemólise por ativação do sistema do sistema complemento (ARAÚJO *et al.*, 2013), ativação de macrófagos peritoneais *in vitro* e *in vivo* (NASCIMENTO *et al.*, 2006), efeito antitrombótico (AZEVEDO *et al.*, 2007; FARIAS *et al.*, 2008).

Observadas essas propriedades do mesocarpo do babaçu, tem-se utilizado modelos experimentais no estudo da ação de componentes químicos, físicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, citogenética e terapêutica de células tumorais (SEGURA, BARBERO e MÁRQUEZ, 2000; MADY, 2002; PALERMO-NETO, 2003; SILVA, 2003).

As vantagens da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais, recaem sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo (STEWART, 1959). Como exemplo, o tumor de Ehrlich, que é uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específica e corresponde ao adenocarcinoma mamário de murinos. Cresce em várias linhagens dessa espécie animal na forma ascítica, quando inoculado intraperitonealmente, e na forma sólida, quando inoculado no subcutâneo (EHRlich, 1906).

Considerando sua atividade imunomoduladora e a composição rica em

carboidratos, sugere-se a hipótese de que os carboidratos extraídos do mesocarpo de babaçu poderiam atuar na resposta imune antitumoral. Para isso o presente estudo se propõe a avaliar o efeito do tratamento intralesional das frações ricas em carboidratos, obtidas do mesocarpo da *Attalea speciosa* Mart., no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar atividade antitumoral da fração rica em carboidratos obtida do mesocarpo da *Attalea speciosa* Mart. em modelo murinho de tumor sólido.

2.2. Específicos

- Determinar o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich durante tratamento com a fração sacarídica obtida do mesocarpo de babaçu.
- Quantificar as células dos órgãos linfoides: baço, linfonodo drenante e medula óssea, nos animais com tumor sólido de Ehrlich.
- Determinação da concentração de citocinas e das enzimas hepáticas no soro dos animais com tumor sólido de Ehrlich tratados com a fração sacarídica obtida do mesocarpo de babaçu.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área e período de estudo

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Imunofisiologia-UFMA com execução estimada para um período de vinte e quatro meses, iniciando em 2013. O projeto faz parte de um projeto maior financiado (APP-UNIVERSAL 373/12–INFRA 00938/12 – FAPEMA), aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFMA sob o número 006808/2011-62 (Anexo).

3.1 Coleta das amostras

Amostras de mesocarpo *Attalea speciosa* Mart. (babaçu) foram obtidas no município Esperantinópolis do estado do Maranhão (*in natura*) que foram devidamente acondicionadas, conservado em temperatura ambiente e devidamente identificado.

3.3 Preparação do extrato e obtenção da fração polissacarídica

Foi pesado 1g do pó do mesocarpo de babaçu e submetido à extração aquosa e precipitação etanólica 80% (30mL) em banho maria a 80°C por 15 minutos, com uma relação droga:solvente (1:30). Após esta etapa, o material foi centrifugado (1358xg, 15 min., 25°C), com a finalidade de separar o extrato aquoso e etanólico do material residual, sendo este procedimento repetido por quatro vezes. Os sobrenadantes (extratos etanólicos e aquoso) obtidos foram concentrados em evaporador rotatório até pequeno volume (CARVALHO,1998). Com a finalidade de obter os polissacarídeos, o extrato aquoso concentrado foi tratado com etanol PA (3:1 v/v) para obtenção dos precipitados de carboidratos de peso molecular maior. (WAGNER *et al.*, 2004; NEVES, 2007).

3.4 Tratamentos in vivo

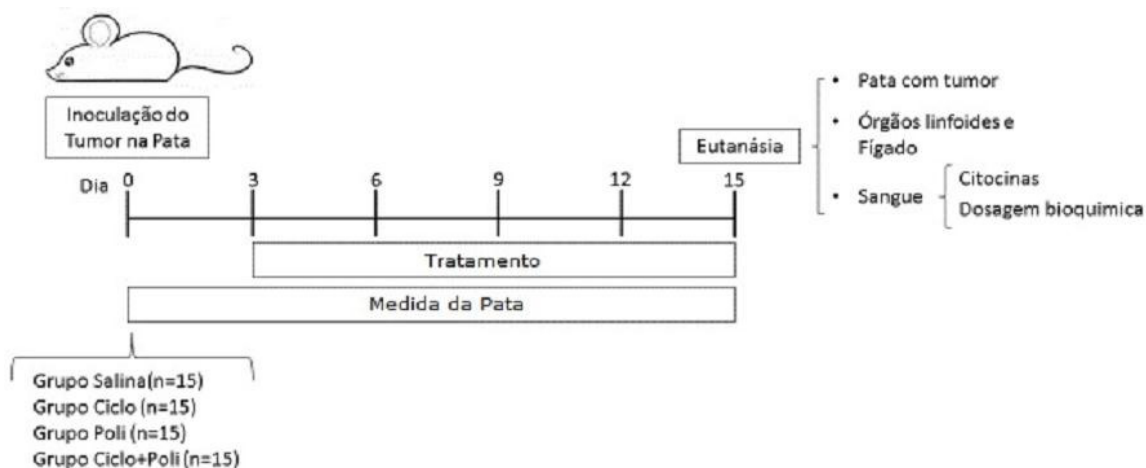
Foram usados para os ensaios camundongos Swiss machos (n=60), com 60 dias de idade, cedidos pelo Biotério da Universidade Federal do Maranhão. Os animais

foram adaptados ao Biotério Experimental por 10 dias, mantidos em ambiente com temperatura e umidade monitorada e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, com água e ração *ad libitum*.

3.5 Ensaio de atividade antitumoral

Os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos (n=15/grupo). A indução do tumor foi realizada após por inóculo intralesional na pata inferior direita de 20 μ L de 5x10⁶ das células tumorais. Após a inoculação, o tratamento intralesional nos animais do grupo Salina foi realizado com 20 μ L de solução tamponada de fosfato (salina); os animais do grupo Ciclo foram tratados com 20 μ L de Ciclofosfamida na concentração de 750 mg/mL (Dose: 333mg/Kg); os animais do grupo Poli receberam 20 μ L da fração polissacarídica obtida do mesocarpo de babaçu 0,274 mg/mL (Dose:166mg/Kg); os animais do grupo Ciclo+Poli receberam 10 μ L da fração sacarídica na concentração de 0,274 mg/mL (Dose: 83mg/Kg)) e 10 μ L de Ciclofosfamida na concentração de 750 mg/mL (Dose: 166mg/Kg), seis vezes com intervalo de três dias, totalizando 15 dias de tratamento. No décimo quinto dia, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico. O desenvolvimento do tumor sólido foi avaliado a cada três dias por registro fotográfico e medida da espessura com paquímetro. No 15^o dia as patas foram removidas e pesadas (Figura 2). Os valores de peso e medida do tumor foram determinados pela diferença dos valores da pata inoculada com tumor e os valores referentes à pata sem tumor.

Figura 2: Desenho experimental para avaliação da atividade antitumoral



Fonte: Elaborada pela autora

3.6 Obtenção dos órgãos

Para obtenção dos órgãos linfóides primeiramente os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico (Xilazina 10 mg/Kg + 100 mg/Kg Quetamina + PBS), depois foi feita uma incisão no abdômen e a retirada dos órgãos, estes foram separados em placas de petri pequenas e foram pesados.

3.6.1 Órgãos linfóides

Para obtenção e quantificação das células do linfonodo (poplíteo) e baço, os órgãos foram retirados e triturados em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino. Para obtenção das células da medula óssea, o fêmur foi retirado e perfundido com 1 mL de PBS. Para determinar o número total de células, 90 µL das suspensões celulares do linfonodo, baço e medula óssea foram adicionados a 10 µL de cristal violeta. As células foram contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

3.7 Coleta do sangue e separação do soro

A coleta sanguínea foi realizada nos animais anestesiados. Foi coletada amostra de sangue através da retirada pelo plexo retro-orbital dos camundongos, e colocada em tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro. A amostra de sangue total foi centrifugada e separada para o isolamento do soro que possibilitou as avaliações posteriores.

3.8 Dosagem de Citocinas

O Kit CBA (BD) (cytometric beads array) foi usado nesse estudo para a quantificação das citocinas IL-6, INF γ , TNF, IL-4, IL-10, MCP-1 e IL-12p70 em uma mesma amostra. Seis populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL3 do citômetro de fluxo FACScalibur (BD).

As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, as *beads* de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "em sanduíche". Os tubos para aquisição foram preparados com: 50 μ L de amostra, 50 μ L da mistura de *beads* e 50 μ L do reagente de detecção. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogeneizados e incubados por três horas, em temperatura ambiente, no escuro. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software FCAP (BD).

3.9 Determinação da Desidrogenase Láctica e Transaminases

As amostras de soro foram alíquotadas e mantidas sob refrigeração a -20°C . As determinações dos analitos bioquímicos foram realizadas através de kits da Labtest, seguindo as orientações do fabricante. As análises foram determinadas por métodos colorimétricos utilizando espectrofotômetro (SPECTRA max PLUS 384)

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, sendo aplicado aos testes que apresentaram distribuição normal o teste *t de student* para comparação de pares e o teste ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey para comparação dos grupos. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e o nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 O tratamento intralesional com fração polissacarídica obtida do mesocarpo de babaçu não foi eficiente para reduzir o crescimento do tumor

A fração polissacarídica obtida do mesocarpo de babaçu foi utilizada no tratamento do tumor sólido por via intralesional. Durante o tratamento foi observado que não houve alteração no peso dos animais, bem como não foi observada alteração no tamanho das patas inoculadas com tumor (Figura 3A). Entretanto quando avaliado a área sob a curva, o grupo que recebeu Ciclofosfamida apresentou uma redução no tamanho da pata ao longo do tratamento, quando comparado com o grupo PBS. O grupo que recebeu o tratamento associado de Ciclofosfamida e fração sacarídica do mesocarpo de babaçu (Ciclo+Poli) não mostrou diferença com o grupo PBS, sugerindo menor eficácia (Figura 3B).

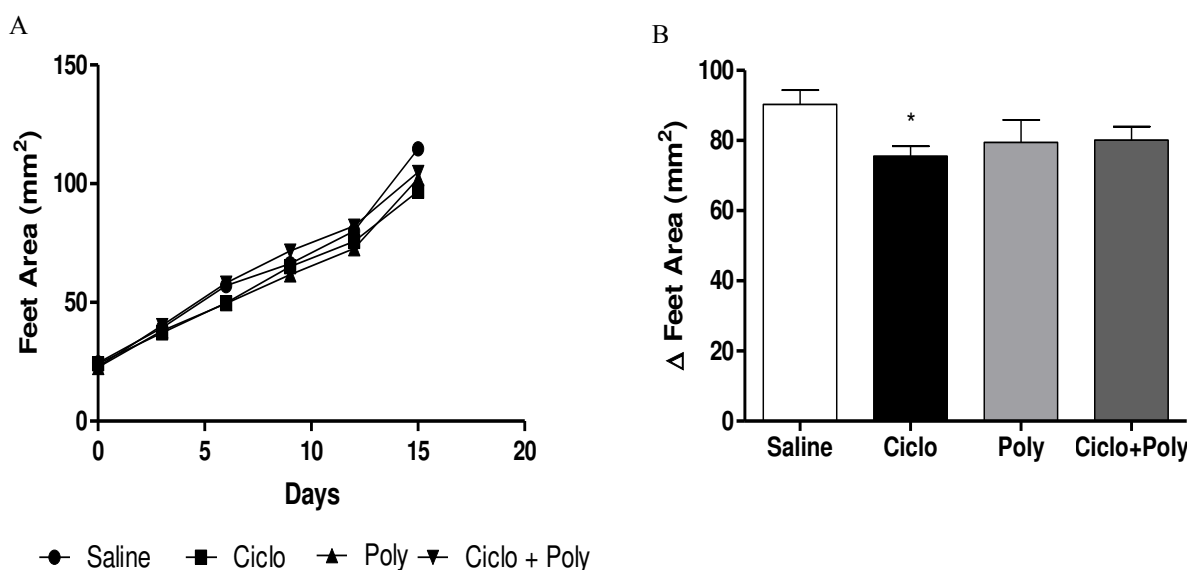


Figura 3: Crescimento do tumor sólido após o tratamento intralesional com polissacarídeos de babaçu. (A) Curva Cinética de Crescimento Tumoral durante 15 dias e (B) Área sob a curva após o tratamento com solução tamponada de fosfato (Salina), Ciclofosfamida (Ciclo), fração polissacarídica de babaçu (Poli) ou Ciclofosfamida associada com a fração polissacarídica de babaçu (Ciclo + Poli), por vias intralesional. As barras representam a média \pm DP. * para $p < 0,05$ em comparação com o grupo Salina. Teste ANOVA *one-way* seguida por teste de comparação múltipla de Tukey ($n=15$ /grupo).

Os resultados sugerem que o tratamento intralesional não foi eficaz em inibir o crescimento do tumor. Este dado pode sugerir que o tratamento não apresentou um efeito citotóxico direto. Entretanto, o ambiente tumoral depende de outros fatores que podem simular a massa tumoral, como influxo de células inflamatórias para a região tumoral promovendo o crescimento desse tumor devido à angiogênese e aos fatores de crescimento induzidos pela resposta inflamatória e que são necessários para o desenvolvimento do tumor (BERGAMI-SANTOS, MARIANO e BARBUTO, 2004; SEGURA, BARBERO e MÁRQUEZ, 2000). Segundo Verçosa *et al.*, deve-se ressaltar que a avaliação realizada relativa do peso tumoral está sujeita a um grande número de interferências, tais como a existência de processo inflamatório e de edemas nas regiões periféricas à massa tumoral, que podem interferir na adequada avaliação do peso, não proporcionando uma aferição tão compatível, sendo necessário estudo histológico para avaliação da presença de infiltrados inflamatórios e a real massa tumoral.

Para então se determinar possíveis efeitos indiretos do tratamento com a fração polissacarídica do mesocarpo de babaçu, foram também avaliados os órgãos linfoides.

4.2 O tratamento intralesional com a fração polissacarídica obtida do mesocarpo de babaçu alterou a celularidade da medula óssea

Os resultados de celularidade dos órgãos linfoides mostraram que o tratamento não alterou o peso do baço e o número de esplenócitos, de célula do linfonodo drenante. Entretanto, a contagem de células da medula mostrou que o tratamento com a ciclofosfamida apresentou uma redução no número de células. Por outro lado, tratamento com a fração polissacarídica isoladamente (Grupo Poli) ou em associação com a ciclofosfamida (Grupo Ciclo + Poli) não modificou o número de células da medula óssea, quando comparado ao grupo tratado com ciclofosfamida. (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito do tratamento com a fração polissacarídica do mesocarpo de babaçu sobre órgãos linfóides.

	Salina	Ciclo	Poli	Ciclo+Poli
Peso do baço (g)	0.36 ± 0.023	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.022	0.34 ± 0.026
Células do baço (x10 ⁶ /mL)	45.23 ± 3.6	46.97 ± 1.5	49.48 ± 3.5	49.61 ± 4.0
Células do linfonodo (x10 ⁶ /mL)	1.65 ± 0.33	1.07 ± 0.20	1.19 ± 0.16	1.39 ± 0.33
Células da medulla óssea (x10 ⁶ /mL)	7.02 ± 0.70	1.41 ± 0.22 *	7.19 ± 1.46 [#]	5.72 ± 0.96 [#]

Ciclofosfamida (Ciclo), polissacarídeos de babaçu (Poli) ou Ciclofosfamida com polissacarídeos de babaçu (Ciclo + Poli), via intralesional. As barras representam a média ± DP. * para p <0,05 em comparação com o grupo Salino, # para p <0,05 em comparação com o grupo Ciclofosfamida. Teste ANOVA *one-way* seguida por teste de comparação múltipla de Tukey (n = 5 / grupo).

Na avaliação das células dos órgãos linfóides o tratamento com a ciclofosfamida reduziu as células da MO. Este resultado é esperado, pois alguns agentes alquilantes apresentam como um dos seus efeitos colaterais a mielossupressão (Andrade, 2007). Lacerda (2001), coloca que os alquilantes da classe mostarda nitrogenada, como a Ciclofosfamida, tem a trombocitopenia, a neutropenia e a anemia como seu efeito mais citotóxico, sendo incluída a principal limitação para seu uso clínico. Assim, os dados sugerem que o tratamento com polissacarídeo é capaz de reduzir os efeitos citotóxicos sobre a medula óssea, induzido pela ciclofosfamida.

4.3 O tratamento com a fração polissacarídica obtida do mesocarpo de babaçu reduz a produção de citocina MCP1

Após o desenvolvimento do tumor sólido e realizado o tratamento intralesional, foi coletado o sangue para a determinação de citocinas. As interleucinas (IL) 6, 10, 12p70, Interferon gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Proteína quimiotática de Monócito 1 (MCP1 do inglês *Momocute chemotactic protein 1*) foram analisadas. O tratamento com a fração polissacarídica reduziu a concentração de MCP1 no sangue periférico quando comparado ao grupo Salina e Ciclofosfamida. O tratamento associado da ciclofosfamida e a fração polissacarídica apresentou valores menores que o

grupo Salina e Ciclofosfamida, entretanto sem diferença significativa (Figura 4). Para as demais citocinas, não foram observados valores detectáveis pelo método.

Dagli (1992) e Nery (2004) descrevem o tumor de Ehrlich como detentor de alta capacidade imunogênica, crescimento acelerado e agressivo, promovendo rápida invasão tecidual. Uma das características do tumor é apresentar uma resposta inflamatória intensa que colabora para angiogênese e progressão tumoral (SEGURA, 2000).

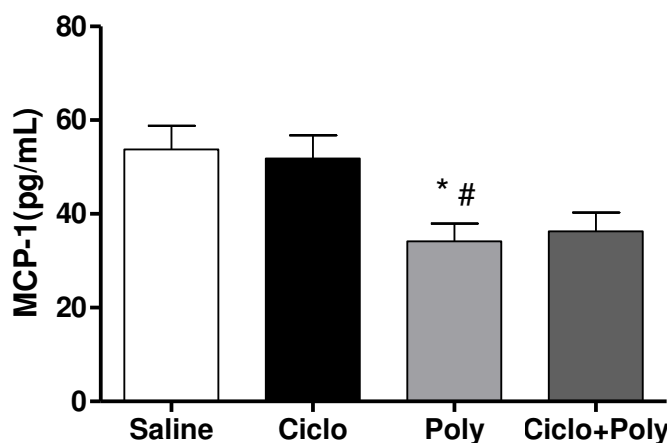


Figura 4: Concentração de Proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1) no soro. Valores da concentração sérica de MCP-1 nos animais tratados com solução tamponada de fosfato (Salina), tratados com Ciclofosfamida (Ciclo), com a fração polissacarídica do mesocarpo de babaçu (Poli) ou Ciclofosfamida associada com a fração polissacarídica do mesocarpo de babaçu (Ciclo + Poli), após 15 dias. As barras representam a média \pm DP. * para $p < 0,05$ em comparação com o grupo Salina, # para $p < 0,05$ em comparação com o grupo Ciclofosfamida. Teste ANOVA *one-way* seguida por teste de comparação múltipla de Tukey ($n = 5$ / grupo).

Os dados de MCP1 mostram que o tratamento com o polissacarídeo reduz uma citocina importante na inflamação. A MCP1 é uma citocina com função de estimulação da quimiotaxia de monócitos (MURPHY *et al.*, 2000), juntamente com seu receptor, ela coordena a movimentação de células efetoras para o sítio de inflamação, além do deslocamento de células imunes de locais periféricos até os órgãos linfoides drenantes para iniciar a resposta imunológica (GRIFFITH, SOKOL E LUSTER, 2014; MURDOCH, 2000). A inflamação é um componente crítico na progressão de tumores,

tendo diversos cânceres sua origem em sítios de infecção, irritação crônica ou inflamação, tornando-se claro que o microambiente tumoral, que é orquestrado pelas células inflamatórias, é um participante indispensável no processo neoplásico (COUSSENS E WERB, 2002; LOPES *et al.*, 2009). Assim, os resultados mostram que o tratamento com o polissacarídeo modula a resposta imune reduzindo a MCP1, sugerindo uma regulação negativa sobre a migração de células e manutenção da inflamação

4.4 O tratamento com fração polissacarídica de babaçu em tumor sólido apresentou baixos níveis de enzimas hepáticas no soro

O tratamento com a fração rica em polissacarídeos obtidos do mesocarpo de babaçu reduziu a Lactato desidrogenase e a transaminase glutâmico oxálica, quando comparado com o grupo Salina e com o grupo tratado com Ciclofosfamida. Esta diferença não foi observada no grupo tratado com Ciclofosfamida associada a fração polissacarídica do babaçu (Figura 5).

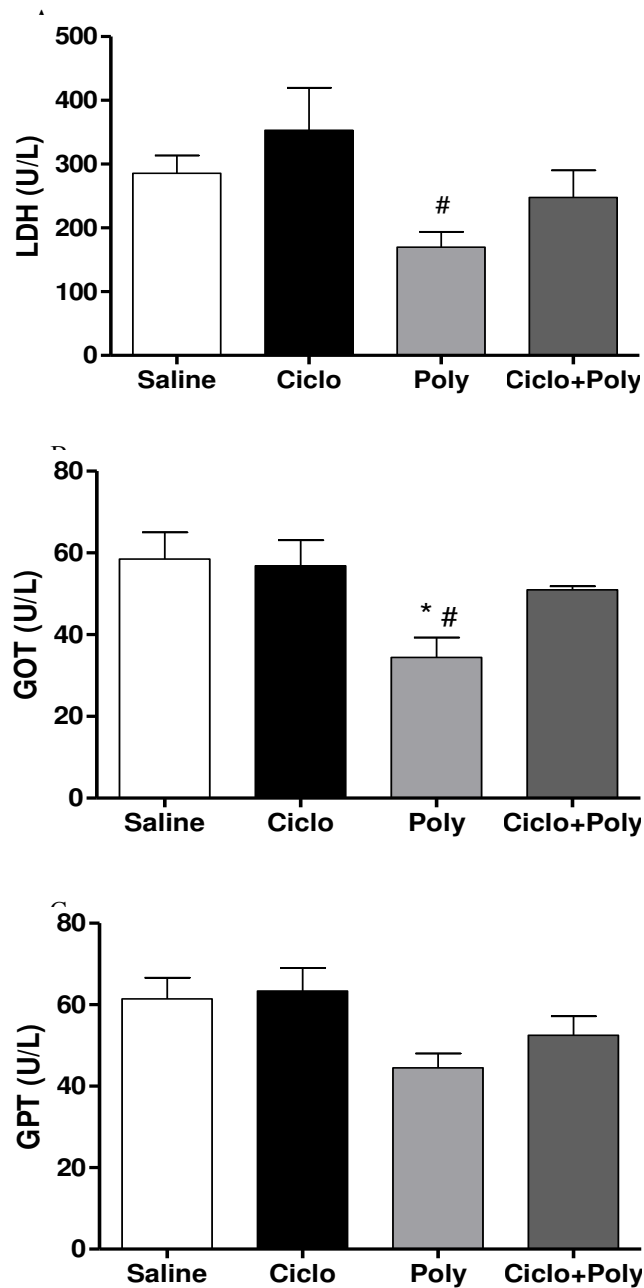


Figura 5: Efeitos do tratamento da fração polissacarídica sobre as enzimas hepáticas. (A) Concentração sérica de Lactato Desidrogenase (LDH), (B) Transaminase Glutâmico-oxálica (GOT) e (C) Transaminase Glutâmico-pirúvica (GPT) nos animais tratados com solução tamponada de fosfato (Salina), com Ciclofosfamida (Ciclo), com a fração polissacarídica obtida do mesocarpo de babaçu (Poli) ou tratamento associado com Ciclofosfamida e a fração polissacarídica (Ciclo + Poli), por via intralesional, após 15 dias. As barras representam a média \pm DP. * para $p < 0,05$ em comparação com o grupo Salina, # para $p < 0,05$ em comparação com Grupo ciclofosfamida. Teste ANOVA *one-way* seguido pelo teste pós-teste múltiplo de Tukey.

Os quimioterápicos podem causar hepatotoxicidade e suas implicações, como redução do metabolismo e diminuição na detoxificação hepática, indução e/ou inibição enzimática e icterícia. É acentuada com a ciclofosfamida entre outras, especialmente em regimes de quimioterapia oral em baixas doses e por tempo prolongado (LACERDA, 2001). Neste trabalho foi avaliado o efeito dos polissacarídeos na função hepática. Os resultados sugerem um efeito hepatoprotetor principalmente quando se observa a associação com a ciclofosfamida.

Na administração por via oral do extrato aquoso do pó de *Attalea speciosa* Mart., de forma geral, não se observou efeitos tóxicos, pois não houve sinais clínicos visíveis de toxicidade (SILVA *et al.*, 2012), não havendo mudança geral no perfil bioquímico, comparados com os valores de referência (HARKNESS e WAGNER, 1993).

A desidrogenase láctica (LDH) é encontrada em vários tecidos como coração, hemácias, fígado, músculo esquelético, rim, cérebro, pulmões e tecido linfóide. Desse modo, os valores de LDH total estarão altos em uma variedade de situações clínicas. Devido à sua distribuição diversificada pelos tecidos, a dosagem da LDH total não é um indicador específico nem de doenças hepáticas e nem de doenças cardíacas. Porém, quando determinada conjuntamente com outras enzimas, torna-se bastante útil para diagnóstico dessas patologias. Alterações pequenas da LDH total são encontradas em pacientes com hepatite aguda, nas icterícias obstrutivas e na cirrose, já valores muito altos são encontrados em carcinomas e no choque grave (LOPES, 1998).

As transaminases são indicadores sensíveis de dano hepático, particularmente quando é uma lesão aguda, hepatite aguda. Incluem a GOT e a GPT. A GOT existe também em outros tecidos como o coração, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas e, portanto, é muito menos específica de lesão hepática do que a GPT que existe primariamente no fígado. Portanto quando temos uma lesão hepática há refluxo de ambas as enzimas para o plasma

com elevação dos níveis de ambas as enzimas, sendo que a GPT sobe ligeiramente mais do que a GOT se a lesão for puramente hepática (NUNES e PORTO, 2006).

Segundo Birchard e Sherding (1998), os valores normais de referência para camundongo da GPT e GOT são respectivamente 26 a 77 UI/L, 54 a 269 UI/L. Já o valor de referência para LDH foi de 7.272 a 8.742, de acordo com Branco *et al* (2011).

Apesar de o tratamento com a fração polissacarídica do mesocarpo do babaçu ter reduzido os valores de enzimas hepática, estas permanecem dentro dos valores de normalidade, concordando com Barroqueiro (2001a) que relatam não haver hepatotoxicidade do tratamento intralesional com polissacarídeo e com a ciclofosfamida.

Os valores obtidos podem sugerir que as enzimas estudadas se mantiveram dentro dos limites da normalidade devido a via de administração do tratamento, porém são necessários mais estudos para corroborarem esta hipótese.

Outra hipótese aventada é que o tratamento com o polissacarídeo deu resultado significativo para as enzimas LDH e GOT em relação aos grupos Ciclo e Ciclo e salina, respectivamente, pois estas não são específicas de lesão hepática, mas também está aumentada em lesão tecidual de músculo esquelético, podendo refletir um estado de caquexia com mobilização de gordura e músculo esquelético (BODY, 1999). Supondo-se assim, que a diminuição das enzimas frente aos grupos Ciclo e Salina deveu-se ao fato de o polissacarídeo possuir atividade anti-inflamatória (BARROQUEIRO, 2001b) e energética (SILVA e PARENTE, 2001), sendo um possível mecanismo de preservação de proteínas musculares. Os resultados podem sugerir uma menor perda de massa muscular, entretanto, são necessários mais estudos para melhor avaliação da massa muscular em modelos experimentais.

5. CONCLUSÃO

O extrato aquoso do mesocarpo de babaçu, *Attalea speciosa* Mart., além de suas inúmeras propriedades estudadas, mostrou nesse estudo ter um efeito modulador da resposta imune reduzindo a MCP1, sugerindo uma regulação negativa sobre a migração de células e manutenção da inflamação; apresentou melhora na celularidade, indicando um efeito positivo, principalmente quando associado a ciclofosfamida e um efeito hepatoprotetor no modelo do tumor. Porém não foi eficiente para reduzir o tamanho do tumor sólido por via intralesional, sendo necessária uma avaliação histológica para melhor caracterizar a presença de edema e/ou infiltrado inflamatório.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C..B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Quím. Nova**, v. 28, n.1, 2005.

ANDRADE, M.; SILVA, S.R. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 3, p. 331-35, 2007.

ARAÚJO, EMM; ALMEIDA, CSC; GODINHO JUNIOR, JMF; NASCIMENTO, FRF; SANTOS, APSA. Ativação in vitro do sistema complemento como mecanismo imunomodulador induzido pelo mesocarpo de babaçu. *Rev. Ciênc. Saúde, São Luís*, v.15, n.1, p. 05-10, jan-jun, 2013.

AZEVEDO, A.P.S. et al. Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology** , 111:155-159, 2007.

BARROQUEIRO ESB. Efeito do mesocarpo de babaçu sobre a produção de anticorpos auto-reativos.[Dissertação – Mestrado]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão, 2001b

BARROQUEIRO, ESB, NASCIMENTO, FRF. GUERRA, RNM. Efeitos do tratamento com mesocarpo de babaçu sobre a produção de anticorpos para hormônio tireoidiano-tiroxina. *Rev. Do Hosp. Univers. UFMA* 2001a; 3: 25-27

BARROS IC. Avaliação Biofarmacotécnica de potencial excipiente farmacêutico: pó de mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart). [Dissertação]. Teresina: Universidade Federal do Piauí; 2011. 93p.

BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, v. 75, p. 245-255, 2004.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Neoplasia da glândula mamária. **BIRCHARD, SJ; SHERDING, RG; Manual Saunders: clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, p. 234-237, 1998.**

BODY JJ. The syndrome of anorexia-cachexia. **Curr Opin Oncol.** 1999;11(4):255-60.

BOETTNER,D. R. et al.Galactose/N-acetylgalactosamine lectin: the coordinator of host cell killing. **J of biosciences**, 27(6),553-557,2002.

BRANCO, A. C. S. C. et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.

CARVALHO,M.A.M.;PINTO,M.M;FIGUEREIO-RIBEIRO,R.C.L.Inulin production by *Vernonia herbacea*(Vell.) as influenced by mineral fertilization and time of harvest..**Revista Brasileira de Botânica**,v.21,p.1-8,1998.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, London, v.420, p.860-867, 2002.

DAGLI, M.L.Z.; GUERRA, J.L.; SALDIVA, P.H.N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 29, p. 97-103, 1992.

DENDULURI, N.; ERSHLER, W.B. Aging biology and cancer. **Semin Oncol**, v. 31, n. 2, p. 137-48, 2004.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 329-360, 2004.

EHRlich, P. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. *Arb. Inst. Exp. Ther. Frankfurt*, v.1, p. 78-80, 1906.

ELISANDRA, GC, SHIRLEY RRU, LORETE MSK., IARA TMR. Lectina Ligante de Manose (MBL): características biológicas e associação com doenças. *Rev. Bras. Alerg. Imunopatolog.* 2007; 30(05): 187-193.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Departamento de Difusão de Tecnologia. Babaçu, Programa Nacional de Pesquisa. Brasília: p. 89, 1984.

FARIAS, J.C et al. Efeito do tratamento com mesocarpo de babaçu sobre o processo de coagulação em camundongos. **Revista de Ciências da Saúde** 10 (2):107-115, 2008.

FERREIRA, E. C.; MATIAS, J. E. F.; CAMPOS, A. C. L.; TÂMBARA FILHO, R.; ROCHA, L. C. A.; TIMI, J. R. R.; SADO, H. N.; SAKAMOTO, D. G.; TOLAZZI, A. R. D.; SOARES FILHO, M. P. Análise da cicatrização da bexiga com o uso do extrato aquoso da *Orbignya phalerata* (babaçu): estudo controlado em camundongos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. vol. 21, s. 3, p. 33-39, 2006.

GRIFFITH JW, SOKOL CL, LUSTER AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol.** 2014; 32:659-702. Review.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARKNESS, S.E.; WAGNER, J.E. *Biologia e clínica de coelhos roedores*. São Paulo: **Livraria Roca**, 1993.

JACK DL, READ RC, TENNER AJ, FROSCHE M, TURNER MW, KLEIN NJ. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Infect Dis* 2001; 184: 1152-1162.

JANEWAY, CA, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK, M. O sistema complemento e a imunidade inata. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 63-84.

KHONG, H. T. et al. Immunization of HLA-A*0201 and/or HLA-DPbeta1*04 patients with metastatic melanoma using epitopes from the NY-ESO-1 antigen. **J Immunother**, v. 27, n. 6, p. 472-7, 2004 Nov-Dec 2004.

LACERDA, M. A. Quimioterapia e Anestesia, **Rev Bras Anesthesiol** Campinas , v. 51, n. 3, p. 250-270, June 2001.

LAGOS, J. B. Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas da *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae. [Dissertação–Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006.

LOPES, F.C., ROCHA, A., PIRRACO, A., REGASINI, L.O., SILVA, D.H., BOLZANI, V.S., AZEVEDO, I., CARLOS, I.Z., SOARES, R. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. **BMC Complement Altern Med.**, v. 22, p. 9-15, 2009.

LOPES, H.J.J., Enzimas nos laboratório clínico. Aplicações diagnósticas, 1998. [acesso em 17 mai 17]. Disponível em: [http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7BD24E41CD-601C-4721-BDA7E5B1CB3512B3%7D](http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7BD24E41CD-601C-4721-BDA7E5B1CB3512B3%7D%7D%7D%7D) Enzimas no Laboratorio Clinico[1].pdf

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2016, Incidência do Câncer no Brasil. [acesso em 04 mai 2017]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>.

MURDOCH C, FINN A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**. 2000;95(10):3032-43. Review

MURPHY PM, BAGIOLLINI M, CHARO IF, HÉBERT CA, HORUK R, MATSUSHIMA K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol Rev**. 2000;52(1):145-76. Review.

NASCIMENTO, F. R. et al. Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* Mart. **J Ethnopharmacol**, v. 103, n. 1, p. 53-8, Jan 2006.

NERY, L.H.R., Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos BALB/c. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – **Universidade Federal de Viçosa**, 2004.

NEVES, J.C.S. caracterização estrutural dos polissacarídeos obtidos do Basidioma de *pleurotus ostreatus* variedade *florida*. **Dissertação de Mestrado em Bioquímica**, Universidade Federal do Paraná, 2007.

NUNES, P.P.; PORTO, A.L.M., Fisiologia hepática. Texto de apoio. [acesso em 17 mai 17]. Disponível em: <http://www.doencasdofigado.com.br/fisiologia%20hepatica.pdf>

OMS. Cancer. [acesso em 06 mai 17]. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer/cancer>.

ONU. Câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo. [acesso em 04 mai 17]. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo>

ONUCHIC, Ana Cláudia; CHAMMAS, Roger. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

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

RESTIFO, N. P.; ROSENBERG, S. A. Use of standard criteria for assessment of cancer vaccines. **Lancet Oncol**, v. 6, n. 1, p. 3-4, Jan 2005.

ROSENTHAL, F.R.T. O amido do coco de babaçu, algumas propriedades dos grânulos e das pastas. **Ver. Bras. Tecnol.**, **6**: 29-33, 1975.

SANTOS, F.V.; POZETTI, G.L.; VARANDA, E.A. Avaliação da mutagenicidade do extrato alcoólico de *Orbignyaphalerata* Mart. **Ver. Bras. Pl. Med.**, v.8,n.4,p.165-168, 2006.

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

SHARMA, P. *et al.* Rapid and sensitive detection of autoantibody in rheumatoid arthritis patients by heat-mediated ELISA. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n.1/2, p. 97-102, 2008.

SILVA, A.E. *Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich na deficiência ou suficiência dos esteróides sexuais femininos*, 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, A.P.S.; SOUSA, G.F.; FREITAS, R.M.; NUNES, L.C.C. Avaliação da toxicidade aguda, DL50 e screening hipocrático do extrato aquoso do pó do mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart (babaçu). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 4, p. 393-401, 2012.

SILVA, BP, PARENTE, JP. An anti-inflammatory. and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia*. 2001; 72(8): 887-93.

SOUZA, M. G. Determinação de As, Cd e Pb em amêndoas e mesocarpo de babaçu, sapucaia, xixá e castanha-do-pará por espectrometria de absorção atômica. *Química Nova*, vol. 32, n. 6, p. 1442-1446, 2009.

STEWART, H.L. (Ed.). *Transplantable and transmissible tumors of animals*. Washington, D.C.: Armed Fource Institute of Pathology, 1959. 378p.

TAKAHASHI K, IP WE, MICHELOW IC, EZERKOWITZ RA. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Cur Opin Immunol* 2006; 18:16-23.


TEIJO F. Evolution of the Lectin-Complement Pathway and its role in Innate Immunity. *Nature Reviews* 2002; 2: 346-351.

WAGNER, R. et al. Structure of a glycoglucuronomannan from the low-viscosity gum of *Vochysia lehmannii*. **Carbohydr Polym**, 57, p.269–275, 2004.

VERÇOSA, D.J. et al. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.59, n.1, p.150-154, 2007.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 715-727, 2006.

ANEXO

 UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 05
PROJETO DE PESQUISA	Registro da CEUA: 05/11 Nº do Protocolo: 006808/2011-00 Data de entrada no CEUA: 26/05/11 Parecer: Aprovado

I – Identificação

Título do projeto: Indução da resposta imune antitumoral com células tumorais de Erlich pre tratadas com mesocarpo de Babaçu		
Identificação da equipe executora: Ana Paula S. Azevedo, Flávia Raquel Nascimento, Graciomar Costa, Lucilene Amorim		
Instituição onde será realizado: UFMA		
Área temática: Não se aplica	Multicêntrico: Não	Data de recebimento:
Cooperação estrangeira:		Data de devolução:

II – Objetivos:

Geral

Avaliar a indução da resposta imune antitumoral mediada por células de tumor de Ehrlich pre tratada com extrato aquoso de mesocarpo de babaçu.

Específicos

- Investigar a presença de proteínas do tipo I α no extrato aquoso de mesocarpo de babaçu;
- Avaliar a evolução do tumor de Ehrlich na forma sólida e ascística, in vivo, após o tratamento intransitável lesional com células de tumor pre tratadas com mesocarpo de babaçu;
- Verificar a celularidade dos órgãos linfóides dos animais, após o tratamento intra lesional com células de tumor pre tratadas com mesocarpo de babaçu ;
- Avaliar por cortes histológicos o desenvolvimento do tumor sólido em animais tratados por via intra lesional com células de tumor de Ehrlich pre tratada com mesocarpo de babaçu;
- Verificar a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio por macrófagos mantidos em cultura de células tumorais pre tratadas com extrato aquoso de mesocarpo de babaçu.